



องค์ประกอบ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)

วิทยานิพนธ์
ของ
อนุวัฒน์ ทุมมานาม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
สิงหาคม 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

องค์ประกอบ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)

วิทยานิพนธ์
ของ
อนุวัฒน์ ทุมมานาม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
สิงหาคม 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Composition and Antimicrobial Activity of Defensive Secretions of the Giant
Millipede *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida :
Harpagophoridae)

Anuwat Tummanam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biology)
August 2022

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายอนุวัฒน์ ทุมมานาม
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. ผ่องพรรณ ประสารก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. วราภรณ์ สุทธิสา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. วิชญ รัชตเวชกุล)

..... กรรมการ

(ผศ. ดร. สุธีรา มณีฉาย)

..... กรรมการ

(ผศ. ดร. อธิพร กทิตศาสตร์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	องค์ประกอบ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)		
ผู้วิจัย	อนุวัฒน์ ทุมมานาม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ สุทธิสา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชญ์ รัชตเวชกุล		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2565

บทคัดย่อ

กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* จัดอยู่ในอันดับ Spirostreptida เป็นกิ้งกือในกลุ่ม กิ้งกือกระบอก Superorder Juliformia ร่วมกับอันดับ Spirobolida และ Julida ที่มีสารคัดหลั่ง ป้องกันตัวกลุ่มเบนโซควิโนน (benzoquinone) เป็นสารประกอบหลัก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัว และฤทธิ์การต้านจุลชีพจากกิ้งกือสปีชีส์นี้โดย สกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากต่อม repugnatorial ในตัวทำละลายจากความเข้มข้นน้อยไปหาความมี ้นข้มาก ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล นอกจากนี้ยังทดสอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้ จากต่อมโดยตรงที่ไม่ผ่านการสกัดด้วย องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัว วิเคราะห์ด้วย เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบว่าคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อม โดยตรงมีสารองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone (58.58 เปอร์เซ็นต์) และ 2-methyl-1,4-benzoquinone (15.71 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นสารควิโนนหลักที่พบ ในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือกลุ่มกิ้งกือกระบอก ส่วนในสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และ เมทานอล พบ hexyl pentadecanoate เป็นองค์ประกอบหลัก การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพทำ การทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 3 สายพันธุ์ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus aureus* DMST20654) แบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์ (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella* Typhi ATCC16122) และยีสต์ 2 สายพันธุ์ (*Candida albicans* และ *Candida albicans* ATCC10231) การทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรม บวกและ *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อม โดยตรงสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.002 - 0.250 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ค่า MBC สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบบอยู่ในช่วง 0.063 - 0.125 และ 0.250 -

0.500 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ และค่า MFC อยู่ในช่วง 0.0039 - 0.0078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยสามารถยับยั้ง และทำลายยีสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ายาปฏิชีวนะฟลูโคนาโซล

คำสำคัญ : กิ่งกือกระบอก ฤทธิ์การต้านจุลชีพ สารคัดหลังป้องกันตัว องค์ประกอบทางเคมี

TITLE	Composition and Antimicrobial Activity of Defensive Secretions of the Giant Millipede <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)		
AUTHOR	Anuwat Tummanam		
ADVISORS	Assistant Professor Piyatida Pimvichai, Ph.D. Assistant Professor Waraporn Sutthisa, Ph.D. Assistant Professor Widchaya Radchatawedchakoon, Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2022

Abstract

The defensive secretions of the giant millipede *Anurostreptus sculptus* (Diplopoda: Spirostreptida) contain benzoquinone as a major chemical component. The present work aims to further examine the chemical composition of the defensive secretions of this species and their antimicrobial activity. To this end, the repugnatorial glands were extracted by soaking the glands in different chemical solutions to increase the polarity viz., hexane, ethyl acetate, and methanol. Moreover, fresh defensive secretions derived directly from the repugnatorial glands were also tested. The chemical composition of defensive secretions was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Two main components were found in fresh secretions: 1) 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone (58.58%), and 2) 2-methyl-1,4-benzoquinone (15.71%), the common benzoquinone found in juliform millipedes. The three polarizing solutions, furthermore demonstrated the presence of hexyl pentadecanoate as a major component (80.02%, 54.87% and 58.33%, respectively). Antimicrobial activity was tested with three gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* DMST20654), four gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Typhi ATCC16122), and two yeast strains (*Candida albicans* and *Candida albicans* ATCC10231). A broth microdilution technique indicated that all gram-positive bacteria and *C. albicans* were inhibited by three extracted secretions with a minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 0.25 to 2.00 mg/mL and with a minimum bactericidal concentration (MBC) of 2.00 mg/mL for gram positive-bacteria. The

strongest inhibition was found in fresh secretions which inhibit all microbes tested in this study with a MIC of 0.002 - 0.250% (v/v) and with an MBC for gram-positive and gram-negative bacteria in the range of 0.063 - 0.125 and 0.250 - 0.500% (v/v), respectively. The minimum fungicidal concentration (MFC) ranged from 0.0039 to 0.0078% (v/v). Fresh secretions were more effective in inhibiting and killing yeast than fluconazole.

Keyword : antimicrobial activity, chemical composition, defensive secretions, spirostreptid millipedes

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะธิดา พิมพิชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ สุทธิสา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชญ รัชตเวชกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ผ่องพรรณ ประสารกก ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุธิรา มณีฉาย กรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กทิสาสตร์ กรรมการสอบ ที่กรุณา ให้ความรู้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.รุ่งฤดี ทิวทอง ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อเพื่อเชื่อมต่อสอบ สถานที่ วัสดุ และ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่อำนวยความสะดวกในการเบิก อุปกรณ์ ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง สกว. และ มมส. ของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะธิดา พิมพิชัย (สัญญาเลขที่ RSA6280051) และโครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการ วิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2564 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (สัญญา เลขที่ 6404003/2564)

อนุวัฒน์ ทุมมานาม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1	
บทนำ.....	1
1.1 ที่มา และความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 สถานที่ดำเนินการวิจัย.....	3
1.5 ระยะเวลาดำเนินการ.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2	
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล.....	5
2.1 อนุกรมวิธาน และลักษณะทั่วไปของกิ้งกือ.....	5
2.2 กิ้งกือยักษ์ <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961.....	6
2.3 สันฐานวิทยาของกิ้งกือ.....	8
2.4 ถิ่นที่อยู่อาศัย และการกระจาย.....	8
2.5 บทบาทในทางนิเวศวิทยา.....	9
2.6 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิต.....	9
2.7 ผู้ล่า และภาวะปรสิต.....	10
2.8 หน้าที่ และความสำคัญของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ.....	10
2.9 ต่อม repugnatorial.....	11
2.10 การหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ.....	14
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.11.1 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ในอันดับ Spirostreptida... ..	14
2.11.2 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกืออันดับอื่น ๆ.....	16

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....	19
3.1 การเก็บตัวอย่างกิ่งกือ.....	19
3.2 การเก็บตัวอย่างสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งกือ.....	20
3.3 การสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัว.....	20
3.4 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง.....	22
3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัว.....	22
3.5.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี- แมสสเปกโตรเมทรี.....	22
3.6 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ.....	23
3.7 เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบ และการเตรียมเชื้อ.....	23
3.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ.....	24
3.8.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ <i>A. sculptus</i> เบื้องต้น.....	24
3.8.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC).....	25
3.8.3 ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC).....	25

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย.....	26
4.1 ผลการสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัว.....	26
4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ <i>A. sculptus</i> ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี.....	27
4.2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล ได้ผลดังนี้.....	27
4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ.....	29
4.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ <i>A. sculptus</i> เบื้องต้น.....	29
4.3.2 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC).....	38

4.3.3 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย(minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC) 41

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการดำเนินการวิจัย 45

5.1 การสกัดสารคัดหลังป้องกันตัว 45

5.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือ *A. sculptus*.....45

5.3 ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัด 46

5.4 ข้อเสนอแนะ 49

บรรณานุกรม..... 50

ประวัติผู้เขียน..... 58

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ขั้นตอน และระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....	3
ตารางที่ 2 ปริมาณของสารที่สกัดได้ (yield) จากต่อม repugnatorial ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลเอซีเทต และเมทานอล.....	26
ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ <i>A. sculptus</i> ด้วยเครื่อง GC-MS	28
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงด้วยวิธี paper disc diffusion	31
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (MIC) ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง	39
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง	42

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กิ่งก้อยักษ์ <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961.....	6
ภาพที่ 2 โครงสร้างโกโนพอดของ <i>A. sculptus</i>	7
ภาพที่ 3 ต่อม repugnatorial ของ <i>A. sculptus</i>	13
ภาพที่ 4 ช่อง ozopore ที่อยู่ด้านข้างของลำตัวของ <i>A. sculptus</i>	13
ภาพที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง	19
ภาพที่ 6 ขั้นตอนการสกัดสารจากต่อม repugnatorial	21
ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยวิธี paper disc diffusion	24
ภาพที่ 8 A. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง B. สารสกัดที่ได้จากตัวทำลายเฮกเซน C. สารสกัดที่ได้จากตัวทำลายเอทิลแอลกอฮอล์ และ D. สารสกัดที่ได้จากตัวทำลายเมทานอล....	26
ภาพที่ 9 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>B. cereus</i>	33
ภาพที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i>	33
ภาพที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> DMST20654	34
ภาพที่ 12 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i>	34
ภาพที่ 13 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC25922.....	35
ภาพที่ 14 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	35
ภาพที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	36
ภาพที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i>	36
ภาพที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ATCC10231.....	37
ภาพที่ 18 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่สามารถทำลายยีสต์ได้.....	44

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มา และความสำคัญ

กิ้งกือ (millipedes) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำแนกอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอดา (Phylum Arthropoda) ไฟลัมย่อยไมเรียพอดา (Myriapoda) ซึ่งประกอบไปด้วย 4 ชั้น (class) ได้แก่ Pauropoda Symphyla Chilopoda และ Diplopoda โดยกิ้งกือจัดอยู่ในชั้น Diplopoda มีลักษณะเฉพาะโดดเด่นที่สามารถใช้ในการจำแนกเบื้องต้น คือ มีขา 2 คู่ต่อ 1 วงปล้องลำตัว โดยชั้น Diplopoda เป็นอาร์โทรพอดที่อาศัยอยู่บนบกที่มีความหลากหลายมากเป็นอันดับ 3 รองจากชั้น Insecta และ Arachnida ปัจจุบันมีการรายงานจำนวนชนิดของกิ้งกือ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลแล้วประมาณ 12,000 สปีชีส์ และคาดว่าจะมีจำนวนมากถึง 80,000 สปีชีส์ (Golovatch & Kime, 2009; Sierwald & Bond, 2007) ในภาษาละติน คำว่า milli หมายถึง จำนวนพัน และ pede หมายถึง ขา ดังนั้นตามชื่อ millipedes จึงกล่าวกันว่ากิ้งกือเป็นสัตว์พันขา แต่โดยส่วนใหญ่จะมีประมาณ 100 - 300 ขา และในปัจจุบันกิ้งกือที่มีจำนวนขาสูงสุด 1,306 ขา คือ *Eumillipes persephone* Marek, 2021 โดยกิ้งกือถือเป็นสัตว์ที่มีจำนวนขามากที่สุดในบรรดาสัตว์บกทั้งหมด (Alagesan, 2016; Marek *et al.*, 2021)

กิ้งกือถือกำเนิด และปรากฏอยู่บนโลกมากกว่า 400 ล้านปี ยาวนานมากกว่ามนุษย์ถึง 100 เท่า และจากรายงานการพบซากดึกดำบรรพ์ (fossil) แสดงให้เห็นว่ากิ้งกือมีการกระจายไปทั่วโลก (Alagesan, 2016) ยกเว้นในเขตขั้วโลก ส่วนใหญ่พบการกระจายของกิ้งกือตามป่าเขตอบอุ่น และเขตร้อน กิ้งกือมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในระบบนิเวศ โดยทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายเศษซากอินทรีย์ (detritivore) ร่วมกับจุลินทรีย์ให้เป็นธาตุอาหารหมุนเวียนกลับสู่ดิน จึงเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญมากกับคุณภาพของดินเช่นเดียวกับสัตว์หน้าดินชนิดอื่น ๆ โดยมูลของกิ้งกือที่ขับถ่ายออกมา มีลักษณะเป็นเม็ดคล้ายยาลูกกลอน จึงเป็นปุ๋ยอินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีธาตุอาหารครบถ้วน

นอกจากนี้หนึ่งในลักษณะที่โดดเด่นของกิ้งกือ คือการมีสีส้มภายนอกที่สวยงามซึ่งส่วนใหญ่เป็นสีที่ใช้เตือนภัย (warning coloration) เนื่องจากกิ้งกือมีกลไกการป้องกันตัวจากศัตรูตามธรรมชาติ ได้แก่ กลไกการป้องกันตัวขั้นปฐมภูมิ (primary mechanism) คือ การมีโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) และกลไกการป้องกันตัวขั้นทุติยภูมิ (secondary mechanism) คือ การหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัว (defensive secretion) (Klem, 2017) ผ่านช่องเปิดข้างลำตัวที่เรียกว่า ozopore โดยช่องเปิดข้างลำตัวนี้มีการพบในซากดึกดำบรรพ์ของกิ้งกือจากยุคคาร์บอนิเฟอรัส (carboniferous) ซึ่งต่อมที่ผลิตสารคัดหลั่งเหล่านี้คือ ต่อม repugnatorial ต่อมนี้สามารถผลิตสารได้

หลากหลายกลุ่ม เช่น ฟีนอล (phenol) แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์พีน (terpene) ควิโนน (quinone) และสารประกอบไซยาโนเจน (cyanogenic compound) สารคัดหลั่งป้องกันตัวเหล่านี้ นอกจากใช้ป้องกันตัวจากผู้ล่าที่ส่วนใหญ่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง อาจมีหน้าที่อื่น ๆ เช่น ใช้เป็นฟีโรโมน ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ และกำจัดปรสิตที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย (Shear, 2015; Sierwald & Bond, 2007)

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบ และหน้าที่ของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวของกิ้งกือในประเทศไทยยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะกิ้งกือในอันดับ Spirostreptida ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกิ้งกือขนาดใหญ่ มีความหลากหลายสปีชีส์มาก โดยปัจจุบันมีรายงานการค้นพบในประเทศไทยประมาณ 64 สปีชีส์ (Enghoff, 2005; Likhitrakarn *et al.*, 2020; Pimvichai *et al.*, 2009a, 2009b, 2011a, 2011b, 2016) และการรายงานเกี่ยวกับสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวในอันดับนี้ยังมีน้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 ที่จำแนกอยู่ในวงศ์ Harpagophoridae ซึ่งเป็นวงศ์ของกิ้งกือที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย (ความยาวลำตัวมากกว่า 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวมากกว่า 15 มิลลิเมตร) (Enghoff, 2005) มี ozopore ที่สามารถมองเห็นได้อย่างเด่นชัด และในปัจจุบันพบเขตการกระจายเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (Pimvichai *et al.*, 2010)

1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา

- 1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*
- 1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*

1.3 ขอบเขตการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบ และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion รวมทั้งทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ค่า minimum bactericidal concentration (MBC) และค่า minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* ต่อยีสต์ 2 สายพันธุ์คือ *Candida albicans* และ *Candida albicans* ATCC10231 แบคทีเรียแกรมบวก 3 สายพันธุ์คือ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus aureus* DMST20654 และแบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella Typhi* ATCC16122

1.4 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1.4.1 เก็บรักษาตัวอย่างกิ่งกือ ณ ห้องปฏิบัติการ SC2-304/2 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัว ณ ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (BSL2) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.4.2 วิเคราะห์ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5 ระยะเวลาดำเนินการ

ตารางที่ 1 ขั้นตอน และระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงาน	ระยะเวลา					
	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
	2564	2564	2564	2564	2564	2564
1. ศึกษาเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	←————→					
2. เก็บตัวอย่างภาคสนาม	←————→					
3. สกัดสาร	←————→					
4. นำสารไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS	←————→					
5. ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion	←————→					
	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.
	2565	2565	2565	2565	2565	2565
6. ทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (MIC)	←————→					

ตารางที่ 1 ขั้นตอน และระยะเวลาดำเนินการวิจัย (ต่อ)

ขั้นตอนการดำเนินงาน	ระยะเวลา					
	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.
	2565	2565	2565	2565	2565	2565
7. ทดสอบค่าความเข้มข้น ของสารที่ต่ำที่สุดในการ ทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration : MFC)	↔					
8. วิเคราะห์และสรุปผลการ ทดลอง	↔					
9. เตรียมเขียนเล่ม วิทยานิพนธ์และต้นฉบับ ผลงานวิจัย	↔					

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.6.1 ทราบถึงองค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*
- 1.6.2 ทราบถึงฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*
- 1.6.3 ทราบถึงค่า MIC ค่า MBC และค่า MFC ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus* ต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรค
- 1.6.4 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการนำสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์

บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 อนุกรมวิธาน และลักษณะทั่วไปของกิ้งกือ

กิ้งกือเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งจัดจำแนกในลำดับทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Subphylum Myriapoda

Class Diplopoda

กิ้งกือเป็นสัตว์ขาข้อ (arthropods) จัดอยู่ในไฟลัมย่อยไมเรียโปดา (Subphylum Myriapoda) ชั้น Diplopoda ร่วมกับสัตว์อีก 3 ชั้นย่อย ได้แก่ Pauropoda Symphyla และ Chilopoda โดยชั้น Diplopoda เป็นชั้นที่มีความหลากหลายมากที่สุดในไฟลัมย่อยไมเรียโปดา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 4 ชั้นนี้มีความคล้ายคลึงกัน ลักษณะของสัตว์ชั้น Pauropoda นั้นเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็กความยาวลำตัวประมาณ 0.3 - 1.7 มิลลิเมตร ตัวสีขาว ตาบอด และมีหนวดที่แตกแขนงมาก อาศัยอยู่ตามพื้นดินใต้เศษใบไม้ ใต้ก้อนไม้ (Scheller, 2004) สัตว์ในชั้น Symphylan มีความยาวไม่เกิน 10 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีขาหรือไม่มีสี คล้ายกับตะขาบขนาดเล็กแต่ไม่มีเขี้ยวพบได้ตามพื้นดิน ตามเศษใบไม้เช่นเดียวกัน (Burden, 2004) และชั้น Chilopoda นั้นเป็นผู้ล่าที่มีเขี้ยวพิษ (forcipule) ซึ่งเป็นรยางค์คู่แรกที่เปลี่ยนแปลงมาทำหน้าที่เฉพาะ หนวดขนาดยาว และมีขา 1 คู่ต่อ 1 ปล้องลำตัว ส่วนสัตว์ในชั้น Diplopoda หรือกิ้งกือมีลักษณะเฉพาะที่โดดเด่นที่สามารถใช้ในการจำแนกได้คือมีขา 2 คู่ต่อ 1 วงปล้องลำตัว เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า diplosegment กิ้งกือที่พบเห็นโดยส่วนใหญ่มีรูปร่างทรงกระบอกมีหลายขนาด กิ้งกือในอันดับ Glomerida และ Sphaerotheriida หรือกิ้งกือกระสุน (pill millipede) มีความสามารถในการกลิ้งโดยการม้วนตัวเป็นลูกกลมแน่น นอกจากนี้กิ้งกือยังมีบทบาทที่สำคัญในทางนิเวศวิทยา ช่วยย่อยสลายเศษซากพืชที่เน่าเปื่อย มักพบอยู่ใต้เศษใบไม้ มีความหลากหลายสปีชีส์มาก และคาดว่าจะมีจำนวนมากถึง 80,000 สปีชีส์ และมีขอบเขตการกระจายกว้าง ส่วนใหญ่พบในป่าผลัดใบเขตอบอุ่น ป่ากึ่งเขตร้อน ไปจนถึงป่าเขตร้อน (Kime & Golovatch, 2000; Sierwald & Bond, 2007; Stoev *et al.*, 2010)

2.2 กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961

กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 จัดอยู่ในอันดับ Spirostreptida เป็นอันดับที่มีกิ้งกือกระบอกขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Harpagophoridae มีขนาดลำตัวใหญ่ที่สุดจากกิ้งกือที่พบในประเทศไทยทั้งหมด โดยมีความยาวมากกว่า 20 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวประมาณ 15 - 20 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1) มีโกโนพอด (gonopod) อยู่ที่ปล้องลำตัวที่ 7 ใช้ในการสืบพันธุ์ของเพศผู้ (ภาพที่ 2) และในปัจจุบันพบเขตการกระจายเฉพาะในประเทศไทย (Enghoff, 2005; Pimvichai *et al.*, 2010)



ภาพที่ 1 กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961



ภาพที่ 2 โครงสร้างโกโนพอดของ *A. sculptus*

A: ด้านหน้า และด้านหลังของโกโนพอด B: ด้านหน้า และด้านหลังของ telopodite

2.3 ลักษณะวิยาของกิ้งกือ

ลำตัวของกิ้งกือแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนหัว กิ้งกือมีหนวดอยู่ข้างหัว 1 คู่ประกอบด้วย 7 ข้อ (ยกเว้นใน Subclass Penicillata มี 8 ข้อ) บริเวณโคนหนวดมีอวัยวะที่ชื่อว่า Tömösváry organ (TO) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้รับสัมผัส แต่กิ้งกือบางกลุ่มอาจไม่พบอวัยวะนี้ ตาของกิ้งกืออยู่ข้างหัวส่วนใหญ่เป็นตาประกอบเรียกว่า ommatidia แต่ในบางชนิดอาจไม่พบอวัยวะนี้โดยเฉพาะกิ้งกือที่อาศัยอยู่ในถ้ำ ส่วนปากประกอบด้วย 2 ส่วนคือ mandible ใช้ในการบดเคี้ยว และ gnathochilarium ประกอบด้วยแผ่นแข็งที่เรียกว่า sclerite มีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ในแต่ละอันดับ ซึ่งสามารถใช้จำแนกในระดับอันดับได้ นอกจากนี้โครงสร้าง mandible ของกิ้งกือ และตะขามีความคล้ายคลึงกันซึ่งสนับสนุนความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่เป็นวงศ์วานวิวัฒนาการเดียว (monophyly) ของกลุ่ม myriapod

ส่วนลำตัว ลำตัวของกิ้งกือมีลักษณะเป็นวงปล้อง (body ring) โดยวงปล้องของลำตัวกิ้งกือส่วนใหญ่เกิดจากการรวม 2 วงปล้องเข้าด้วยกัน จึงทำให้มีขา 2 คู่ต่อ 1 วงปล้อง แต่ส่วนแรกที่เกิดจากส่วนหัวคือคอลลัม (collum) เป็นส่วนที่ไม่มีขาพบได้ใน Pauropoda ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (sister group) กับ Diplopoda วงปล้องที่ 2 - 4 มีขาเพียง 1 คู่ต่อ 1 วงปล้อง ขาของกิ้งกือประกอบด้วย 7 ข้อ ได้แก่ coxa, prefemur, femur, postfemur, tibia, tarsus และ claw ด้านข้างวงปล้องของกิ้งกือส่วนใหญ่จะมีรูที่ใช้ในการหลังสารคัดหลั่งป้องกันตัว เรียกว่า ozopore ส่วนท้ายสุดของลำตัวกิ้งกือคือส่วน telson ซึ่งมี preanal ring ที่ประกอบด้วย anal, valve และ subanal scale และในหลาย ๆ อันดับจะมีหนาม ที่เรียกว่า terminal spinneret พบอยู่ในส่วนท้ายของร่างกายด้วย (Sierwald & Bond, 2007 และ สมศักดิ์ ปัญญา, 2549)

2.4 ถิ่นที่อยู่อาศัย และการกระจาย

โดยส่วนใหญ่สามารถพบการกระจายของกิ้งกือได้ในป่าผลัดใบกึ่งเขตร้อน (subtropical) หรือป่าเขตร้อน (tropical) ถิ่นที่อยู่อาศัยที่พบมากที่สุดคือ บริเวณที่มีเศษซากใบไม้ทับถมกัน บริเวณชั้นต่าง ๆ ของดิน และบริเวณเศษซากต้นไม้ที่ตายแล้ว หรือผลไม้ที่ร่วงหล่น บางสปีชีส์อาศัยบนต้นไม้ รวมไปถึงกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* ด้วย กิ้งกือมังกรสกุล *Desmoxytes* Chamberlin, 1923 อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เป็นเขาหินปูน หรือภูเขาหินแกรนิต เนื่องจากมีความจำเป็นในการใช้แคลเซียมเพื่อสร้างส่วนต่อหุ้มลำตัว และมีบางสปีชีส์ที่อาศัยอยู่บนโขดหิน (Srisonchai *et al.*, 2018) นอกจากนี้ยังพบว่ากิ้งกือสามารถอาศัยอยู่ได้หลากหลายพื้นที่ หรือแม้กระทั่งในสภาพแวดล้อมที่มีความรุนแรง บางสปีชีส์สามารถพบได้ทั่วไปในทะเลทราย เช่น *Orthoporus ornatus* (Girard, 185) ที่อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกาโดยการซ่อนตัวอยู่ตามรอยแยกใต้ก้อนหิน กิ้งกือบางสปีชีส์ในยุโรปสามารถทนต่อการจมน้ำในฤดูหนาวได้ เช่น *Polydesmus denticulatus* C. L. Koch, 1847

ที่สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำได้ถึง 74 วัน (ในห้องปฏิบัติการ) และนอกจากนี้ยังมีรายงานการพบกิ้งกือในเขตทุนดรา (zonal tundra) คือ *Proteroiulus fuscus* (Am Stein, 1857) ซึ่งพบอยู่ทางเหนือสุดของยูเรเชีย และ *Polyxenus lagurus* (Linnaeus, 1758) ซึ่งพบอยู่บริเวณวงกลมอาร์กติก (arctic circle) เป็นต้น (Golovatch & Kime, 2009)

2.5 บทบาทในทางนิเวศวิทยา

กิ้งกือส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นผู้บริโภคซากอินทรีย์ (detritivore) บทบาทหลักคือการย่อยสลายซากพืชที่ตายแล้ว (Hopkin and Read, 1992) ซึ่งช่วยกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์เพราะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวให้จุลินทรีย์สามารถทำงานได้มากขึ้นทำให้เกิดการหมุนเวียนธาตุอาหารที่จำเป็นกลับสู่ดิน การย่อยสลายซากอินทรีย์ที่กิ้งกือบริโภคเข้าไปเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร มูลที่กิ้งกือขับถ่ายออกมาจะมีลักษณะเป็นก้อนกลมคล้ายยาลูกกลอนซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ (สมศักดิ์ ปัญหา และคณะ, 2552) บางสปีชีส์กินพืชสด และถือได้ว่าเป็นศัตรูพืช บางสปีชีส์ในอันดับ Polyzoniida และ Siphonophorida มีการดัดแปลงส่วนของปากเพื่อใช้ดูดน้ำจากพืช (โดยเฉพาะจากราก) และอาจมีการสะสมแอลคาลอยด์ไว้ในเนื้อเยื่อที่ได้จากพืชเหล่านั้น กิ้งกือในอันดับ Platydesmida บางชนิดอาจกินเชื้อราและสาหร่าย penicillata จากเปลือกไม้ บางสปีชีส์อาศัยบนต้นไม้ และในบางชนิดต้องกินมูลตัวเอง (coprophagy) เพื่อเพิ่มน้ำหนัก และเพื่อให้ย่อยรอด (Sierwald & Bond, 2007)

2.6 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิต

กิ้งกือเพศผู้กลุ่ม Helminthomorpha มีอวัยวะที่สามารถส่งถ่ายสเปิร์มโดยใช้ยางค์ในปล้องลำตัวที่ 7 ที่มีการดัดแปลงมาทำหน้าที่นี้โดยเฉพาะเรียกว่า โคโนพอด ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความจำเพาะในแต่ละสปีชีส์ สามารถนำมาใช้จำแนกในทางอนุกรมวิธานได้ ส่วนเพศผู้กลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่ม Pentazonia แม้ว่าจะมีขนาดเล็กกว่ามากแต่โคโนพอดที่บริเวณส่วนท้าย (telopod) ทำหน้าที่ส่งถ่ายสเปิร์ม และจับคู่กับเพศเมียได้เช่นเดียวกัน สเปิร์มของกิ้งกือนั้นถือเป็นลักษณะวิวัฒนาการที่เป็นเอกลักษณ์ (apomorphy) มีหลักฐานวิทยาที่ค่อนข้างซับซ้อนแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชั้นอื่น ๆ (Sierwald & Bond, 2007) ส่วนในเพศเมียอวัยวะเพศเรียกว่า cyphopods และจะมีท่อไข่เปิดผ่านช่องบริเวณด้านหลังขาคู่ที่ 2 กิ้งกือสามารถสืบพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุ 1 ปี เมื่อผสมพันธุ์ตัวผู้และตัวเมียจะม้วนรัดกันเป็นเกลียว จากนั้นกิ้งกือจะวางไข่ในดินในรูปแบบที่แตกต่างกัน และจำนวนของไข่ก็แตกต่างกันเช่นกัน โดยมีจำนวนตั้งแต่ 3 ถึง 4 ฟองไปจนถึง 2,000 ฟอง โดยทั่วไปแล้วไข่ของกิ้งกือจะมีสีเหลือง และมีคุณค่าทางโภชนาการในการเลี้ยงดูลูกจนกว่าจะเกิดการลอกคราบครั้งที่สอง เนื่องจากลูกกิ้งกือจำนวนมากยังคงอยู่ในเปลือกไข่ และจะไม่กินอาหารจนกว่าจะถึงเวลาที่เหมาะสม ในอันดับ Platydesmida ตัวผู้จะทำหน้าที่ปกป้องไข่ แรกฟักลูกกิ้งกือจะไม่มีขาแต่จะมีการพัฒนา

และสร้างวงปล้องลำตัวจากการลอกคราบในแต่ละครั้ง ลูกกิ้งกือจะมีสีอ่อนกว่าตัวเต็มวัย และใช้เวลานาน 12 เดือนจึงจะโตเต็มวัย โดยขั้นตอนการลอกคราบของกิ้งกือใช้เวลาจนถึง 3 สัปดาห์ระหว่างนั้นจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Alagesan, 2016)

2.7 ผู้ล่า และภาวะปรสิต

กิ้งกือมีผู้ล่า และปรสิตจำนวนมากโดยเฉพาะไร ส่วนรายงานเกี่ยวกับผู้ล่าของกิ้งกือในปัจจุบันยังมีน้อยมาก แต่วิวัฒนาการของการหลังสารคัดหลังป้องกันตัว การมีสีเตือนภัย (aposematic coloration) ในกิ้งกือกลุ่มต่าง ๆ และการมีต่อมที่สามารถสร้างสารคัดหลังป้องกันตัวได้ในบางสปีชีส์เป็นการบ่งบอกถึงการมีอยู่ของผู้ล่า

สัตว์หลายชนิด เช่น ตัวงู สัตว์เลื้อยคลาน นก แมงมุม สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (กบ) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมต่าง ๆ มีการล่ากิ้งกือเป็นอาหาร Weldon *et al.*, (2006) รายงานว่าโคอาตี (Coati) ล่ากิ้งกือขนาดใหญ่โดยการถูกิ้งกือกับพื้นเพื่อทำลายสารเคมีในกิ้งกือที่ออกมา ฟังพอนสามารถเหวี่ยงกิ้งกือผ่านขาหลังแล้วทุบกิ้งกือกับหินหรือพื้นแข็งเพื่อกินเป็นอาหาร กลุ่มแมลงก็สามารถล่ากิ้งกือได้เช่นเดียวกันเช่น มดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สกุล *Probolomyrmex* เป็นมดที่มีความสามารถในการล่ากิ้งกืออันดับ Polyxenida มวนพิษฆาต (assassin bug) *Lepidocoris elegans* ในแอฟริกาใต้ล่ากิ้งกือที่มีขนาดใหญ่กว่า ได้แก่กิ้งกือในวงศ์ Spirostreptidae นอกจากนี้กิ้งกือยังเป็นโฮสต์ของปรสิตชนิดต่าง ๆ โดยพบพวกหนอนตัวกลมมากที่สุด แมลงวันในวงศ์ Phaeomyiidae ดำรงชีวิตกึ่งปรสิต (parasitoids) เชื้อรา *Trichomyces* เป็น symbiotrophic fungi ในลำไส้กิ้งกือมักพบในทางเดินอาหารส่วนท้าย กิ้งกืออันดับ Julida บางสปีชีส์ได้รับผลกระทบจาก *Laboulbeniales* ซึ่งเป็นเชื้อราปรสิตภายนอกลำตัว นอกจากนี้กิ้งกือยังเป็นโฮสต์ตัวกลางของ *Macracanthorhynchus ingens* (Acanthocephala) ซึ่งพบในแรคคูนตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าแรคคูนอาจเป็นนักล่าตามธรรมชาติของกิ้งกือ (Alagesan, 2016; Sierwald & Bond, 2007)

2.8 หน้าที่ และความสำคัญของสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือ

สีเตือนภัยเป็นสิ่งแรกในการป้องกันตัวของกิ้งกือเพื่อเตือนผู้ล่าเกี่ยวกับการมีอยู่ของสารคัดหลังที่ใช้ป้องกันตัว วิธีการป้องกันตัวในลำดับถัดมาคือ การม้วนตัวเพื่อช่วยปกป้องส่วนที่อ่อนนุ่มของลำตัวโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายสุดของลำตัว และการหลั่งสารเคมีที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองเมื่อการป้องกันตัวด้วยการม้วนไม่เป็นผล (Stanković *et al.*, 2016) กิ้งกือจะหลั่งสารคัดหลังจากต่อม repugnatorial (ภาพที่ 3) ผ่านช่อง ozopore (ภาพที่ 4) ที่อยู่ด้านข้างของลำตัว ยกเว้นกิ้งกือใน 5 อันดับที่ไม่พบต่อมนี้ ได้แก่ Polyxenida, Sphaerotheriida, Glomeridesmida, Chordeumatida และ Siphoniulida สารคัดหลังนี้มีความเป็นพิษต่อแมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วย

นม ประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล แอลคาลอยด์ เทอร์พีน เบนโซควิโนน ไฮโดรควิโนน สารประกอบไซยาโนเจน สารประกอบอะลิฟาติก (aliphatic compound) เอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ester) และสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่ประกอบด้วยอะตอมของไนโตรเจน (heterocyclic nitrogen-containing compounds) แต่ยังมีกิ่งก้อบางกลุ่มที่ไม่มีอันตรายคือ กิ่งก้อในอันดับ Polyxenida เพราะไม่มีต่อม repugnatorial แต่มีขนเดี่ยวแข็งที่สามารถใช้ป้องกันผู้ล่าได้ นอกจากนี้มีการศึกษาที่ยืนยันว่ากลิ่นที่เกิดขึ้นจากสารประกอบเหล่านี้ใช้เพื่อป้องกันและขับไล่ผู้ล่าที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีความเป็นพิษต่อเชื้อรา แบคทีเรีย และพวกหนอนตัวกลม อย่างไรก็ตามสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางสปีชีส์ เช่น ลิงคาปูชิน และสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ใช้สารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งก้อเพื่อป้องกันยุงและเห็บ นอกจากนี้การขับถ่ายของกิ่งก้อกลุ่ม juliform ที่มีควิโนนปนอยู่สามารถดึงดูดด้วงและแมลงบางชนิดได้ (Shear, 2015; Sierwald & Bond, 2007)

นอกจากการมีสารคัดหลั่งเพื่อใช้ป้องกันและขับไล่ผู้ล่าแล้ว สารคัดหลั่งยังอาจมีหน้าที่อื่น ๆ โดย Shear, (2015) รายงานไว้ดังนี้

1. เป็นสารต้านจุลชีพ สารควิโนนและไฮโดรควิโนนมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ฟีนอลเป็นหนึ่งในสารกลุ่มแรกที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อและน้ำยาฆ่าเชื้อ เนื่องจากกิ่งก้อส่วนใหญ่อาศัยอยู่ตามพื้นดินซึ่งมีแบคทีเรียและเชื้อราอยู่มาก ดังนั้นคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งจึงมีความสำคัญต่อกิ่งก้อ อย่างไรก็ตามสารคัดหลั่งป้องกันตัวจะหลั่งออกมาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่คุกคาม แต่ไม่ได้หลั่งออกมาอยู่ตลอดเวลา จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวมีไว้เพื่อใช้ในการต้านจุลชีพหรือไม่

2. ใช้ป้องกันปรสิต กิ่งก้อเป็นโฮสต์ของไร และมีรายงานว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งก้อ *Narceus annularis* (Rafinesque, 1820) สามารถใช้ฆ่าไรที่เป็นปรสิตได้

3. เป็นฟีโรโมน (pheromone) มีข้อสังเกตว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวอาจใช้เป็นฟีโรโมน แต่เป็นการหลั่งสารคัดหลั่งจากกิ่งก้อเพศเมียเพื่อส่งสัญญาณถึงความไม่พร้อมในการสืบพันธุ์ในกิ่งก้อ *Niponia nodulosa* Verhoeff, 1931 ซึ่งเป็นกิ่งก้อกลุ่ม polydesmidan ไม่มีสารไซยาโนเจน แต่จะหลั่งสาร geosmin และ 1-octen-3-ol ซึ่งพบว่าเป็นสารที่ไม่สามารถไล่มดได้ และอาจทำหน้าที่เป็นฟีโรโมนเตือนภัยได้ (alarm pheromone)

2.9 ต่อม repugnatorial

ต่อม repugnatorial ของกิ่งก้อเป็นต่อมที่มีลักษณะคล้ายกับถุงที่เกิดจากการบุ่ม (invagination) ของผิวหนังลำตัว รวมทั้งเชื่อมต่อกับช่องเปิดออกทางผิวของลำตัว ภายในต่อมมีเซลล์ที่

สามารถผลิตสารคัดหลั่งที่มีความหลากหลาย และสามารถหลั่งออกมาผ่าน ozopore เมื่อเจอกับผู้ล่า หรือภัยคุกคาม โดย Eisner *et al.* (1978) ได้แบ่งต่อม repugnatorial ออกเป็น 3 ประเภทดังนี้

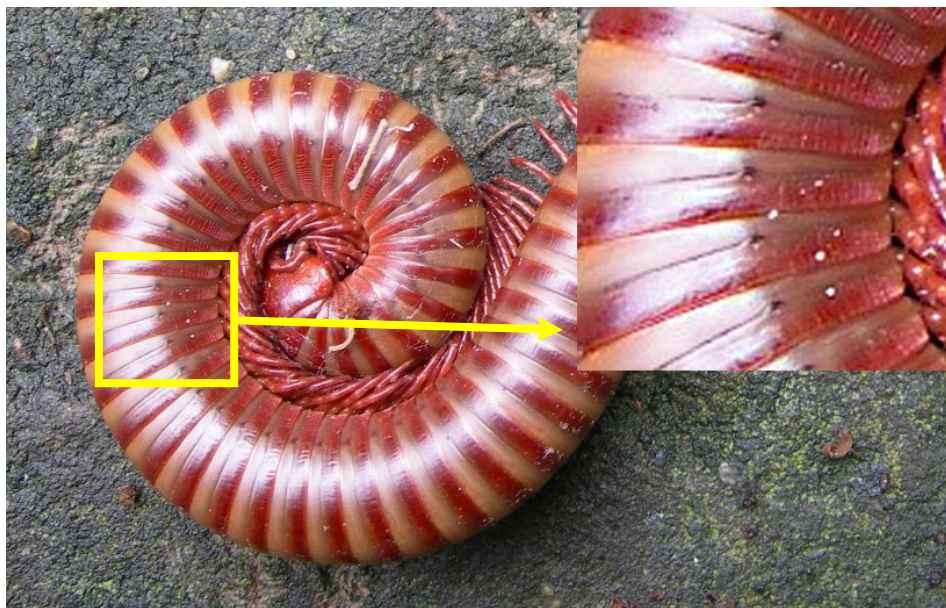
ประเภทที่ 1 พบเฉพาะกิ้งกือกระสุนในอันดับ Glomerida โดยมีต่อมอยู่ตามแนวข้างของ ปล้องลำตัว มีช่องเปิดอยู่บริเวณรอยต่อวงปล้อง ด้านกลางหลังลำตัวของปล้องที่ 4 - 11 เช่น ในกิ้งกือ *Glomeris marginata* (Villers, 1789) ต่อมประกอบด้วยแขนงยาวสองข้าง และมีจุดร่วมบริเวณช่อง เปิดด้านกลางหลังลำตัว ต่อมแต่ละข้างจะถูกห่อหุ้มด้วยกล้ามเนื้อบาง ๆ ซึ่งคาดว่าสารคัดหลั่งป้องกัน ตัวจะถูกขับออกมาโดยการหดตัวของกล้ามเนื้อรอบ ๆ บริเวณต่อม

ประเภทที่ 2 พบในกิ้งกืออันดับ Spirostreptida, Spirobolida, Julida, Polyzoniida, Callipodida และ Platydesmida ต่อมจะอยู่เป็นคู่มีช่องเปิดออกทางด้านข้างของลำตัว และในบาง อันดับจะมีช่องเปิดเริ่มตั้งแต่วงปล้องที่ 5 หรือ 6 ต่อมประกอบด้วยชั้นบาง ๆ ของเยื่อบุคิวติเคิล (cuticle) ที่เรียงอยู่ด้านในของวงปล้อง ซึ่งบ่งบอกได้ว่าต่อมเกิดจากการบวมของผิวลำตัว ต่อมส่วนใหญ่มีรูปร่างครึ่งวงกลม (ภาพที่ 3) แต่มีลักษณะยาวในกลุ่ม polyzoniid และจะแคบในกลุ่ม platydesmid ถัดจากต่อมจะมีท่อแคบ ๆ ที่เปิดออกสู่ ozopore โดยภายในท่อมมีลิ้นวาล์ว (pluglike valve) ซึ่งถูกควบคุมโดยกล้ามเนื้อที่ยึดติดกับชั้นคิวติเคิลของปล้องลำตัว ต่อมไม่ได้ถูกควบคุมจาก กล้ามเนื้อโดยตรง แต่การหลั่งสารเกิดจากการซึมผ่านเมื่อลิ้นวาล์วเปิดออก หรือการเบ่งซึ่งเห็นได้ชัด จากการหดตัวของกล้ามเนื้อที่อยู่ระหว่างวงปล้อง

ประเภทที่ 3 พบเฉพาะกิ้งกือตะเข็บอันดับ Polydesmida ต่อมมีการกระจายตามวงปล้อง แบบไม่ต่อเนื่อง พบมากที่สุดใวงปล้องที่ 5, 7, 9, 10, 12, 13 และ 15 ถึง 19 (ปกติลำตัวของกิ้งกือ polydesmidan มี 20 วงปล้องรวมถึงส่วนคอลลัม และส่วนท้ายลำตัวที่ไม่มีขา) ภายในต่อม ประกอบด้วยถุงเยื่อขนาดใหญ่คล้ายกับประเภทที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยไซยาโนเฟอร์ (cyanophore) (โดยปกติจะเป็น mandelonitrile หรือ benzoyl cyanamide) มีท่อขนาดสั้นเชื่อมต่อจากต่อม หรือ ที่สะสมสาร (reservoir) ไปยังอีกถุงที่เรียกว่า vestibule ระหว่างที่สะสมสาร กับ vestibule จะมีลิ้น วาล์วกันอยู่คล้ายกับที่อยู่ใกล้ ozopore ในประเภทที่ 2 ดังนั้นการหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวจึงขึ้นอยู่กับ ลิ้นวาล์วบริเวณนี้โดย ozopore จะเปิดอยู่ตลอดเวลา ลิ้นวาล์วนี้จะช่วยให้สารตั้งต้นจากที่สะสม สารหลั่งเข้าสู่ vestibule จากนั้นเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ จะปล่อยเอนไซม์ที่กระตุ้นการแยกตัวของ mandelonitrile benzaldehyde และ hydrogen cyanide Eisner *et al.*, (1978) ได้ตั้งสมมติฐาน ว่าเป็นการพัฒนาจากรูปแบบที่ 2 โดยเกิดจากการบวมของส่วน ozopore ทำให้ส่วนลิ้นวาล์วเข้าไป อยู่ด้านใน



ภาพที่ 3 ต่อม repugnatorial ของ *A. sculptus*



ภาพที่ 4 ช่อง ozopore ที่อยู่ด้านข้างของลำตัวของ *A. sculptus*

2.10 การหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ

Shear, (2015) ได้รายงานไว้ดังนี้

1. กิ้งกือกลุ่ม glomeridan (ต่อม repugnatorial ประเภทที่ 1) ส่วนใหญ่หลั่งสารกลุ่ม quinazolinone alkaloid ได้แก่ glomerin และ homoglomerin ผ่านออกมาทาง ozopore โดยการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ห่อหุ้มต่อม และไหลออกมาเป็นหยดอยู่ตามผิวลำตัวบริเวณด้านหลัง ปริมาณของสารที่หลั่งออกมาเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวมีค่าประมาณ 0.15 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้กิ้งกือยังใช้เวลาในการผลิตสารคัดหลั่งนานประมาณถึง 4 เดือน แสดงให้เห็นว่ากิ้งกือมีความสามารถในการหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวได้น้อยมากในรอบปี

2. กิ้งกือกลุ่ม juliform (ต่อม repugnatorial ประเภทที่ 2) ส่วนใหญ่หลั่งสารกลุ่มฟีนอล เบนโซควิโนน ไฮโดรควิโนน กรดไขมันของเอสเทอร์ และสารประกอบอะลิฟาติกอื่น ๆ ผ่านทาง ozopore โดยการซึมผ่านและกระจายออกมาจนทั่วผิวลำตัวของกิ้งกือ หรือมีการพ่นออกอย่างรวดเร็วคล้ายสเปรย์ การหลั่งสารคัดหลั่งโดยการพ่นแบบสเปรย์พบเฉพาะในกิ้งกือที่มีขนาดใหญ่ 2 อันดับคือ Spirobolida และ Spirostreptida สารคัดหลั่งนี้มีการกระจายได้ถึง 50 เซนติเมตร ซึ่งคาดว่าเกิดจากความดันที่เพิ่มมากขึ้นของ haemolymph หรือความดันจากกล้ามเนื้อบริเวณใกล้เคียง เนื่องจากบริเวณรอบต่อม repugnatorial ของกิ้งกือเหล่านี้ไม่พบกล้ามเนื้อ โดยกิ้งกือขนาดใหญ่ทั้งสองอันดับนี้อาจมีสารเบนโซควิโนนได้มากถึง 200 - 300 มิลลิกรัม แต่กิ้งกือขนาดเล็กมีเพียง 1 มิลลิกรัมเท่านั้น

3. กิ้งกือกลุ่ม polydesmidan (ต่อม repugnatorial ประเภทที่ 3) ส่วนใหญ่หลั่งสารกลุ่มไซยาโนเจน ฟีนอล และสารประกอบอะลิฟาติกอื่น ๆ ผ่านทาง ozopore หลังจากผ่านการกระตุ้นโดยเอนไซม์บริเวณ vestibule ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การผสมระหว่าง mandelonitrile หรือ benzoyl cyanamide กับเอนไซม์ จะทำให้เกิดไฮโดรเจนไซยาไนด์ กับเบนซาลดีไฮด์ (benzaldehyde) หรือกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ได้นานถึง 30 นาที แต่ก็มีรายงานว่ากิ้งกือ polydesmidan จากประเทศญี่ปุ่นบางสปีชีส์ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ จาก benzoyl cyanamide

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.11.1 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ในอันดับ Spirostreptida

Attygalle *et al.*, (1993) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวในกิ้งกือ *Floridobolus penneri* Causey, 1957 พบว่ามีองค์ประกอบหลัก 2 ชนิดคือ 2-methyl-1,4-benzoquinone และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และ

สารประกอบอีก 4 ชนิดคือ 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone, 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, 2,5-dimethyl-3-methoxy-1,4-benzoquinone และ 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone

Williams *et al.*, (1997) ได้รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ *Orthoporus antillanus* (Pocock, 1894) จากประเทศจาเมกา พบสารเบนโซควิโนนทั้งหมด 6 ชนิด มีสาร 2 ชนิดที่พบมาก ได้แก่ 2-methyl-1,4-benzoquinones และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone คิดเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ และเบนโซควิโนนที่พบอีก 4 ชนิด ได้แก่ 2,5-dimethyl-3-methoxy-1,4-benzoquinone, 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone, 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone และ 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในคนพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fonsecaea pedrosoi* ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ยีสต์ *Candida albicans* และ *Microsporium gypseum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.0, 30.0 และ 78.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช *Fusarium oxysporum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช *Xanthomonas campestris* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อหนอนตัวกลม *Strongyloides stercoralis* และ *Rotylenchus reniformis* โดยมีค่า LD₅₀ เท่ากับ 20.0 และ 28.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Deml & Huth, (2000) ได้รายงานถึงสารเบนโซควิโนน และไฮโดรควิโนนซึ่งเป็นสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือเขตร้อนในอันดับ Spirostreptida สองสปีชีส์คือ *Telodeinopus aoutii* (Demange, 1971) วงศ์ Spirostreptidae จากแอฟริกาและอีกหนึ่งสปีชีส์ในวงศ์ Harpagophoridae จากประเทศไทย พบสารที่สำคัญในสองสปีชีส์คือ 2-methoxy-3-methylbenzoquinone toluquinone และ toluhydroquinone เนื่องจากทั้งสองสปีชีส์อาศัยอยู่ในทวีปและระบบนิเวศที่แตกต่างกัน จึงแสดงให้เห็นว่าทั้งสองสปีชีส์อาจมีการเผชิญกับผู้ล่าที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่คล้ายคลึงกันเพราะมีขนาดตัวที่ใหญ่

Valderrama *et al.*, (2000) ได้รายงานถึงลิงคาปูชิน (capuchin monkey) ที่ใช้สารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือ *Orthoporus dorsovittatus* (Verhoeff, 1938) ทาตัวเพื่อป้องกันแมลง ซึ่งการวิเคราะห์ทางเคมีพบสารเบนโซควิโนน 2 ชนิด ได้แก่ 2-methyl-1,4-benzoquinone และ 2-methyl-3-methoxy-1,4 benzoquinone

Rodriguez *et al.*, (2018) ได้รายงานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครงสร้างของสารคัดหลั่งป้องกันตัวในกิ้งกือ พบว่าสารคัดหลั่งชนิดแรกที่กิ้งกือสร้างขึ้นในช่วงยุคไซลูเรียน (Silurian) อาจเป็นสารกลุ่มฟีนอล ซึ่งพบร่วมกันใน 6 อันดับได้แก่ Callipodida, Spirobolida, Spirostreptida, Julida, Stemmiulida และ Polydesmida และการสร้างสารกลุ่มเบนโซควิโนนอาจเกิดขึ้นในภายหลัง โดยกิ้งกือกลุ่ม Juliform สามารถสร้างสารคัดหลั่งเบนโซควิโนนที่มีโครงสร้างซับซ้อนมากที่สุด และยังสร้างสารที่ไม่ใช่ควิโนน เช่น เอสเทอร์ของกรดไขมัน และสารประกอบอะลิฟาติก นอกจากนี้ยังรายงานว่าพบสารเอทิลเบนโซควิโนน (ethyl-benzoquinone) ในวงศ์ Julidae, Rhinocricidae และ Spirostreptidae ซึ่งเป็นวงศ์ที่มีโครงสร้างของสารคัดหลั่งป้องกันตัวซับซ้อนมากที่สุด

2.11.2 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกืออันดับอื่น ๆ

Wood *et al.*, (2000) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารแอลคาลอยด์กลุ่มใหม่จากสารคัดหลั่งป้องกันตัว ของกิ้งกือ *Buzonium crassipes* Cook & Loomis, 1928 โดยการวิเคราะห์ GC-MS พบว่ามีสารประกอบ 3 ชนิดได้แก่ β -pinene (35 เปอร์เซ็นต์) limonene (6 เปอร์เซ็นต์) และแอลคาลอยด์ชนิดใหม่คือ buzonamine (59 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันผู้ล่ากับมด *Formica obscuripes* Forel, 1886 ที่ทำรัง และอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกิ้งกือ โดยการใส่สารคัดหลั่งป้องกันตัวเหล่านี้ลงไปบนหนอน *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 พบว่ามดจะใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการโจมตี และลากหนอนเข้าไปภายในรัง นอกจากนี้ยังรายงานว่ากิ้งกือที่มีน้ำหนัก 150 มิลลิกรัม สามารถสร้างสารคัดหลั่งป้องกันตัวได้ประมาณ 4 มิลลิกรัม

Vujisic *et al.*, (2014) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือในวงศ์ Blaniulidae พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัว ของ *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) และ *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897) เป็นสารผสมของเบนโซควิโนน ไฮโดรควิโนน และกรดโอเลอิกซึ่งพบครั้งแรกในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ สารประกอบสำคัญที่พบได้ทั้งสองสปีชีส์ คือ 2-methyl-1,4-benzoquinone (toluquinone) สารประกอบที่พบรองลงมาของ *N. kochii* คือ 2-methyl-3,4-(methylenedioxy) phenol และสารประกอบที่พบรองลงมาของ *C. phlepsii* คือ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone

Stanković *et al.*, (2016) ได้ศึกษาองค์ประกอบ และฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจาก *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) ซึ่งเป็นกิ้งกือที่มีขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Julidae และอันดับ Julida พบสารประกอบ 44 ชนิด ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มของควิโนน และเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยมีสัดส่วนของสารควิโนนต่อสารที่ไม่ใช่ควิโนนคือ 94.7 ต่อ 5.3 เปอร์เซ็นต์

ในเพศผู้ และ 87.3 ต่อ 12.7 เปอร์เซ็นต์ ในเพศเมีย และพบควิโนนสองชนิดที่โดดเด่นคือ 2-methyl-1,4-benzoquinone และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Listeria monocytogenes* 1/2a ได้มากที่สุดโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.20 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้มากที่สุดโดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.10 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ fluconazole

Jones *et al.*, (2018) ได้รายงานเกี่ยวกับสารเคมีของกิ่งกึ่งคือ Dalodesmidean จากแทสเมเนีย พบกิ่งกึ่ง 6 สปีชีส์ในสกุล *Gasterogramma* ที่สามารถผลิต (rel-3R,5S,7S)-3,5,7-trimethyl-2,8-decanedione เป็นอะไซคลิกคีโตน (acyclic ketone) คือ คีโตนชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated ketone) ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกึ่ง

Kuwahara *et al.*, (2017) ได้รายงานเกี่ยวกับการพบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide : H₂O₂) ครั้งแรกในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกึ่งกลุ่ม polydesmid พร้อมกับสารไฮโดรเจนไซยาไนด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารเบนโซอิลไซยาไนด์

Ilić *et al.*, (2019) ได้รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งกึ่งประจำถิ่นของบอลข่าน *Apfelbeckia insulpta* (L. Koch, 1867) ต่อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ยีสต์ 4 สายพันธุ์ และราสาย (filamentous fungi) 9 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อแบคทีเรีย ได้สูงโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.01 - 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MBC อยู่ในช่วง 0.0125 - 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายยีสต์ได้สูง โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.006 - 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.0125 - 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายราสายได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.10 - 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.20 - >1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Morales & Pedroso, (2019) ได้รายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งกึ่ง *Rhinocricus* sp. ซึ่งเป็นสปีชีส์เฉพาะถิ่น (Endemic species) ของประเทศคิวบา โดยได้ศึกษาจาก 6 กลุ่มประชากร พบสารประกอบควิโนนหลายชนิด สารประกอบส่วนใหญ่ที่พบร่วมกัน ได้แก่ 3, 4-dimethoxyphenol และยังพบส่วนประกอบที่สำคัญคือหมู่แทนที่ ส่วนใหญ่เป็นไฮโดรควิโนน (hydroquinone) 1,4-benzoquinone และแอลดีไฮด์ (aldehyde) และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fonsecaea pedrosoi* มากที่สุด

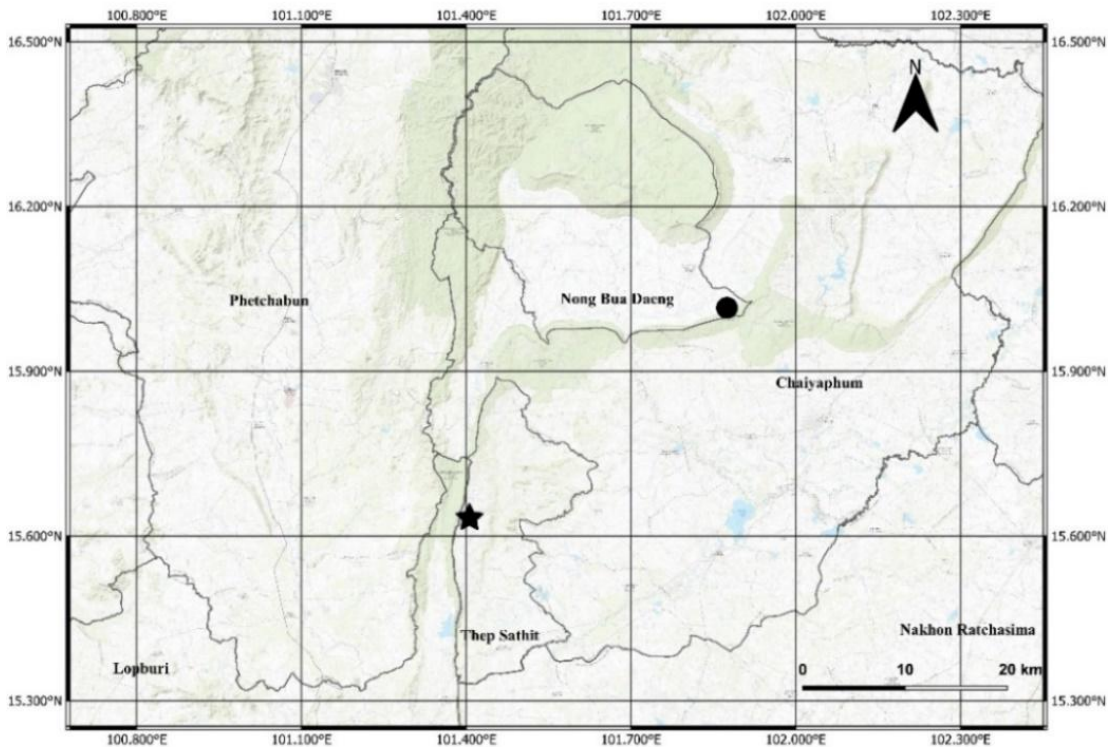
โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 27.0, 30.0, 44.0, 56.3, 68.0 และ 78.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างกิ้งกือ

เก็บตัวอย่างกิ้งกือยักษ *A. sculptus* ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน 2564 ในพื้นที่อำเภอเทพสถิต จังหวัดชัยภูมิ พิกัดทางภูมิศาสตร์ $15^{\circ} 38' 28''$ N $101^{\circ} 23' 20''$ E ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1.29 กิโลเมตร และอำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ พิกัดทางภูมิศาสตร์ $16^{\circ} 00' 01''$ N $101^{\circ} 52' 36''$ E ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1.13 กิโลเมตร (ภาพที่ 5) โดยเก็บตัวอย่างกิ้งกือไว้ในกล่องพลาสติก (ขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร และสูง 10 เซนติเมตร) ที่บรรจุเศษซากใบไม้ ซากพืช และฉีดย้ำน้ำให้มีความชุ่มชื้นอยู่ตลอดเวลา จากนั้นนำตัวอย่างกิ้งกือเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ห้องปฏิบัติการ SC2-304/2 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



★ อำเภอเทพสถิต ● อำเภอหนองบัวแดง

ภาพที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

3.2 การเก็บตัวอย่างสารคัดหลังป้องกันตัวจากกิ้งกือ

เก็บตัวอย่างสารคัดหลังจากกิ้งกือ โดยการผ่าและดึงต่อม repugnatorial ออกจากวงปล้อง ลำตัวของกิ้งกือโดยตรง นำมาตากให้แห้ง และชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปแช่ในตัวทำละลายเพื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันตามความมีขี้ได้แก่ 1) เฮกเซน (hexane) 2) เอทิลแอซีเตต (ethyl acetate) 3) เมทานอล (methanol) และ 4) สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่ไม่ผ่านการสกัด โดยสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้ทั้ง 4 นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ

3.3 การสกัดสารคัดหลังป้องกันตัว

นำต่อม repugnatorial ที่ได้จากข้อ 3.2 แช่ในตัวทำละลายที่เตรียมไว้ โดยแช่เรียงลำดับจากความมีขี้ต่ำไปหาความมีขี้สูงได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอซีเตต และเมทานอล โดยมีวิธีการดังนี้

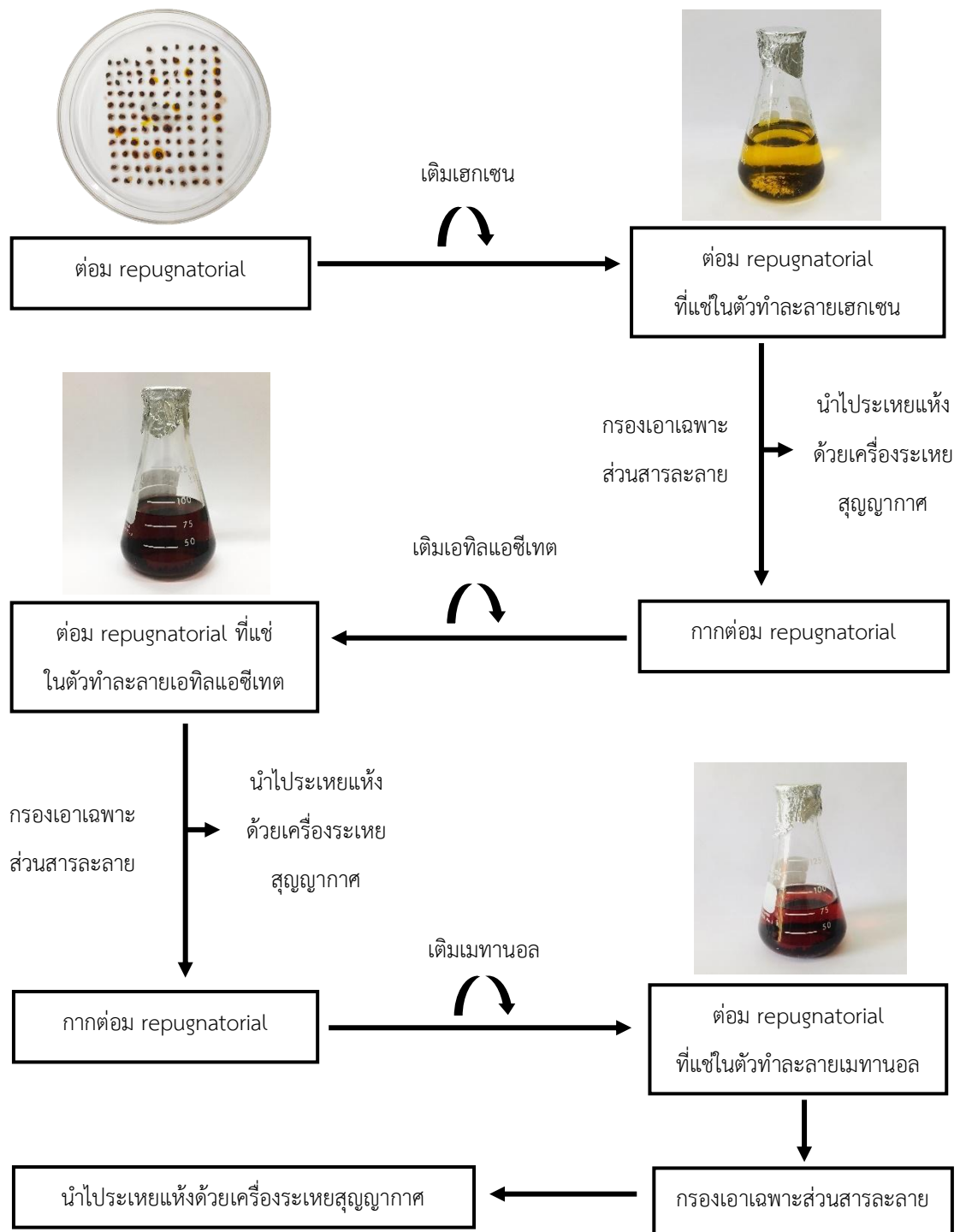
3.3.1 เทสารละลายเฮกเซนลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุต่อม repugnatorial ให้ท่วม ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 เทสารละลายเอทิลแอซีเตตลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุต่อม repugnatorial ที่ผ่านชั้นเฮกเซน ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลแอซีเตตเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 เทสารละลายเมทานอลลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุต่อม repugnatorial ที่ผ่านชั้นเอทิลแอซีเตต ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6)

3.3.4 นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นมาวิเคราะห์องค์ประกอบของสารคัดหลังป้องกันตัวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) และทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ

ขั้นตอนการสกัดสารจากต่อม repugnatorial



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการสกัดสารจากต่อม repugnatorial

3.4 การเตรียมสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

ใช้วิธีการเก็บเช่นเดียวกับข้อ 3.2 แต่ไม่นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งสารคัดหลังที่ได้จากต่อมโดยตรงนี้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ และสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงจะถูกนำไปละลายด้วยเมทานอล (Stanković *et al.*, 2016) เพื่อนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี

3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลังป้องกันตัว

3.5.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารคัดหลังป้องกันตัวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี

นำสารสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลาย และสารคัดหลังที่ได้จากต่อมโดยตรงวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS รุ่น QP 2010 Shimadzu ที่ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยมีสภาวะของเครื่อง GC-MS ดังนี้ (Arab *et al.*, 2016)

- Injection volume : 1 μ L
- Column : Rtx®-5MS (Restek, 30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m)
- Carrier gas : Helium, 1 mL/min
- Injector temperature : 250 $^{\circ}$ C
- Programmed temperature : 70 $^{\circ}$ C, hold for 2 min, ramped to 250 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C/min then to at 280 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C and finally hold for 16 min
- Ion source temperature : 200 $^{\circ}$ C
- Interface temperature : 250 $^{\circ}$ C
- MS mode : Scan
- m/z range : 40-500 amu

จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารโดยการเปรียบเทียบกับค่า retention index (RI) โดยคำนวณได้จาก retention time สารมาตรฐาน n-alkanes (C7 - C30) ที่วิเคราะห์ด้วย GC ภายใต้สภาวะเดียวกันกับตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับ National Institute of Standards and Technology (NIST 14) และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานสารประกอบไว้ก่อนหน้า (Bodner *et al.*, 2016; Stanković *et al.*, 2016; Vujisić *et al.*, 2011)

3.6 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ

นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นไปละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (Ansel *et al.*, 1969; Wadhvani *et al.*, 2009) ให้ได้ความเข้มข้น 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง โดยดึงต่อม repugnatorial เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion และใช้ในการทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ต่อไป

3.7 เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบ และการเตรียมเชื้อ

นำสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus* มาทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพกับเชื้อก่อโรคในมนุษย์ โดยทดสอบกับยีสต์ (yeast) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 และ *Salmonella* Typhi ATCC16122 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อมีดังนี้

3.7.1 ขีดเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2 ขีดยีสต์ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

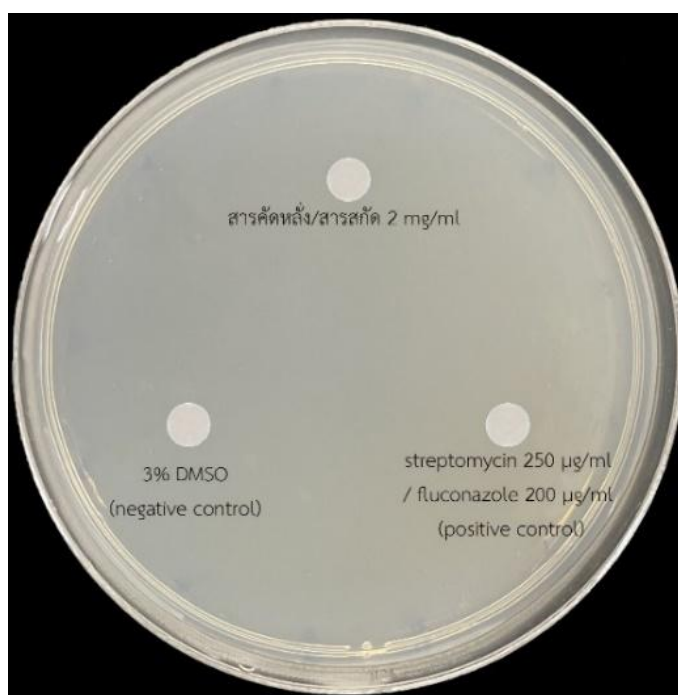
เมื่อโคโลนีของเชื้อเจริญบนจานอาหาร นำมาเตรียมเชื้อโดยชุดโคโลนีของแบคทีเรีย และยีสต์ ลงในสารละลาย normal saline solution นำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/ml) โดยการนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.08 - 0.1

3.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ

3.8.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลังป้องกันตัวของ *A. sculptus* เบื้องต้น

ทดสอบโดยใช้วิธี paper disc diffusion ซึ่งเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพในเบื้องต้น โดยใช้ cotton swab จุ่มในสารละลายเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร MHA และ SDA ทั้งให้ผิวอาหารแห้ง จากนั้นหยดสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนกลางแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวางบนผิวอาหาร MHA และ SDA โดยใช้ DMSO ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative control) ยาปฏิชีวนะ streptomycin 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sutthisa & Chaiyacham, 2022) เป็นตัวควบคุมทางบวก (positive control) สำหรับแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะ fluconazole 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Suwanchatree *et al.*, 2011) เป็นตัวควบคุมทางบวกสำหรับยีสต์ (ภาพที่ 7) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย

ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วย nonparametric test โดยทดสอบด้วยวิธี Jonckheere-Terpstra test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลังป้องกันตัวด้วยวิธี paper disc diffusion

3.8.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC)

เตรียมอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud dextrose agar broth (SDB) สำหรับยีสต์ สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่เจือจางด้วย MHB หรือ SDB และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาทดสอบโดยใช้การเจือจางแบบ two fold dilutions ทำให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.0 - 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่มีความเข้มข้น 2.0 - 0.001 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ SDB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุมที่ 1-12 ของ 96 well plate เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารคัดหลังป้องกันตัว 4.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 จากนั้นดูดสารละลายในหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 2 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 12 จากนั้นดูดสารผสมทิ้งไป 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเชื้อทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1-12 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดความขุ่นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อ่านผลโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลชีพ หรือไม่มี ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่าความเข้มข้นของสารในหลอดทดลองนั้นจะถูกกำหนดให้เป็นค่า MIC โดยมีชุดควบคุมทางลบเป็นอาหาร MHB หรือ SDB และเชื้อทดสอบแต่ละชนิด อย่างละ 100 ไมโครลิตร ชุดควบคุมทางบวกสำหรับแบคทีเรีย คือ ยาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 250 - 0.122 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมทางบวกสำหรับยีสต์ คือ ยาปฏิชีวนะ fluconazole ความเข้มข้น 200 - 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.3 ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)

การหาค่า MBC และ MFC ทำต่อเนื่องจากการหาค่า MIC โดยนำ 96 well plate ที่ได้จากการหาค่า MIC ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ นำมาซัดลงบนอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร SDA สำหรับยีสต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสกัดความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ โดยจะไม่ปรากฏการเจริญของแบคทีเรีย หรือยีสต์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ คำนี้นจะถูกกำหนดให้เป็นค่า MBC ในแบคทีเรีย และค่า MFC ในยีสต์ที่นำมาทดสอบ

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

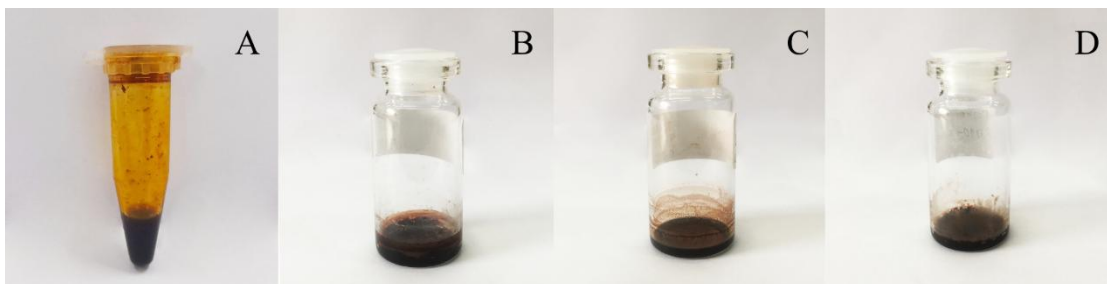
4.1 ผลการสกัดสารคัดหลังป้องกันตัว

ต่อม repugnatorial น้ำหนักแห้ง 1.1299 กรัม ดึงมาจากกิ่งก้อยักษ์ *A. sculptus* จำนวน 7 ตัว ซึ่งสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันตามลำดับความมีขี้้ว จากความมีขี้้วน้อยไปหาความมีขี้้วมาก ได้แก่ เฮกเซน เอทิลเอซีเทต และเมทานอล จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ โดยสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีปริมาณมากที่สุด คือ 9.52 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดในชั้นเมทานอล 8.07 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดในชั้นเอทิลเอซีเทตคิดเป็น 6.30 เปอร์เซ็นต์ รวมสารสกัดที่สกัดได้จากต่อมแห้ง 23.89 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางกายภาพของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เหมือนกันคือ มีลักษณะขุ่นเหนียวสีน้ำตาลแดงเข้ม แตกต่างจากสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่เป็นของเหลวสีน้ำตาลเหลือง (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 2 ปริมาณของสารที่สกัดได้ (yield) จากต่อม repugnatorial ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลเอซีเทต และเมทานอล

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละสารสกัดหยาบ (% yield)
เฮกเซน	0.1076	9.52
เอทิลเอซีเทต	0.0712	6.30
เมทานอล	0.0912	8.07
รวม	0.27	23.89

*ค่าร้อยละของสารสกัดหยาบคิดจากน้ำหนักแห้งของต่อม repugnatorial 1.1299 กรัม



ภาพที่ 8 A. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง B. สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน C. สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเอทิลเอซีเทต และ D. สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอล

4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ *A. sculptus* ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี

4.2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล ได้ผลดังนี้

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ *A. sculptus* พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 20 ชนิด (ตารางที่ 3) ดังนี้

องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง พบสารคัดหลั่งป้องกันตัวประกอบด้วยสารประกอบที่สามารถระเหยได้ 10 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุด ได้แก่ 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone 58.58 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 2-methyl-1,4-benzoquinone 15.71 เปอร์เซ็นต์ 1,4-benzoquinone 8.22 เปอร์เซ็นต์ และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone 6.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารประกอบทั้ง 4 ชนิดนี้คิดเป็น 88.78 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบอื่น ๆ อีก 7 ชนิด ได้แก่ 3,4-dimethoxyphenol, 2-methylhydroquinone, hexyl pentadecanoate, 2-methylhydroquinone, 2-methoxy-3-methylhydroquinone, 2-methoxy-5-methylhydroquinone, 2-methyl-3,4-methylenedioxyphenol โดยพบ 3.08, 2.08, 1.84, 0.48, 0.36 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารที่ไม่สามารถระเหยได้ 1 ชนิด คือสารลำดับที่ 1 โดยพบ 3.14 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดชั้นเฮกเซน พบสารประกอบที่สามารถระเหยได้ 3 ชนิด โดยพบสาร hexyl pentadecanoate มากที่สุด 80.02 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ hexyl octadecanoate 7.04 เปอร์เซ็นต์ และ hexyl hexadecanoate 1.83 เปอร์เซ็นต์ สารที่ไม่สามารถระเหยได้ 3 ชนิด คือสารลำดับที่ 2, 4 และ 6 โดยพบ 2.37, 6.05 และ 2.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต พบสารประกอบที่สามารถระเหยได้ 3 ชนิด โดยพบสาร hexyl pentadecanoate (ลำดับ 17) มากที่สุด 54.87 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ 2-methoxy-1,4-benzoquinone 40.23 เปอร์เซ็นต์ และ hexyl pentadecanoate (ลำดับ 18) 4.90 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดชั้นเมทานอล พบสารประกอบที่สามารถระเหยได้ 1 ชนิด โดยพบสาร hexyl pentadecanoate มากที่สุด 87.06 เปอร์เซ็นต์ สารที่ไม่สามารถระเหยได้ 3 ชนิด คือสารลำดับที่ 1, 7 และ 16 โดยพบ 40.33, 1.00 และ 0.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งก้อ *A. sculptus* ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ	ชนิดสาร	RI*/ RI อ้างอิง**	% Area			
			Fresh secretion	Hexane extract	Ethyl Acetate extract	Methanol extract
1	Not identified	794	3.14	-	-	40.33
2	Not identified	875	-	2.37	-	-
3	1,4-Benzoquinone	913/917	8.22	-	-	-
4	Not identified	943	-	6.05	-	-
5	Not identified	1009	-	2.69	-	-
6	2-Methyl-1,4-benzoquinone	1116	15.17	-	-	-
7	Not identified	1154	-	-	-	0.35
8	2-Methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone	1189/1191	6.07	-	-	-
9	2-Methoxy-1,4-benzoquinone	1235	-	-	40.23	-
10	3,4-Dimethoxyphenol	1279	3.08	-	-	-
11	2,3-Dimethoxy-1,4-benzoquinone	1324/1322	58.58	-	-	-
12	2-Methylhydroquinone	1334/1341	1.84	-	-	-
13	2-Methoxy-5-methylhydroquinone	1350/1350	0.36	-	-	-
14	2-Methyl-3,4-methylenedioxyphenol	1392/1390	0.24	-	-	-
15	2-Methoxy-3-methylhydroquinone	1428/1425	0.48	-	-	-

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ *A. sculptus* ด้วยเครื่อง GC-MS (ต่อ)

ลำดับ	ชนิดสาร	RI*/ RI อ้างอิง**	% Area			
			Fresh secretion	Hexane extract	Ethyl acetate extract	Methanol extract
16	Not identified	1822	-	-	-	1.00
17	Hexyl pentadecanoate ^a	2228/2223	2.08	80.02	54.87	58.33
18	Hexyl pentadecanoate ^a	2264/2266	-	-	4.90	-
19	Hexyl hexadecanoate	2390/2386	-	1.83	-	-
20	Hexyl octadecanoate	2596/2582	-	7.04	-	-

หมายเหตุ : * หมายถึง ค่า RI ที่ได้จากสารมาตรฐาน n-alkanes (C7 - C30) ที่วิเคราะห์ด้วย GC ภายใต้สภาวะเดียวกันกับตัวอย่าง

** หมายถึง ค่า RI ที่เปรียบเทียบจาก Bodner *et al.*, 2016; Stanković *et al.*, 2016; Vujisić *et al.*, 2011

^a หมายถึง ไอโซเมอร์ของ hexyl pentadecanoate

- หมายถึง ไม่พบสารชนิดนั้น ๆ

4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ *A. sculptus* เบื้องต้น

ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพด้วยสารสกัดในแต่ละชั้นที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 และ *Salmonella* Typhi ATCC16122 และยีสต์ (yeast) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ในการทดสอบใช้ DMSO ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative control) และตัวควบคุมทางบวก (positive control) ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ streptomycin 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะ fluconazole 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์ มีผลการทดสอบดังนี้

สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 โดยสารสกัดชั้นเฮกเซนมีบริเวณยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 สายพันธุ์เท่ากับ 9.40, 12.30 และ 11.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.60, 14.00 และ 13.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดชั้นเมทานอลมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.70, 7.00 และ 6.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 76.60, 85.00 และ 85.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยาปฏิชีวนะ streptomycin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.20, 16.20 และ 1.96 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 9, 10 และ 11)

ในส่วนของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเมทานอลไม่เกิดบริเวณยับยั้ง แต่สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีบริเวณยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* และ *Salmonella* Typhi ATCC16122 เท่ากับ 71.80, 69.30, 63.70, และ 69.30 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งมากกว่ายาปฏิชีวนะ streptomycin ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.80, 12.10, 10.10 และ 6.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 12, 13, 14 และ 15)

ฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเมทานอลมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 85.00, 10.80, 9.10 และ 7.00 มิลลิเมตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่ายา fluconazole ที่มีค่า บริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.80 มิลลิเมตร ในกรณีของ *C. albicans* ATCC10231 สารสกัดทั้ง 3 ชนิด และยาปฏิชีวนะ fluconazole ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง แต่พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 85.00 มิลลิเมตร (ภาพที่ 16 และ 17) นอกจากนี้ยังพบบริเวณยับยั้ง 85.00 มิลลิเมตร ต่อเชื้อ *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654, *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ซึ่งเท่ากับขนาดของจานเพาะเชื้อ (Petri dish) หมายถึงการที่สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อภายในจานเพาะเชื้อได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่พบการเจริญของเชื้อในจานเพาะเชื้อ

การวิเคราะห์ทางสถิติ nonparametric test ด้วยวิธี Jonckheere-Terpstra test พบว่าสารที่ใช้ทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ยา streptomycin สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ สารสกัดชั้นเฮกเซน และสารสกัดชั้นเมทานอล ตามลำดับ (ยกเว้นสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเฮกเซนที่มีบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. cereus* ไม่แตกต่างกัน) เช่นเดียวกันในแบคทีเรียแกรมลบ และ *C. albicans* ATCC10231 สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้มากกว่ายา streptomycin นอกจากนี้ใน *C. albicans* สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ สารสกัดชั้นเฮกเซน ตามลำดับ ส่วนสารสกัดชั้นเมทานอล และยา streptomycin มีบริเวณยับยั้งต่อ *C. albicans* ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดชันเฮกเซน สารสกัดชันเอทิลแอสีเทต สารสกัดชันเมทานอล และสารสกัดเหลือง
ป้องกันตัวที่ได้จากต่อม โดยตรงด้วยวิธี paper disc diffusion

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ± SD					
	3% DMSO	Hexane extract (2 mg/ml)	Ethyl acetate extract (2 mg/ml)	Methanol extract (2 mg/ml)	secretion	Streptomycin (250 µg/ml)
<i>B. cereus</i>	0	9.30 ± 0.05 ^b	9.70 ± 0.05 ^b	6.70 ± 0.05 ^a	76.60 ± 0.05 ^d	13.20 ± 0.04 ^c
<i>S. aureus</i>	0	12.30 ± 0.05 ^b	14.00 ± 0.05 ^c	7.00 ± 0.08 ^a	85.00 ± 0.00 ^{*e}	19.60 ± 0.38 ^d
<i>S. aureus</i> DMST20654	0	11.60 ± 0.05 ^b	13.00 ± 0.09 ^c	6.30 ± 0.05 ^a	85.00 ± 0.00 ^{*e}	16.20 ± 0.06 ^d
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	71.80 ± 0.10 ^b	14.80 ± 0.34 ^a
<i>E. coli</i> ATCC25922	0	0	0	0	69.30 ± 0.07 ^b	12.10 ± 0.03 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	63.70 ± 0.20 ^b	10.10 ± 0.03 ^a
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	0	0	0	0	69.30 ± 0.09 ^b	6.20 ± 0.04 ^a

ค่าเฉลี่ยและค่า SD

ค่าเฉลี่ยและค่า SD

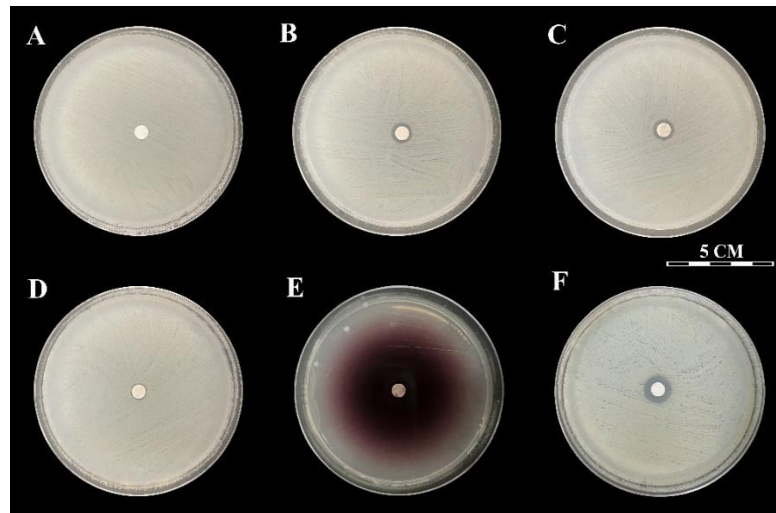
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดขึ้นเฮกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลแอซีเทต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงด้วยวิธี paper disc diffusion (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) + SD				
	3% DMSO	Hexane extract (2 mg/ml)	Ethyl acetate extract (2 mg/ml)	Methanol extract (2 mg/ml)	secretion Fluconazole (200 µg/ml)
<i>C. albicans</i>	0	10.80 ± 0.13 ^b	9.10 ± 0.09 ^b	7.00 ± 0.05 ^a	85.00 ± 0.00 ^{*c}
<i>C. albicans</i> ATCC10231	0	0	0	0	85.00 ± 0.00 [*]

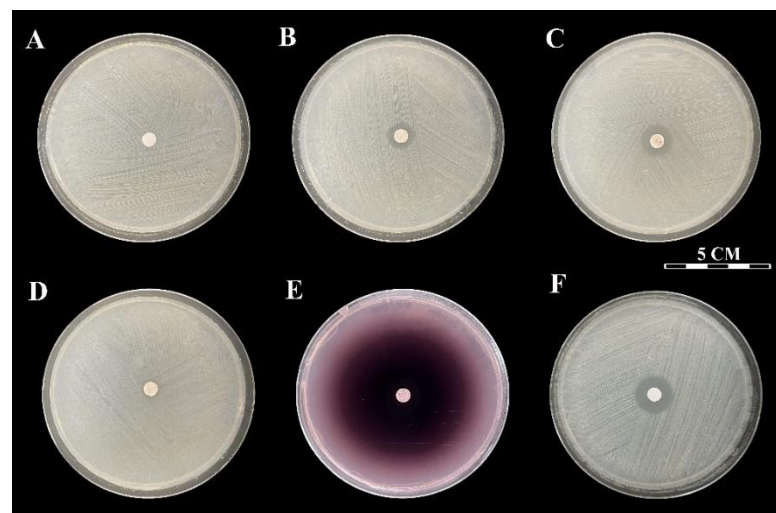
หมายเหตุ : 0 หมายถึง ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

* หมายถึง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อภายในจานเพาะเชื้อได้ทั้งหมด (85.00 มิลลิเมตร)

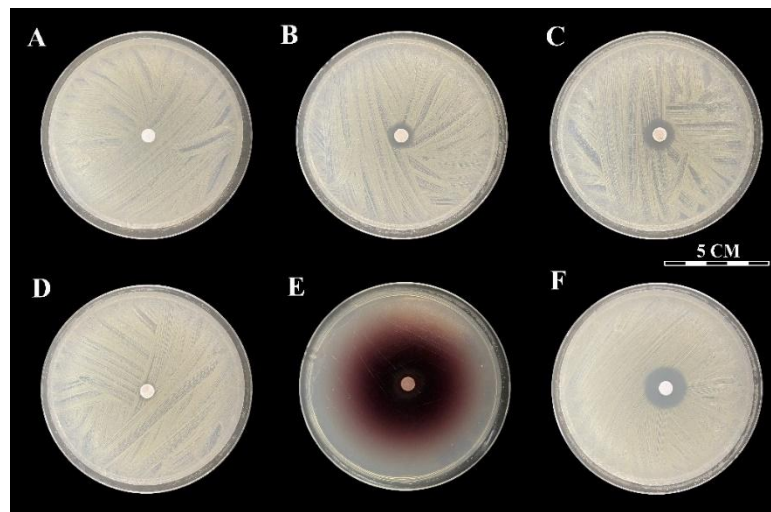
a, b, c, d และ e ที่แตกต่างกันในแนวนอนหมายถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Jonckheere-Terpstra test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



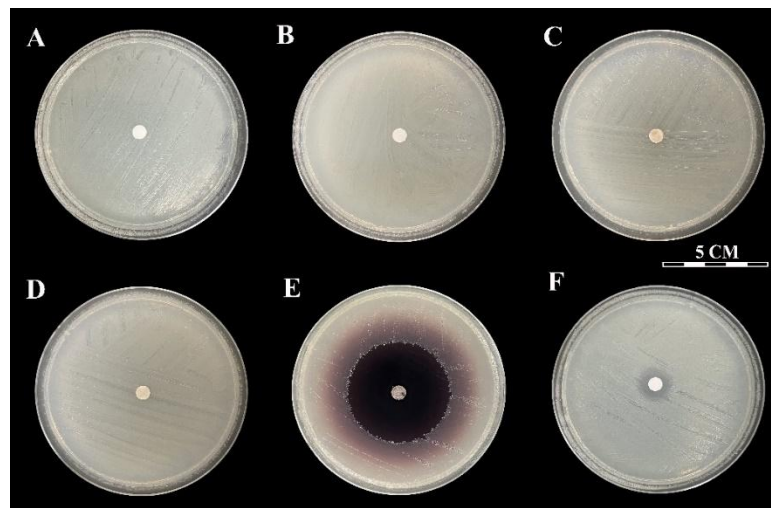
ภาพที่ 9 ผลการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



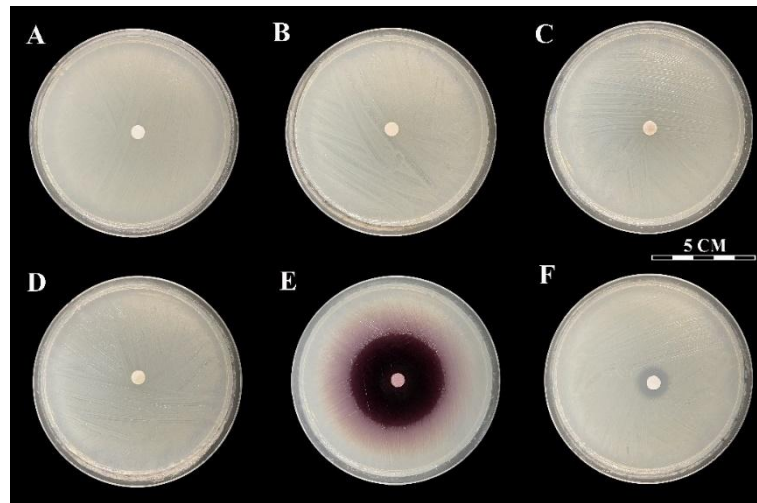
ภาพที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



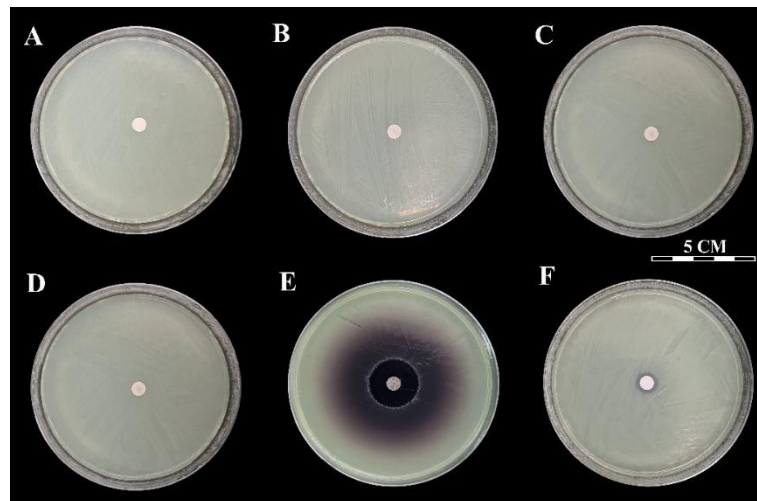
ภาพที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST20654 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



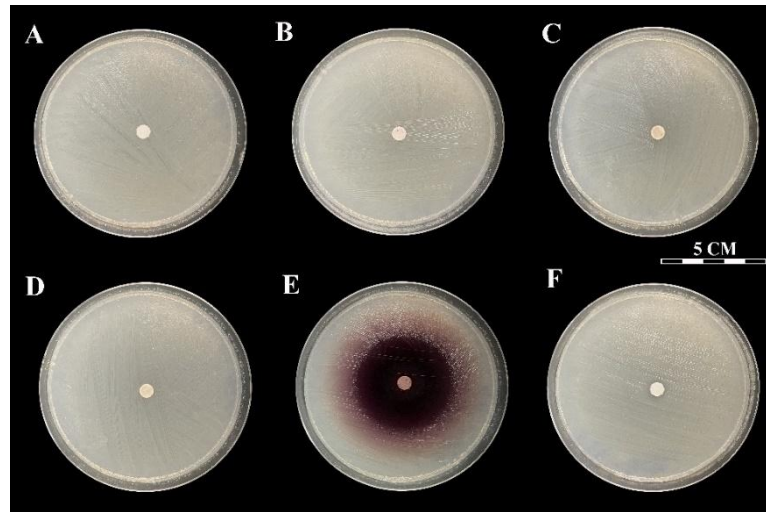
ภาพที่ 12 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



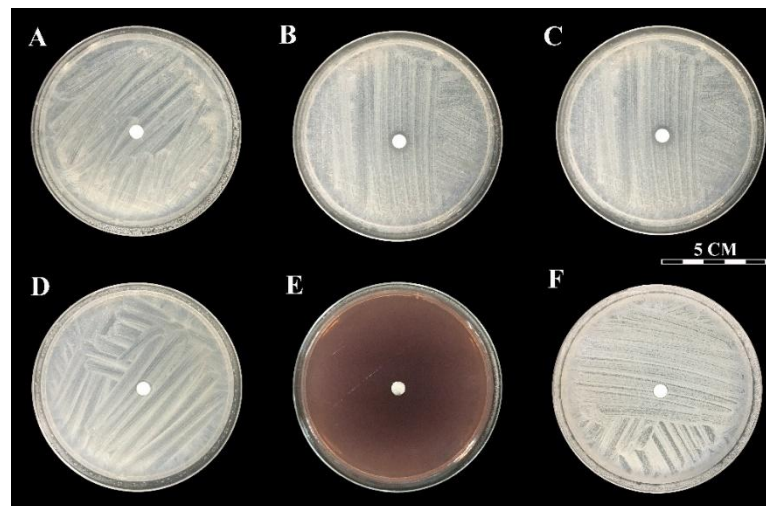
ภาพที่ 13 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



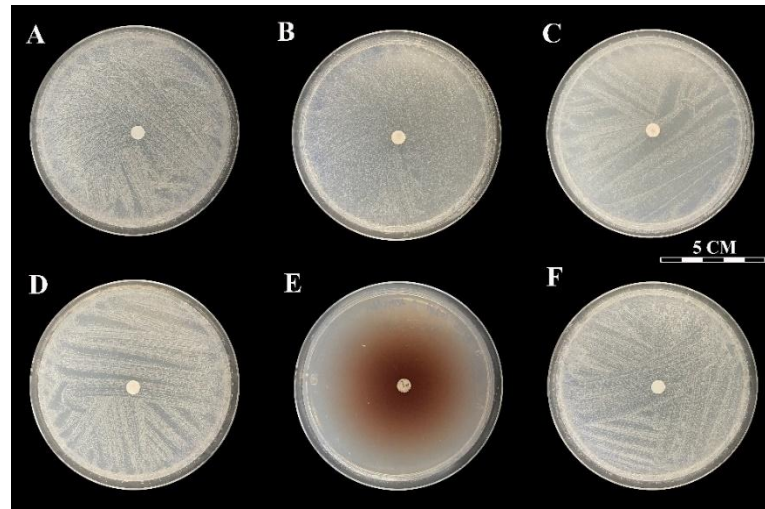
ภาพที่ 14 ผลการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhi* ATCC16122 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมนทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมนทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา fluconazole (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC10231 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา fluconazole (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.2 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC)

จากการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และยีสต์ *C. albicans* และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด จึงนำมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654 และ *C. albicans* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.50, 0.50, 0.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเมทานอล ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ มีค่า MIC เท่ากับ 0.50, 0.25, 0.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า MIC เท่ากับ 1.00, 1.00, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่ายาปฏิชีวนะ streptomycin และ fluconazole ที่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 31.25 - 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ผลการทดสอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.00195 เปอร์เซ็นต์ (v/v) รองลงมาได้แก่ *C. albicans* ATCC10231, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. aureus* DMST20654, *E. coli*, *E. coli* ATCC25922, *Salmonella* Typhi ATCC16122 และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0156, 0.0625, 0.0625, 0.0625 และ 0.250 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin สารคัดหลั่งป้องกันตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าเนื่องจากมีค่า MIC ที่สูงกว่า แต่ในกรณีของยีสต์ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 สารคัดหลั่งป้องกันตัวมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ fluconazole เนื่องจากมีค่า MIC น้อยกว่า (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซิเตท สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

เชื้อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC)					
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Streptomycin (µg/ml)	
<i>B. cereus</i>	0.50	0.50	1.00	0.0156	62.5	
<i>S. aureus</i>	0.50	0.25	1.00	0.0078	31.25	
<i>S. aureus</i> DMST20654	0.50	0.50	1.00	0.0156	62.5	
แบคทีเรียแกรมลบ						
<i>E. coli</i>	-	-	-	0.0625	62.5	
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	0.0625	62.5	
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	0.250	125	
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	-	-	-	0.0625	125	
เชื้อรา						

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอสซิเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC)				
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Fluconazole (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	2.00	2.00	2.00	0.0019	200
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	-	-	0.0039	200

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีการทดสอบ

4.3.3 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และยีสต์ *C. albicans* และสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด จึงได้นำมาทดสอบเพื่อหาค่า MBC หรือ MFC พบว่าสารสกัดขึ้นเฮกเซน มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, และ *S. aureus* DMST20654 โดยมีค่า MBC อยู่ที่ 2.00, 2.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารสกัดขึ้นเอทิลเอซีเทตที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่า MBC อยู่ที่ 2.00, 2.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin ที่มีค่า MBC อยู่ในช่วง 125 - 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนี้สารสกัดขึ้นเฮกเซน และเอทิลเอซีเทต ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *C. albicans* ในการทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับสารสกัดขึ้นเมทานอล ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654 และ *C. albicans* (ตารางที่ 6)

ผลการทดสอบของสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงพบว่า มีฤทธิ์ในการทำลาย *C. albicans* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MFC เท่ากับ 0.0039 เปอร์เซ็นต์ (v/v) รองลงมาได้แก่ *C. albicans* ATCC10231, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* DMST20654, *E. coli* ATCC25922, *Salmonella* Typhi ATCC16122 และ *P. aeruginosa* มีค่า MBC/MFC เท่ากับ 0.0078, 0.125, 0.125, 0.250, 0.250, 0.250, 0.250 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin สารสกัดหลังป้องกันตัวมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าเนื่องจากมีค่า MBC ที่สูงกว่า แต่ในกรณีของยีสต์ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 (ภาพที่ 18) สารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อราได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ fluconazole เนื่องจากมีค่า MFC น้อยกว่า (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดขึ้นเฮกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลแอซีเตต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

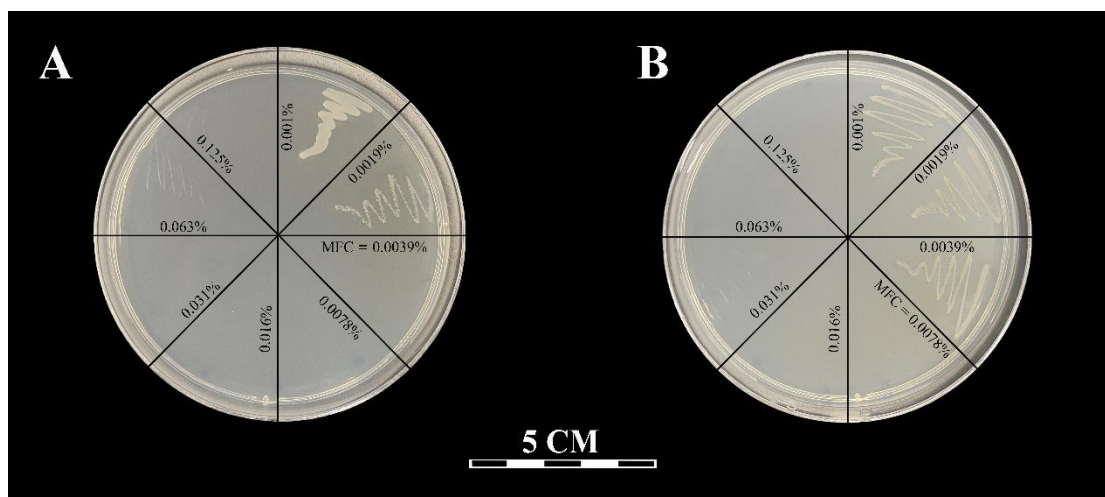
	เชื้อทดสอบ					
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Streptomycin (µg/ml)	
<i>B. cereus</i>	2.00	2.00	>2.00	0.125	250	
<i>S. aureus</i>	2.00	2.00	>2.00	0.0625	125	
<i>S. aureus</i> DMST20654	2.00	2.00	>2.00	0.125	250	
<i>E. coli</i>	-	-	-	0.250	125	
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	0.250	250	
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	0.500	250	
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	-	-	-	0.250	250	

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดขึ้นเฮกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลเอซีเตต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง (ต่อ)

เชื้อทดสอบ		ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) หรือเชื้อรา (MFC)			
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Fluconazole (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	>2.00	>2.00	>2.00	0.0039	>200
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	-	-	0.0078	>200

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีการทดสอบ

> หมายถึง ความเข้มข้นมากกว่าจำนวนนั้น ๆ อาจสามารถทำลายเชื้อได้



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่สามารถทำลายยีสต์ได้ โดยมีค่า MIC ต่อ A. *C. albicans* เท่ากับ 0.0039 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ B. *C. albicans* ATCC10231 เท่ากับ 0.0078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการดำเนินการวิจัย

5.1 การสกัดสารคัดหลังป้องกันตัว

ต่อม repugnatorial จากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus* 7 ตัว มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.1299 กรัม สามารถนำมาสกัดสารได้ทั้งหมด 0.27 กรัม คิดเป็น 23.89 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีปริมาณมากที่สุด คือ 9.52 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือสารสกัดในชั้นเมทานอล 8.07 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดในชั้นเอทิลแอสีเทตคิดเป็น 6.30 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะทางกายภาพเหมือนกันคือ หนืดข้นมีสีน้ำตาลแดงเข้ม ซึ่งแตกต่างจากสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่เป็นของเหลวสีน้ำตาลเหลือง ซึ่งคาดว่าเป็นสีของเบนโซควิโนน (Shear, 2015)

5.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือ *A. sculptus*

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลังป้องกันตัวของ *A. sculptus* พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 20 ชนิด ซึ่งหลายชนิดพบในกิ้งกือกลุ่ม Juliformia (อันดับ Julida, Spirobolida และ Spirostreptida)

สารประกอบที่พบในสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงของ *A. sculptus* ที่สามารถระบุได้ มี 10 ชนิด โดยพบมากที่สุด คือ 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone 58.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารประกอบนี้มีการรายงานพบในปริมาณที่น้อยในกิ้งกือ Juliformia สปีชีส์อื่น ๆ โดยสารประกอบหลักที่พบในกิ้งกือ Juliformia สปีชีส์อื่น ๆ คือ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone แต่พบใน *A. sculptus* เพียง 6.07 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบที่พบรองลงมา คือ 2-methyl-1,4-benzoquinone 15.17 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบควิโนนชนิดอื่น ๆ ได้แก่ 1,4-benzoquinone, 2-methylhydroquinone, 2-methoxy-5-methylhydroquinone และ 2-methoxy-3-methylhydroquinone ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาในกิ้งกือ Juliformia สปีชีส์อื่น ๆ (Eisner *et al.*, 1978; Deml and Huth, 2000; Vujisić *et al.*, 2011, 2014; Shear, 2015; Bodner *et al.*, 2016; Stanković *et al.*, 2016; Morales and Pedroso, 2019) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบฟีนอล คือ 3,4-dimethoxyphenol ซึ่งเป็นการรายงานการพบสารประกอบนี้เป็นครั้งแรกในอันดับ Spirostreptida และเป็นครั้งที่สองในกลุ่ม Juliformia โดยก่อนหน้านี้เคยมีการพบสารประกอบนี้ในกิ้งกือสกุล *Rhinocricus* (อันดับ Spirobolida) (Morales and Pedroso, 2019; Morales *et al.*, 2022) และ 2-methyl-3,4-methylenedioxyphenol

ที่มีการรายงานการพบในสปีชีส์อื่น ๆ (Vujisic' *et al.*, 2014; Ilic' *et al.*, 2018) ซึ่งสารประกอบฟีนอล เป็นสารกลุ่มแรกของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือจากยุคไซลูเรียน (Silurian) (Rodriguez *et al.*, 2018) นอกจากนี้สารประกอบอีกกลุ่มหนึ่งที่พบในสารคัดหลั่งป้องกันตัวได้จากต่อมโดยตรงของ *A. sculptus* คือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน hexyl pentadecanoate ซึ่งมีการรายงานการพบเอสเทอร์ของกรดไขมันในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ *Juliformia* ในสปีชีส์อื่น ๆ (Shimizu *et al.*, 2012; Stanković *et al.*, 2016; Ilic' *et al.*, 2018) และสันนิษฐานว่าสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่ควิโนน อาจทำหน้าที่ส่งเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ โดยเป็นตัวทำลายหรือช่วยในการแพร่กระจายของสารคัดหลั่งป้องกันตัว หรือเพื่อเพิ่มศักยภาพในการสื่อสาร และใช้เป็นเครื่องหมายทางเคมี (chemotaxonomical marker) (Vujisic' *et al.*, 2014; Stanković *et al.*, 2016; Ilic' *et al.*, 2019)

สารสกัดชั้นเฮกเซนพบสารประกอบที่สามารถระเหยได้ 3 ชนิด สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ 2 ชนิด และสารสกัดชั้นเมทานอล 1 ชนิด โดยพบสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ hexyl pentadecanoate (สารสกัดชั้นเฮกเซนพบ 80.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์พบ 54.87 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดชั้นเมทานอลพบ 58.33 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบสารประกอบหลัก 2 ชนิดที่พบในสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง ซึ่งความแตกต่างของสารประกอบจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด กับองค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง อาจเป็นผลจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และการสลายตัวของสารประกอบ (Stanković *et al.*, 2016) เนื่องจากการนำต่อม repugnatorial ตกในอากาศเป็นเวลานาน (3 วัน) และการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่ต้องใช้ความร้อนอาจส่งผลต่อสารบางชนิด

5.3 ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัด

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยับยั้งได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะ fluconazole ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากตัวทำลายทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654, *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่พบการเจริญของเชื้อภายในจานเพาะเชื้อ

สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต และสารสกัดชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST 20654 และสามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ โดยสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต และสารสกัดชั้นเมทานอลมีบริเวณยับยั้งต่อ *C. albicans* เท่ากับ 1.08, 0.91 และ 0.70 เซนติเมตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ fluconazole ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.68 เซนติเมตร แต่สารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องมาจากสารประกอบที่ได้จากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ เพราะแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนห่อหุ้มที่ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ผนังเซลล์ (peptidoglycan cell wall) และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเป็นส่วนที่ควบคุมการไหล และดูดซึมสาร เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างแบบไม่สมมาตร (asymmetric bilayer) ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ส่วนด้านนอกประกอบด้วยลิพอโพลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งจะมีช่องที่เรียกว่าพอริน (porin) ฝังอยู่ และ bilayer ที่มีลิพอโพลิแซ็กคาไรด์ จะมีความแข็งมากกว่าปกติ จะทำให้สารที่ชอบน้ำ (hydrophobic compound) ไหลช้าลง และสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophilic compound) จะถูกจำกัดด้วยช่องที่มีขนาดเล็ก (Rojas *et al.*, 2018; Zgurskaya *et al.*, 2015) และนอกจากนี้ในชั้น periplasmic space มีเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือที่เรียกว่า murein ที่เป็นชั้นที่แข็ง และยังมีเอนไซม์ (enzyme) ที่สามารถทำลายโมเลกุลแปลกปลอมจากภายนอกได้ จึงนับว่ามีความสำคัญในการปกป้องเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก แต่มีเพปทิโดไกลแคนหลายชั้น และกรด teichoic ล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีความจุของน้ำมาก และสามารถเก็บโปรตีนได้มาก เนื่องจากโครงสร้างที่มีรูพรุนหนาและชอบน้ำ ทำให้สารสามารถซึมผ่านได้ดีกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Ren *et al.*, 2014)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลเอซีเทต และเมทานอล พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และสามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง ผลการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.0019 - 0.250 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าเนื่องจากมีค่า MIC ที่สูงกว่า แต่ในกรณีของ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 พบว่าสารคัดหลั่ง

ป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงสามารถยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 0.0019 และ 0.0039 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ fluconazole มีค่า MIC อยู่ที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งมากกว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง 5 - 10 เท่า

การทดสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน และเอทิลแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, และ *S. aureus* DMST20654 โดยมีค่า MBC อยู่ที่ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการทำลาย *C. albicans* ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงพบว่ามีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ โดยมีค่า MBC/MFC อยู่ในช่วง 0.0039 - 0.50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าสามารถทำลายเชื้อ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ายาปฏิชีวนะ fluconazole โดยมีค่า MFC อยู่ที่ 0.0039 และ 0.0078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เช่น ไคติน (chitin) กลูแคน (glucan) และแมนแนน (mannan) เป็นหลัก (Lipke & Ovalle, 1998) แต่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย เพปทิโดไกลแคน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่เยื่อหุ้มชั้นนอกประกอบด้วยลิพอโพลิแซ็กคาไรด์ ทำให้ผนังเซลล์มีความซับซ้อน และมีโครงสร้างหลายชั้น ส่งผลให้สารต่าง ๆ เข้าสู่ชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยากมากขึ้น และเป็นอุปสรรคต่อสารสกัดจากพืช ยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ และสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติ (Stanković *et al.*, 2016)

สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงของกิ้งกือ Spirostreptida มีองค์ประกอบหลักที่เป็นควิโนนดั่งที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง และทำลายเชื้อจุลชีพทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากควิโนนเป็นกลุ่มสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) ที่มีความสำคัญ และทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น สามารถยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส เป็นสารต้านมะเร็ง และมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าฟินอล (Beheshti *et al.*, 2012; Campos-Xolalpa *et al.*, 2021; Ilić *et al.*, 2019) ควิโนนสามารถสร้างสารเชิงซ้อนต่อกรดอะมิโนในโปรตีนที่ทำให้โปรตีนไม่สามารถคืนสภาพได้ ดังนั้นผนังเซลล์ของเชื้อจุลชีพ สารที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ พอลิเพปไทด์ (polypeptide) และเอนไซม์จึงไม่สามารถทำงานได้ (Alibi *et al.*, 2021) เช่น การศึกษาของ Morales & Pedroso, (2019) ได้รายงานฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือ *Rhinocricus* sp. ซึ่งเป็นสปีชีส์เฉพาะถิ่น (Endemic species) ของคิวบา เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ

เชื้อ *Fonsecaea pedrosoi* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *C. albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 30.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเช่นเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ (Roncadori *et al.* 1985; Williams *et al.*, 1997; Ilic *et al.*, 2018; ; Ilic *et al.*, 2019) นอกจากนี้ควิโนนยังทำให้เกิดการระคายเคืองอย่างรุนแรงต่อผิวหนัง และเยื่อของสัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมถึงมนุษย์ (Shear, 2015) โดยเมื่อสัมผัสสารคัดหลั่งบริเวณผิวหนังที่บอบบางอาจมีอาการแสบร้อน พุพอง และลอกได้ และสีของสารคัดหลั่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้ควิโนนแล้วยังมีฟีนอล ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อราได้ (Davidson & Branden 1981; Ilic *et al.*, 2019) และเอสเทอร์ของกรดไขมันที่คาดว่าช่วยทำหน้าที่ในการเป็นตัวทำละลาย และเป็นสารตัวพาที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของควิโนน (Vujisic' *et al.*, 2014) จึงทำให้สารคัดหลั่งป้องกันตัวสามารถยับยั้ง และทำลายเชื้อจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.4 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาวิธีการสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัวเพื่อป้องกันไม่ให้องค์ประกอบของสารไม่สลายตัวหรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และศึกษาองค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวในสปีชีส์อื่น ๆ ทั้งในอันดับเดียวกันและอันดับอื่น ๆ รวมทั้งก็งก็มาจากต่างพื้นที่เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายขององค์ประกอบสารคัดหลั่งป้องกันตัว นอกจากนี้ควรมีการศึกษาการสกัดและนำสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากก็งก็ไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ และในเชิงพาณิชย์

บรรณานุกรม

- สมศักดิ์ ปัญญา. 2549. *วิจัยกิ้งกือ เรื่องไม่ยาก (Millipede made easy)*. จัดทำโดยโครงการ BRT.58 น.
- สมศักดิ์ ปัญญา, ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย และ Henrik Enghoff. 2552. *กิ้งกือกระบอกในประเทศไทย*. จัดพิมพ์โดยโครงการ BRT. กรุงเทพฯ. 80 น.
- Alagesan, P. (2016). Millipedes: Diversity, Distribution and Ecology. In: Chakravarthy A and Sridhara S. (eds.) *Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics*. Springer, Singapore, 119-137.
- Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10(3), 231.
- Ansel, H. C., Norred, W. P., & Roth, I. L. (1969). Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 58(7), 836-839.
- Arab, A., Zacarin, G. G., Fontanetti, C. S., Camargo-Mathias, M. I., Dos Santos, M. G., & Cabrera, A. C. (2003). Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*, 18(2), 79-82.
- Attygalle, A. B., Xu, S. C., Meinwald, J., & Eisner, T. (1993). Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1700-1706.
- Beheshti, A., Norouzi, P., & Ganjali, M. R. (2012). A simple and robust model for predicting the reduction potential of quinones family; electrophilicity index effect. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 4811-4821.
- Burden, B. (2004). Symphylans (Class Symphyla). In: *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht.
- Bodner, M., Vagalinski, B., Makarov, S.E., Antić, D.Z., Vujisić, L.V., Leis, H.J. and Raspotnig, G. 2016. "Quinone millipedes" reconsidered: evidence for a mosaic-like taxonomic

distribution of phenol-based secretions across the Julidae. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 249–258

- Campos-Xolalpa, N., Pérez-Ramos, J., Esquivel-Campos, A., Pérez-González, C., Sánchez-Pérez, L., & Pérez-Gutiérrez, S. (2021). Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Quinones Isolated from Different Organism. *Cytotoxicity-New Insights into Toxic Assessment*, 27.
- Davidson, P. M., & Branden, A. L. (1981). Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *Journal of Food Protection*, 44(8), 623-632.
- Deml, R., & Huth, A. (2000). Benzoquinones and hydroquinones in defensive secretions of tropical millipedes. *Naturwissenschaften*, 87(2), 80-82.
- Eisner, T., Alsop, D., Hicks, K., & Meinwald, J. (1978). Defensive secretions of millipedes. In: Bettini, Sergio (Ed.), *Arthropod Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*, 1823, 41-72.
- Enghoff, H. (2005). The millipedes of Thailand (Diplopoda). *Steenstrupia*, 29 (1), 87–103.
- Golovatch, S. I., & Kime, R. D. (2009). Millipede (Diplopoda) distributions: A review. *Soil organisms*, 81(3), 565-597.
- Hopkin, S. P., & Read, H. J. (1992). *The Biology of Millipedes*. Oxford. Oxford University Press.
- Ilić, B., Dimkić, I., Unković, N., Grbić, M. L., Vukojević, J., Vujisić, L., Tešević, V., Stanković, S., Makarov, S., & Lučić, L. (2018). Millipedes vs. pathogens: Defensive secretions of some julids (Diplopoda: Julida) as potential antimicrobial agents. *Journal of Applied Entomology*, 142(8), 775-791.
- Ilić, B., Unković, N., Ćirić, A., Glamočlija, J., Ljaljević Grbić, M., Raspotnig, G., Bodner, M., Vukojević, J., & Makarov, S. (2019). Phenol-based millipede defence: antimicrobial

- activity of secretions from the Balkan endemic millipede *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch, 1867)(Diplopoda: Callipodida). *The Science of Nature*, 106(7), 1-9.
- Jones, T. H., Guthrie, D. M., Hogan, C. T., Robinson, D. J., Mesibov, R., Shear, W. A., Spande, T. F., & Saporito, R. A. (2018). The chemistry of some Dalodesmidean millipedes from Tasmania (Diplopoda, Polydesmida). *Journal of natural products*, 81(1), 171-177.
- Kime, R. D., & Golovatch, S. I. (2000). Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(3), 333-349.
- Klem, M. L. (2017). Effectiveness of chemical defense in a tropical millipede species on a potential predator, the tarantula *Megaphobema mesomelas*. *Occam's Razor*, 7(1), 4.
- Kuwahara, Y., Yamaguchi, T., Ichiki, Y., Tanabe, T., & Asano, Y. (2017). Hydrogen peroxide as a new defensive compound in “benzoyl cyanide” producing polydesmid millipedes. *The Science of Nature*, 104(3), 1-8.
- Likhitrakarn, N., Golovatch, S. I., Jeratthitikul, E., Srisonchai, R., Sutcharit, C., & Panha, S. (2020). A remarkable new species of the millipede genus *Trachyjulus* Peters, 1864 (Diplopoda, Spirostreptida, Cambalopsidae) from Thailand, based both on morphological and molecular evidence. *ZooKeys*, 925, 55.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, 180(15), 3735–3740.
- Marek, P. E., Shear, W. A., & Bond, J. E. (2012). A redescription of the leggiest animal, the millipede *Illacme plenipes*, with notes on its natural history and biogeography (Diplopoda, Siphonophorida, Siphonorhinidae). *ZooKeys*, 241, 77.

- Morales, J. E. T., & Pedroso, M. T. C. (2019). Diplodomica I. Chemical Composition of Repugnatorial Secretions of Cuban Endemic Millipede gen. *Rhinocricus* sp. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings* ,41(1), 1-8.
- Morales, J.E.T., Siguenza, J.C., Villavicencio, C.B. and Canchingre, M. 2022. Diplodomica III. Chemical Ecology of defensive secretions from neotropical archipelago. Isolation of 3,4-dimethoxyphenol from ejected secretion of endemic Cuban millipedes (Spirobolida, Rhinocricidae, *Rhinocricus*). Study case *Rhinocricus duvernoyi* Karch 1881, La Palma population. In *Proceedings of the 2nd International Electronic Conference on Diversity (IECD 2022)—New Insights into the Biodiversity of Plants, Animals and Microbes*, 15–31 March 2022, MDPI: Basel, Switzerland
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2009a). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 1: the *T. opinatus* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Zootaxa*, 2016(1), 17-50.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2009b). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 2: the *T. bifurcus* subgroup (Diplopoda, Spirostreptida, Harpagophoridae). *Zootaxa*, 2165(1), 1-15.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2010). The Rhynchoproctinae, a south-east Asiatic subfamily of giant millipedes: cladistic analysis, classification, four new genera and a deviating new species from north-west Thailand (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Invertebrate Systematics*, 24(1), 51-80.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2011a). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 3: the *T. induratus* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Zootaxa*, 2941(1), 47-68.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2011b). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 4: the *T. cuisinieri* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida:

- Harpagophoridae). *Zootaxa*, 2980(1), 37-48.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2014). Molecular phylogeny of the *Thyropygus allevatus* group of giant millipedes and some closely related groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71, 170-183.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2016). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 5: the *T. allevatus* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *European Journal of Taxonomy*, 199, 1-37.
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., & Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 3(2), 41-51.
- Rodriguez, J., Jones, T. H., Sierwald, P., Marek, P. E., Shear, W. A., Brewer, M. S., Kocot, K. M., & Bond, J. E. (2018). Step-wise evolution of complex chemical defenses in millipedes: a phylogenomic approach. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Rojas, E. R., Billings, G., Odermatt, P. D., Auer, G. K., Zhu, L., Miguel, A., Chang, F., Weibel, D. B., Theriot J. A., & Huang, K. C. (2018). The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature*, 559(7715), 617-621.
- Roncadori, R. W., Duffey, S. S., & Blum, M. S. (1985). Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. *Mycologia*, 77(2), 185-191.
- Scheller, U., Berg, M. P., & Jansen, M. G. (2004). Pauropoda (Myriapoda), a class new to the Dutch fauna, with the description of a new species. *Entomologische Berichten*, 64(1), 3-9.
- Shear, W. A. (2015). The chemical defenses of millipedes (Diplopoda): biochemistry, physiology and ecology. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 78-117.

- Shimizu, N., Kuwahara, Y., Yakumar, R., & Tanabe, T. (2012). n-Hexyl laurate and fourteen related fatty acid esters: new secretory compounds from the julid millipede, *Anaulaciulus* sp. *Journal of chemical ecology*, 38(1), 23-28.
- Sierwald, P., & Bond, J. E. (2007). Current status of the myriapod class Diplopoda (millipedes): taxonomic diversity and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 52, 401-420.
- Srisonchai, R., Enghoff, H., Likhitrakarn, N., & Panha, S. (2018). A revision of dragon millipedes I: genus *Desmoxytes* Chamberlin, 1923, with the description of eight new species (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). *ZooKeys*, 761, 1–177.
- Stanković, S., Dimkić, I., Vujisić, L., Pavković-Lučić, S., Jovanović, Z., Stević, T., Sofrenić, I., Mitić, B., & Tomić, V. (2016). Chemical defence in a millipede: Evaluation and characterization of antimicrobial activity of the defensive secretion from *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881)(Diplopoda, Julida, Julidae). *PLoS One*, 11(12).
- Stoev, P., Zapparoli, M., Golovatch, G., Enghoff, H., Akkari, N., & Barber, M. (2010). Myriapods (Myriapoda). Chapter 7.2. In: Roques A et al. (Eds) Alien terrestrial arthropods of Europe. *BioRisk* 4(1): 97–130.
- Sutthisa, W., & Chaiyacham, P. (2022). Antibacterial Activity of Ethanolic Extracts of *Lenfinus squarrosulus* Mont. against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(1), 441-448.
- Suwanchatree, J., Khamtorn, N., Noodang, W., & Lertcanawanichakul, M. (2011). Anti-*Candida albicans* activity of active substances derived from Morinda citrifolia fruit. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy*, 23(1), 7-18.
- Valderrama, X., Robinson, J. G., Attygalle, A. B., & Eisner, T. (2000). Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects?. *Journal of Chemical Ecology*, 26(12), 2781-2790.

- Vujisić, L.V., Makarov, S.E., Ćurčić, B.P.M., Ilić, B.S., Tešević, V.V., Godevac, D.M., Vučković, I.M., Ćurčić, S.B. and Mitić, B.M. 2011. Composition of the defensive secretion in three species of European millipedes. *Journal of Chemical Ecology*, 37: 1358–1364.
- Vujisić, L. V., Antić, D. Ž., Vučković, I. M., Sekulić, T. L., Tomić, V. T., Mandić, B. M., Tesevic, V. V., Božidar, P. M. C., Vajsc, V. E., & Makarov, S. E. (2014). Chemical defense in millipedes (Myriapoda, Diplopoda): do representatives of the family Blaniulidae belong to the 'quinone' clade?. *Chemistry & Biodiversity*, 11(3), 483-490.
- Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., Joshi, P., & Kothari, V. (2009). Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet Journal of Microbiology*, 7(1), 1-8.
- Weldon, P. J., Cranmore, C. F., & Chatfield, J. A. (2006). Prey-rolling behavior of coatis (*Nasua* spp.) is elicited by benzoquinones from millipedes. *Naturwissenschaften*, 93(1), 14-16.
- Wood, W. F., Hanke, F. J., Kubo, I., Carroll, J. A., & Crews, P. (2000). Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of the millipede, *Buzonium crassipes*. *Biochemical systematics and ecology*, 28(4), 305-312.
- Williams, L. A., Singh, P., & Caleb Williams, L. S. (1997). Biology and biological action of the defensive secretion from a Jamaican millipede. *Naturwissenschaften*, 84(4), 143-4.
- Zgurskaya, H. I., López, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS infectious diseases*, 1(11), 512-522.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	อนุวัฒน์ ทุมมานาม
วันเกิด	5 พฤษภาคม 2540
สถานที่เกิด	258 หมู่ 7 ตำบลโพนงาม อำเภอนคริก จังหวัดอุบลราชธานี 34230
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	258 หมู่ 7 ตำบลโพนงาม อำเภอนคริก จังหวัดอุบลราชธานี 34230
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิตระดับปริญญาโท
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150 Email : tummanam.a@gmail.com
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบ้านหนองแสงเจริญพัฒนา จังหวัดอุบลราชธานี พ.ศ. 2557 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนุชนครวิทยาคาร จังหวัดอุบลราชธานี พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2565 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2564 คณะวิทยาศาสตร์ (สัญญาเลขที่ 6404003/2564)