การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง: *Metarhizium anisopliae*

Chemical Constituents and Biological Activities of Crude Extracts from Entomopathogenic Fungi: *Metarhizium anisopliae*

ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2553
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QR
245
ส831ก
ฉ.1
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120226
วัน, เดือน, ปี 10 ก.พ. 2555
b.12333798
i.....
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง: *Metarhizium anisopliae*

(ภาษาอังกฤษ) Chemical Constituents and Biological Activities of Crude Extracts from Entomopathogenic Fungi: *Metarhizium anisopliae*

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงิน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 - 30 กันยายน 2553

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail: poeaim@hotmail.com

คำสำคัญ: *Metarhizium anisopliae*, ความเป็นพิษต่อเซลล์, ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม,

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, Cytotoxicity, Genotoxicity

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungi) เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน และแมลง ถูกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยชีววิธี (biological control) เพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose broth (PDB) จำนวน 4 ไอโซเลต (MA 001, MA 017, MA 019 และ SNB 03) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไตลิง (Vero) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (P388) ด้วยวิธี MTT assay โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร RPMI ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ที่ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ศึกษาอัตราการรอดของเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500, 1000 และ 2000 µg/ml) พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในไอโซเลต MA 001, MA 017, MA 019 และ SNB 03 เท่ากับ 172.406, 284.450, 390.453 และ 770.076 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงสุด คือ 80 µg/ml และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าเฉพาะสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทที่แสดงฤทธิ์ต้านทานต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 1000 µg/ml โดยพบสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ Hexadecanoic acid, 9, 12-Octadecanoic acid และ 9-Octadecanoic acid

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae or green muscardine fungus is entomopathogenic fungi that found in soil and insects. *M. anisopliae* are used as a biological control in order to reduce chemicals which are injurious to the health of farmers and consumers as well as environment. In this study, chemical constituents and biological activities of crude extracts from 4 isolates (MA 001, MA 017, MA 019 and SNB 03) of *M. anisopliae* were investigated. Hexane, ethyl acetate and methanol extracts prepared from mycelium that grown on potato dextrose broth (PDB).

The cytotoxicity of the crude extracts was tested against for four cell lines: breast cancer cells (MCF-7), colorectal cancer cells (HT-29), monkey kidney cells (Vero cell) and leukemia cell in rats (P388) in culture using the MTT assay. Cell lines were grown in RPMI enriched with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) at 37°C in humidified air containing 5% CO_2. The results obtained for cell viability after 24 of exposure to different concentrations crude extracts (125, 250, 500, 1000 and 2000 µg/ml). The cytotoxicity in P388 of ethyl acetate extract of MA 001, MA 017, MA 019 and SNB 03 were observed with the CC_{50} values (50% Cytotoxicity Concentration) of 172.406, 284.450, 390.453 and 770.076 µg/ml., respectively. No genotoxic activity was observed in human lymphocytes cell culture at maximum concentration (80µg/ml). Crude extracts were tested against 6 pathogenic using disc diffusion methods. The ethyl acetate crude extract inhibited *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* at concentrations greater than 1000 µg/ml. The mostly chemical constituents from crude extracts that analyzed by GC-MS were Hexadecanoic acid, 9, 12-Octadecanoic acid and 9-Octadecanoic acid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2553 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... V

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....2

1.4 ทฤษฎี.....3

บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....11

2.1 วัสดุ อุปกรณ์.....11

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....11

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....11

2.1.3 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....11

2.1.4 วัสดุ และสารเคมี.....13

2.2 วิธีการทดลอง.....10

2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. anisopliae*.....14

2.2.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae*.....14

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion.....16

2.2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....18

2.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....18

2.2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....23
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง 23
3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....26
3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion.....28
3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์.....31
3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....35

บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ.....37

บรรณานุกรม.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS.....28

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี disk diffusion ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท.....30

3.3 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์.....34

3.4 แสดงผลของสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA 017 ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล น้ำกลั่น และ Mitomycin C ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว.....35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1.1 แสดงโครงสร้างของ cyclic hexadespeptides (destruxins) ตามคุณสมบัติทางเคมี จำนวน 5 กลุ่ม.....5
1.2 โครงสร้างของ Polyhydroxylated indolizine alkaloid (swainsonine).....6
2.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae*.....15
2.2 แสดงตำแหน่งการวาง paper disc เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยั้บยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....17
3.1 ลักษณะโคโลนี และลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*.....25
3.2 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท.....30
3.3 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน A: โครโมโซมของคนปกติ และ B: ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

จากการทำวิจัยในเรื่องการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) สกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* พบว่าปัญหาในการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆเกิดขึ้นน้อยมาก รวมทั้งการเกิดสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสังเกตเห็นบริเวณ clear zone ได้อยู่เสมอ ซึ่งนำไปสู่ความสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงนี้ พร้อมกับศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว โดยใช้หลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญ ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถ และสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ แต่ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบ คือ การระบาดของแมลงศัตรูพืช การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยชีววิธี (biological control) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการนำเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมีคุณสมบัติในการทำลายแมลงได้หลายชนิดมาใช้ โดยเชื้อราที่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (biopesticide) มีหลายสกุล เช่น *Entomophthora*, *Verticillium*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Cordyceps*, *Culicinomyces* และ *Paecilomyces* เป็นต้น โดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรามีทั้งการสร้างเส้นใยแพร่กระจายไปทั่วตัวแมลง มีผลทำให้แมลงขาดอากาศ หรือเส้นใยของเชื้อราใช้น้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย รวมทั้งการสร้างสาร เช่น destruxin จากเชื้อราในสกุล *Metarhizium* hissutellin จากเชื้อราในสกุล *Hirsutella* และ beauvericin จากเชื้อราในสกุล *Beauveria* และ Fusarium เป็นต้น สารเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตายได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงมีการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีแนวโน้มในการนำไปเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดแมลง (insecticide) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ได้

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ค้นพบมีทั้งฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial) ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(anti-malaria) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungus) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (anti-viral) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ต้านวัณโรค (anti-tuberculosis) เป็นต้น โดยสารดังกล่าวควรมีความจำเพาะเจาะจง และจะต้องมีผลข้างเคียงน้อยมาก และจากการที่มีเชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ จึงเกิดแนวคิดที่จะนำเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงบางชนิดมาสกัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ หรือกับเซลล์มะเร็ง รวมทั้งความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม เพื่อพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยข้อมูลที่เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งการต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านจุลชีพยังมีอยู่น้อย ผลที่ได้จากงานวิจัยอาจมีส่วนช่วยสนับสนุนหรือเป็นแนวทางส่งเสริมการพัฒนาวิธีการใช้สารสกัดจากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง หรือรักษาการติดเชื้อต่อไป รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำให้ทราบถึงระดับความปลอดภัย เพื่อการนำไปใช้อย่างถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *Metarhizium anisopliae*

1.2.2 ศึกษาถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *Metarhizium anisopliae* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.2.3 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *Metarhizium anisopliae* ที่มีผลต่อเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และหาระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษโดยวิธี Methyl tetrazolium assay (MTT assay)

1.2.4 ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *Metarhizium anisopliae* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในอาหารเพาะเลี้ยง และหาระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *Metarhizium anisopliae* กับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองกับเซลล์ชนิดปกติ คือ เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) และเซลล์มะเร็ง คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (murine leukemia cell: P388)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Candida utilis*

1.4 ทฤษฎี

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง (Insect fungi หรือ entomopathogenic fungi) หมายถึงเชื้อราที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแมลง ซึ่งอาจจะอยู่ร่วมกับแมลงที่มีชีวิตหรือทำให้เกิดโรคและสามารถฆ่าแมลงได้ โดยเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงที่มีบทบาทสำคัญทางการเกษตรมีหลายสกุล เช่น *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Paecilomyces* sp., *Aschersonia* sp., *Verticillium* sp. และ *Entomophthora* sp. เป็นต้น

โดยส่วนใหญ่รากลุ่มนี้จะเป็น contact biopesticides ที่วงจรชีวิตเริ่มจากเชื้อราระยะที่เป็นสปอร์ตกไปบนผิวของแมลงอาศัย (host) และเข้าสู่ลำตัวโดยตรงทางผิวหนังของแมลง หรือบางชนิดอาจเข้าทางช่องเปิดต่างๆของแมลง เช่น ช่องหายใจ หรือบาดแผลที่ผนังลำตัว โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสภาพทางชีวเคมีเพื่อให้สามารถติดแน่นอยู่กับผิวของแมลง เมื่อมีความชื้นที่เหมาะสม สปอร์จะเจริญผ่านทาง cuticle ของแมลงเข้าไปในช่องว่างในลำตัวบริเวณรอยต่อระหว่างข้อปล้อง หรือข้อต่อของรยางค์ต่างๆ โดยอาศัยเอนไซม์ต่างๆ ที่เชื้อราสร้างขึ้น เช่น lipase ช่วยย่อยสลายชั้นไขมัน ที่เคลือบอยู่บนผนังลำตัว หรือเอนไซม์ chitinase และ proteinase ช่วยย่อยสลายชั้นต่างๆ ของผนังลำตัวมีการสร้างเส้นใยมากมายแพร่กระจายไปทั่วตัวแมลงอย่างรวดเร็ว เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงบางชนิด เช่น กลุ่ม Mastigomycotina และ Zygomycotina แมลงอาศัยจะตายในขณะที่ไมซีเลียมเจริญเติบโตทั่วตัวแมลง ทำให้แมลงขาดอากาศหรือตาย ส่วนเชื้อราในกลุ่ม Ascomycotina และ Deuteromycotina แมลงอาศัยจะตายเนื่องจากสารพิษที่เชื้อราปล่อยออกมาในช่วงเริ่มต้นของการเข้าทำลาย โดยเชื้อราจะสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น bassianin, beauvericin, bassianolide, beauverolide และ tenellin จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* หรือ oosporein จากเชื้อรา *Beauveria brongnairtii* รวมทั้ง destruxins และ cytochalasins จากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* โดยสารพิษเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตายได้ เมื่อแมลงตายแล้วจึงสร้างเส้นใยบนซากแมลง ดูดน้ำเลี้ยงและสารอาหารจากแมลงทำให้ซากแมลงแห้ง จากนั้นเส้นใยส่วนที่อยู่ภายนอกจะสร้างสปอร์ และฟุ้งกระจายเข้าสู่วงจรการทำลายต่อไป

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ แต่ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบ คือ การระบาดของแมลงศัตรูพืช การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยชีววิธี (biological control) เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการนำเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมีคุณสมบัติในการทำลายแมลงได้มาใช้ โดยเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงที่นิยมมาใช้ปัจจุบันในประเทศ คือ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* แต่ปัญหาการปนเปื้อนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

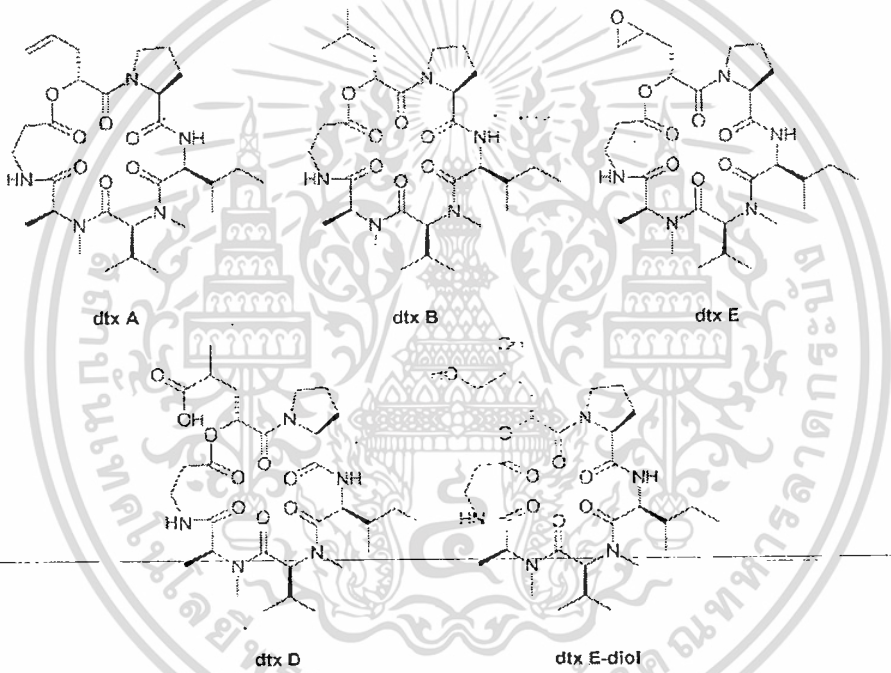
สารพิษจากรา (mycot oxin) มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและต่อสุขภาพของมนุษย์ สารพิษจากเชื้อราที่เป็นปัญหา คือ aflatoxin (จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus*) ที่เป็นพิษต่อตับ นอกจากนั้นยังมี sterigmatocystin (จาก *Aspergillus versicolor*) zearalenone (จากเชื้อราในสกุล *Fusarium*) ที่เป็นพิษต่อระบบฮอร์โมนในเพศหญิง ochratoxin (จากเชื้อราในสกุล *Penicillium*) ที่เป็นพิษต่อไต patulin (จาก *Penicillium patulum*) ที่เป็นพิษต่อระบบประสาท fumonisin (จากเชื้อราในสกุล *Fusarium*) ที่เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันและระบบทางเดินหายใจ และ T-2 toxin, trichothecene (จากเชื้อราในสกุล *Fusarium*) ที่เป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น ดังเช่น Jestoi และคณะ (2004) ศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารอินทรีย์จำนวน 30 ตัวอย่างจากตลาดในประเทศ Finnish และ Italian พบการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* และ *Aspergillus* จำนวน 16 ชนิด โดยพบ Enniatins B, B1 และ deoxynivalenol ในลำดับต้นๆ และเมื่อนำมาศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากอาหารต่อเซลล์ feline fetal lung cells ในหลอดทดลองพบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษกับระดับความเข้มข้นของสารพิษจากเชื้อรานั้น

จากการที่เชื้อราสาเหตุโรคในแมลงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงมีการนำเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงบางชนิดมาสกัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบคุณสมบัติเพื่อพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ (Blanford และคณะ, 2005) หนึ่งในจำนวนนั้นคือ เชื้อราในสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungi) เป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproductive stage) หรือระยะ anamorph ที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproductive stage) หรือระยะ teleomorph คือเชื้อราในสกุล *Cordyceps* spp. จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota อันดับ Hypocreals (Bidochka และคณะ, 2005 และ Bugeme และคณะ, 2009) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบกระจายอยู่ทั้งในดิน แมลงหรือหนอนต่างๆ ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย เป็นเชื้อราที่มีศักยภาพในการทำลายแมลงได้หลายชนิด (Zimmermann, 1993) แต่ก็เช่นเดียวกับเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลงอื่นๆ ที่ในแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันในเรื่องของการอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ความเฉพาะเจาะจงต่อแมลง แหล่งที่อยู่ และประสิทธิภาพต่อชนิดของแมลงที่อยู่อาศัยหรือความจำเพาะต่อแมลง (Bridge และคณะ, 1993; Dong และคณะ, 2007; Driver และคณะ, 2000; Fegan และคณะ, 1993; Fungaro และคณะ, 1996; Mavridou และคณะ, 1998; Pantou และคณะ, 2003) รวมทั้งประสิทธิภาพของแต่ละสายพันธุ์ (Samson และคณะ, 2006; Ansari และคณะ, 2004; Brett และคณะ, 2004; Sun และคณะ, 2003) โดย *M. anisopliae* นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมากที่สุด โดยลักษณะเส้นใย (Hypha) ของ *M.anisopliae* มีผนังกั้นเป็นปล้อง ไม่มีสี เมื่อเจริญเต็มที่สร้าง Conidiophase ชูขึ้นจากเส้นใย และ Conidiophase แยกเป็นกิ่งๆ พร้อมอัดแน่นเป็นแท่ง ส่วนตรงปลายสร้าง Phialide ซึ่งเป็นเซลล์ที่ผลิต Conidia มีทั้งขนาดสั้น (ความยาวเฉลี่ย 2-4 ไมครอน) และขนาดยาว (ความยาวเฉลี่ย 3-12 ไมครอน) อยู่เป็นลูกโซ่ต่อกันเป็นรอยคอดระหว่าง Conidium และสีของ Conidium ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดใหม่ๆ มีสีขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำ **หลุดออกตรงรอยคอดเมื่อแก่จัด** ตัวอย่างสารที่เชื้อรา *M. anisopliae* สร้างขึ้น เช่น destruxins และ swainsonine ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบ (Roberts, 1966) นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับสารชนิดอื่นๆที่แยกได้ เช่น cytochalasin C และ D, 12-hydroxyovalicin, viridoxin, myroridins และ hydroxyfungerin (Krasnoff และคณะ, 2006)

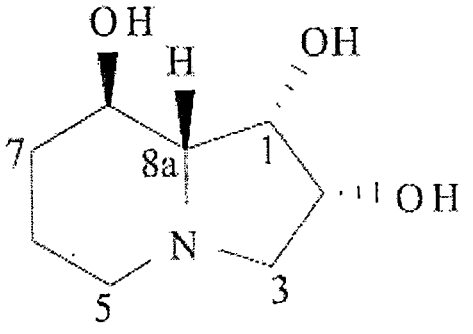
Destruxins (dtxs) เป็นสารในกลุ่ม cyclic hexadepsipeptides toxins มีโครงสร้างเป็นวง ที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารฆ่าแมลง (insecticidal activity) มีฤทธิ์ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตาย (Kershaw และคณะ, 1999; Dumas และคณะ, 1994; Dumas และคณะ, 1996a) เมื่อแยกอนุพันธ์ในธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ได้ 5 ชนิด คือ Destruxin A, B, D, E, และ E-diol (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของ cyclic hexadespeptides (destruxins) ตามคุณสมบัติทางเคมี จำนวน 5 กลุ่ม
ที่มา : www.regional.org.au

Swainsonine เป็นสารประเภท indolizidine alkaloid ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน piperidine และ pyrrolidine เชื่อมกัน (รูปที่ 1.2) มีรายงานว่าพบใน *M. anisopliae* isolate F-3622 (Hino และคณะ, 1985) สารประกอบมีคุณสมบัติในการยังยั้งเอนไซม์ lysosomal alpha-mannosidase และ mannosidase II มีสมบัติต้านการแบ่งเซลล์ของเนื้องอก (antitumor-proliferative) และต้านมะเร็ง (anticancer activity) นอกจากนั้นยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Nemr, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของ Polyhydroxylated indolizine alkaloid (swainsonine)
ที่มา: Oselys และคณะ (2007)

นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อรา *Metarhizium* sp. สามารถสร้างสารที่มีโมเลกุลเล็กอื่นๆ มากมาย ซึ่งเป็นพิษต่อแมลง หรือใช้ในงานทางการแพทย์ได้ เช่น *M. flavoviride* ที่แยกได้จากประเทศสาธารณรัฐเชค (Czechoslovakia) พบสารใหม่คือ viridoxins A และ B ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อตัวอ่อนของด้วงมันฝรั่ง (Colorado potato beetle larvae) โดยความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง (50 เปอร์เซนต์) ของจำนวนเริ่มต้น (LC_{50}) เท่ากับ 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Gupta และคณะ, 1993)

Metarhizium sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่นสามารถสร้างสาร 12-hydroxy-ovalicin (Kuboki และคณะ, 1999) ซึ่งให้ชื่อว่า Mer-f3 มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 311 มีคุณสมบัติยับยั้งเซลล์ไลน์ L-1210 พบเป็นพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไม่พบรายงานว่าเป็นพิษต่อแมลง

Metacytofilin (Iijima และคณะ, 1992) มีน้ำหนักโมเลกุล 305 พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ L-1210 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือเชื้อรา

Oselys และคณะ (2007) ศึกษาการคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* sp. เพื่อผลิตสารเมทาบอไลท์ชนิด Indolizidine alkaloid โดยใช้เชื้อรา *Metarhizium* sp. 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ 3935, 4516, 4819, PL57, PL43 และ *Metarhizium flavoviride* สายพันธุ์ CG291 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat meal extract สูตรดัดแปลง และอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek culture medium สูตรดัดแปลง ในฟลาส์กเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ 3539 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Oat meal extract ที่เสริมด้วย D-lysine 1.8 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตของ swainsonine มากที่สุดคือ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง electrospry ionization mass spectrometry : ESI-MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการสกัดจะได้สารแต่ละชนิดแตกต่างกันดังเช่น Seger และคณะ (2006) ทำการแยกสารจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* โดยทำการแยกให้บริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน คือ เทคนิค Liquid-liquid extraction ที่แยก dtx D และ E-diol ออกจากสารสกัดหยาบ ขั้นตอนทำ enrichment ด้วยเทคนิค Apolar chromatography เพื่อแยกสารออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามความมีขั้วและน้ำหนักโมเลกุลของสาร และใช้เทคนิค High-speed counter-current chromatography (HSCCC) เพื่อแยก dtx ที่เหลือออกจากกัน พบองค์ประกอบหลักที่พบในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการกรองคือ dtx A, B และ E เท่ากับ 78 mg, 59 mg และ 63 mg/1 ตามลำดับ โดยมีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98 เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2004) ที่ศึกษา *M. anisopliae* สายพันธุ์ V245 และ V275 ในอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ พบว่าผลผลิตที่ได้มีค่าแตกต่างกัน และ Cai และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาสารสกัดที่แยกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา OS-F68576 ซึ่งเป็น destruxin 5 ชนิด โดยพบว่า destruxin-A4 chlorohydrin เป็น destruxin ชนิดใหม่

Amiri-Besheli และคณะ (2000) ศึกษาทั้งชนิด และปริมาณของ destruxins พบว่าสายพันธุ์ *M. anisopliae* var. *anisopliae* มีปริมาณของ destruxins A, B และ E โดย strain V220 ไม่สามารถผลิต destruxins ได้ และ *M. anisopliae* var. *majus, M. flavoviride* และ *M. album* ที่มีความจำเพาะต่อแมลงในกลุ่ม Coleoptera, Orthoptera และ Hemiptera ตามลำดับนั้น ให้ผลผลิตของ destruxin ชนิดต่างๆที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าให้ปริมาณของ destruxins มากแต่อาจมีความเป็นพิษต่ำในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่งอาจขึ้นกับสารอาหารในตัวแมลง จึงอาจกล่าวได้ว่าสารที่เชื้อราผลิตขึ้นนอกจากสายพันธุ์แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง

Hsiao และคณะ (2001) ได้ทำการแยกสารจาก *M. anisopliae* ได้ dtxs หลัก 4 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC และ liquid chromatography electrospray mass spectrometry (LC-ESI-MS) พบว่า *M. anisopliae* สายพันธุ์ F061 ผลิต dtxs ได้มากที่สุดโดยเฉพาะ dtx-A (12.84±0.04 μg/ml) และ dtx -B (66.89±2.57 μg/ml) DMDB (1.41±0.13 μg/ml) ตามลำดับ แต่ระดับของ dtx -E (4.19±0.13 μg/ml) ที่สูงสุดในสายพันธุ์ F007 และพบอีกว่าการกลายของเชื้อ *M. anisopliae* โดย ethyl methane sulfonate (EMS) และ ultraviolet (UV) สามารถทำให้การผลิต dtxs มากขึ้นซึ่งเหมาะแก่การผลิตเพื่อนำไปใช้งาน

ได้มีการศึกษาว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ คัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปปรับปรุงโครงสร้างเพื่อทำให้สารนั้นมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น เช่นในการศึกษาสารต้านมะเร็งจากธรรมชาตินั้นมีหลายระดับ เช่น สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity agent) สารต้านเนื้องอก (antitumor หรือ antineoplastic agent) และ และสารต้านมะเร็ง (anticancer agent) โดยการทดสอบสารสกัดกับเซลล์ในหลอดทดลองนั้น ต้องมีการนับเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากที่ได้รับสารสกัดหรือการตายของเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดในระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเป็นการทดสอบในเบื้องต้นก่อนที่จะนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคในอนาคตต่อไป โดยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาสารสกัดมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง (In Vivo) เช่น หนู กระต่าย เป็นต้นและในหลอดทดลอง (In Vitro) เช่น เซลล์แมลง เซลล์ตับ เซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ผิวหนัง เป็นต้น ซึ่งวิธีในการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ในหลอดทดลองสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Lactate dehydrogenase (LDH), Neutral red assay และ MTT assay เป็นต้น (Issa และคณะ, 2003; Aziz, 2006) รวมทั้งการประเมินสารตกค้าง หรือสารที่มีโอกาสปนเปื้อนในสภาวะแวดล้อมจากการนำสารต่างๆ มาใช้ เช่น beauvericin (BEA) เป็นสารชนิด cyclic hexadepsipeptide และเป็นสารพิษที่ได้จากเชื้อรา *B. bassiana* (Hamill และคณะ, 1969) และเชื้อราในสกุล *Fusarium* ที่พบปนเปื้อนมากับธัญญาพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ (Moretti และคณะ, 1995; Logrieco และคณะ, 1998) เนื่องจาก beauvericin สามารถพบได้ในสินค้า และพืชทางการเกษตร ดังนั้นอาจมีการปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพของสัตว์ เกษตรกร และผู้บริโภค จึงมีการทดสอบผลของ Beauvericin ต่อเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์แมลงชนิด SF-9 insect cell line (immortalized pupal ovarian cells) ของ *Spodoptera frugiperda* พบว่าทั้งระดับความเข้มข้นของ beauvericin และระยะเวลามีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Calo และคณะ, 2003) เมื่อทดสอบความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบ IC_{50} (50% Inhibiting Concentration) ของ beauvericin เท่ากับ 2.5 μM (Fornelli และคณะ, 2004) รวมทั้งการศึกษาผลของ beauvericin ที่มีต่อการตายของเซลล์ชนิด myeloid ของมนุษย์ คือ U-937: monocytic lymphoma cells และ HL-60: promyelocytic leukemia cells ด้วยเทคนิควิธี Trypan blue โดยใช้ beauvericin ระหว่างความเข้มข้น 100 nM – 300 μM เป็นระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง พบว่า beauvericin ที่ความเข้มข้นในระดับ 3 μM ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ โดยค่า CC_{50} (50% Cytotoxic Concentrations) ที่ 24 ชั่วโมง ต่อเซลล์ชนิด U-937 และ HL-60 มีค่าเท่ากับ 30 μM และ 15 μM ตามลำดับ (Calo และคณะ, 2004) นอกจากนั้น beauvericin สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ในเซลล์ชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) (Lin และคณะ, 2005) และเซลล์เม็ดเลือด lymphocyte (Dombrink-Kurtzman, 2003) ซึ่งอาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันอันเนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงจากการยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการเกิด apoptosis

สำหรับสารสกัดที่ได้จากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Metarhizium* มีการศึกษาความเป็นพิษต่อแมลง เซลล์แมลง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Pedras และคณะ, 2002) แต่เน้นการศึกษาไปที่การสกัดสารจากเชื้อราเพื่อนำไปใช้เป็นสารควบคุมแมลงศัตรูพืช (mycoinsecticide) รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ดังนี้

Cai และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาสารสกัดที่แยกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* OS-F68576 พบว่ามี destruxin 5 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการชักนำทำให้เกิดการแสดงออกของยีน erythropoietin เป็น 5 เท่าที่ระดับความเข้มข้น 0.2-2 μM และ Pal และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Destruxin A โดยการฉีดเข้าในแมลงหวี่ (*Drosophila*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

melanogaster) พบว่า Destruxin A มีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันในแมลง เช่นเดียวกับ Kershaw และคณะ (1999) และ Vey และคณะ (2002) จึงอาจกล่าวได้ว่า dtxs นั้นมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น malpighian และ mesenteral epithelial cells (Dumas และคณะ, 1996b)

Fornelli และคณะ (2004) พบว่าสามารถใช้เซลล์ lepidopteran *Spodoptera frugiperda* (SF-9) cell line ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อราชนิดต่างๆ เช่น fusarenon X, diacetoxyscirpenol, beauvericin, nivalenol, enniatin, gliotoxin, zearalenone โดยเทคนิค Trypan blue dye และ MTT-colorimetric assay ได้เป็นอย่างดี

Skrobek และ คณะ (2006)ได้ศึกษาผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Destruxin ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL60 cell line) และเซลล์ไลน์แมลง Sf9 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเชื้อรา *M. anisopliae* พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดมากกว่าสาร destruxin บริสุทธิ์ โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) เท่ากับ 221 และ193 ppm เมื่อบ่มกับเซลล์ไลน์ HL-60 เป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับเซลล์ไลน์แมลง SF9 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบน้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ (500 ppm)

Yeh และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษา destruxin ชนิดใหม่ คือ destruxin E2 chlorohydrin ที่สกัดได้จากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ซึ่งศึกษาโครงสร้างโดย NMR spectroscopy และ mass spectrometry และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ destruxin ชนิดอื่นๆ พบว่า destruxin ชนิดใหม่แสดงฤทธิ์ในการต้านไวรัสตับอักเสบบี ที่ศึกษาในเซลล์ชนิด human hepatoma Hep3B เช่นเดียวกับ Chen และคณะ (1997) รวมทั้งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก (Nakagawa และคณะ, 2003)

Lee และคณะ (2005) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antibacterial/antifungal) ของสารสกัดจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 47 ตัวอย่าง ที่อยู่ในสกุลต่างๆ คือ สกุล *Akanthomyces* จำนวน 6 ตัวอย่าง, สกุล *Aschersonia* จำนวน 3 ตัวอย่าง, *Cordyceps ramosopulvinata* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Cordyceps militaris* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Gibellula leiopus* จำนวน 1 ตัวอย่าง, สกุล *Metarhizium* จำนวน 6 ตัวอย่าง, สกุล *Nomuraea* จำนวน 2 ตัวอย่าง, สกุล *Paecilomyces* จำนวน 17 ตัวอย่าง, สกุล *Verticillium* จำนวน 2 ตัวอย่าง และในสกุล *Beauveria* จำนวน 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็น *B. bassiana* จำนวน 6 ตัวอย่าง และ *B. brongniartii* จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่เลี้ยงบนอาหารชนิด PDA พบว่ามีฤทธิ์ต้าน Bacillus (*Bacillus subtilis*) จำนวน 38 ตัวอย่าง (81%), มีฤทธิ์ต้าน Staphylococcus (*Staphylococcus aureus*) จำนวน 30 ตัวอย่าง (64%) และมีฤทธิ์ต้าน Saccharomyces (*Saccharomyces cerevisiae*) จำนวน 10 ตัวอย่าง (21%)

Kikuchi และคณะ (2008) ได้สกัดจากเชื้อรา *M. flavoviride* ด้วยเมทานอล พบสารสองชนิดคือmetarhizins A และ B ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diterpene pyrone และพบว่ามี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิจกรรมการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (antiproliferative) เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ชนิด MCF-7, K562, A549, THP-1 และเซลล์ไลน์ HCT116

สำหรับสารสกัดที่ได้จากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Metarhizium* นี้ยังมีงานวิจัยไม่เพียงพอต่อการยอมรับของผู้บริโภคว่ามีผลข้างเคียงต่อร่างกายหรือไม่ทั้งต่อเซลล์ปกติ หรือสารพันธุกรรม ในกรณีมีการนำมาใช้ในธรรมชาติ และมีฤทธิ์ตกค้างอยู่ในอาหารหรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งองค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จาก *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่นำไปใช้ในแปลงเกษตรกรรม รวมทั้งความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม เพื่อการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยปราศจากความเป็นพิษต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่าง *Metarhizium anisopliae* ได้จากการคัดเลือกเชื้อจำนวนทั้งหมด 33 ไอโซเลต ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง และศึกษาทั้งลักษณะทางสันฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุลในบริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacers) โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ITS 1/ ITS 4 สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่มใหญ่ จึงเลือกเป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ MA 001, MA 017, MA 019 และ SNB 03

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

2.1.2.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.1.2.4 *Candida utilis* TISTR 5046

2.1.2.5 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

2.1.2.6 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

2.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1.3.1 เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cell line: MCF-7)

2.1.3.2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cell line: HT-29)

2.1.3.3 เซลล์ไตลิง (monkey kidney cell line: Vero cell)

2.1.3.4 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (leukemia cell in rats: P388)

2.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1.4.1 บีกเกอร์ (beaker)

2.1.4.2 กระบอกตวง (cylinder)

2.1.4.3 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

2.1.4.4 ขวดแก้ว (bottle) ขนาดต่างๆ

2.1.4.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

2.1.4.6 แท่งแก้วงอ (spreader)

2.1.4.7 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (needle)

2.1.4.8 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมงอ (hook)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.9 ห่วงเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)

2.1.4.10 คอกบอร์เรอร์ (cock borer)

2.1.4.11 ปากคีบ (forcept)

2.1.4.12 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

2.1.4.13 ลูกยาง (rubber bulb)

2.1.4.14 ช้อนตักสารเคมี (spatular)

2.1.4.15 คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ (digital caliper)

2.1.4.16 ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

2.1.4.17 ปิเปตแบบอัตโนมัติ (pipette boy)

2.1.4.18 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

2.1.4.19 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ

2.1.4.20 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (flask)

2.1.4.21 ตะเกียง (burner)

2.1.4.22 สไลด์แก้ว (glass slide)

2.1.4.23 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.1.4.24 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

2.1.4.25 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมกระดาษกรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร

2.1.4.26 เครื่องระเหยสุญญากาศ (evapolator)

2.1.4.27 ไมโครไตรเตอร์เพลทรีดเดอร์ (microtiter plate reader) ฟิลเตอร์ (filter) สำหรับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

2.1.4.28 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

2.1.4.29 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

2.1.4.30 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

2.1.4.31 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)

2.1.4.32 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.1.4.33 กล้องจุลทรรศน์ชนิด bright field

2.1.4.34 กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted

2.1.4.35 เครื่องชั่ง (balance)

2.1.4.36 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)

2.1.4.37 เครื่องช่วยผสม (vortex)

2.1.4.38 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.1.4.39 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.40 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)

2.1.5 วัสดุ และสารเคมี

2.1.5.1 ยาปฏิชีวนะ gentamycin

2.1.5.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA) และ Mueller-Hilton Broth (MHB)

2.1.5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) และ Potato Dextrose Broth (PDB)

2.1.5.4 สารละลาย McFarland standard

2.1.5.5 อาหารชนิด Roswell Park Memorial Institue (RPMI-1640)

2.1.5.6 อาหารชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

2.1.5.7 ซีรัม (fetal bovine serum, FBS)

2.1.5.8 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin enzyme)

2.1.5.9 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)

2.1.5.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 70% and 95%)

2.1.5.11 ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytohemagglutinin-M, PHA)

2.1.5.12 เฮปาริน (heparin)

2.1.5.13 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)

2.1.5.14 น้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ชนิด 3 Methanol: 1 Acetic acid

2.1.5.15 โคลชิมิด (colcemid)

2.1.5.16 ฟอสเฟตไวน์บัฟเฟอร์ (phosphate wise buffer)

2.1.5.17 สีย้อมจิมซ่า (giemsa)

2.1.5.18 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan bule)

2.1.5.19 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline: PBS)

2.1.5.20 เฮกเซน (hexane)

2.1.5.21 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)

2.1.5.22 เมทานอล (methanol)

2.1.5.23 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

2.1.5.24 น้ำกลั่น (distilled water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการทดลอง

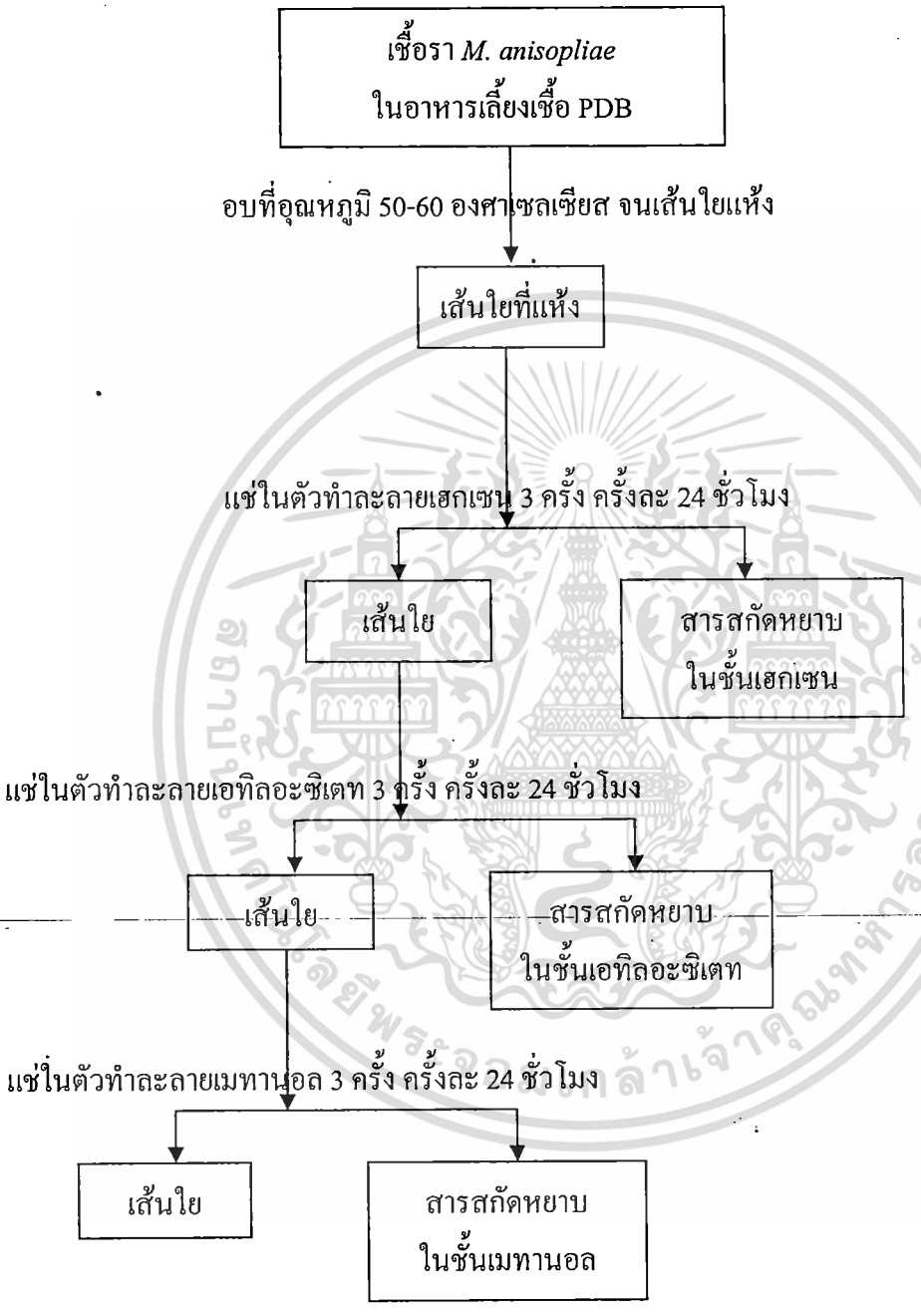
2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. anisopliae*

นำเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เก็บรักษาไว้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเขี่ยเชื้อราให้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซนต์แล้วเผาไฟทิ้งให้เย็น เจาะวุ้นส่วนที่มีเส้นใยราเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบริเวณเส้นใยเจริญแล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟเขี่ยชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ไปในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะสีของเส้นใย สีอาหาร และการเกิดโคนิเดีย พร้อมทั้งการศึกษาลักษณะต่างๆของโคนิเดีย เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ

2.2.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae*

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* แต่ละไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาประมาณ 7 วัน หรือมีปริมาณเส้นใยเพียงพอ จากนั้นใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซนต์แล้วเผาไฟทิ้งให้เย็น เจาะวุ้นส่วนที่มีเส้นใยแล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟเขี่ยชิ้นวุ้นที่เจาะได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือขวดขนาด 8 ออนซ์ ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารอย่างน้อย 3 ลิตร จากนั้นนำส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนเส้นใยแห้งโดยมีน้ำหนักคงที่ นำส่วนของเส้นใยที่ได้มาบดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก สกัดด้วยตัวทำละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนเส้นใย 1 กรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร โดยในแต่ละตัวทำละลาย นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วประมาณ 150-200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้ นำส่วนของเส้นใยไปสกัดซ้ำด้วยสารละเฮกเซนอีกจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยที่เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดหยาบ (crude) ที่ได้แห้งสนิท จะได้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน จากนั้นนำเส้นใยไปสกัดในสารละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และนำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายใส่ในขวดสีชาขนาดเล็กที่แห้งสนิท และอบฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกน้ำหนัก เก็บในที่เย็น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป พร้อมนำบางส่วนส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยการชั่งสารสกัดหยาบทั้งจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล 50-100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

2.2.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดคือ *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อยีสต์ คือ *Candida utilis* โดยเชื้อแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA) และเชื้อยีสต์จะเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำให้อยู่ในรูปสารละลายเซลล์แขวนลอย โดยใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton broth (MHB) สำหรับแบคทีเรีย และ potato dextrose broth (PDB) สำหรับยีสต์ ปริมาตรหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตรวจสอบปริมาณของเชื้อ โดยการนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้มีค่าประมาณ 0.5 – 1 ซึ่งจะได้เชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10^{8} - 10^{9} cfu/ml หรือนำไปเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland 0.05 เพื่อให้มีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 1.5 X 10^{8} cfu/ml จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อจุ่มในเชื้อที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ซับให้แห้งกับข้างหลอดทดลอง นำไปเกลี่ย (swab) บางๆให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

2.2.3.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 100 ไมโครลิตร ผสมกับเอธานอลปริมาตร 4900 ไมโครลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จะมีความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการทดสอบให้เจือจางสารละลายด้วยเอธานอลในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 1000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำไปทดสอบ

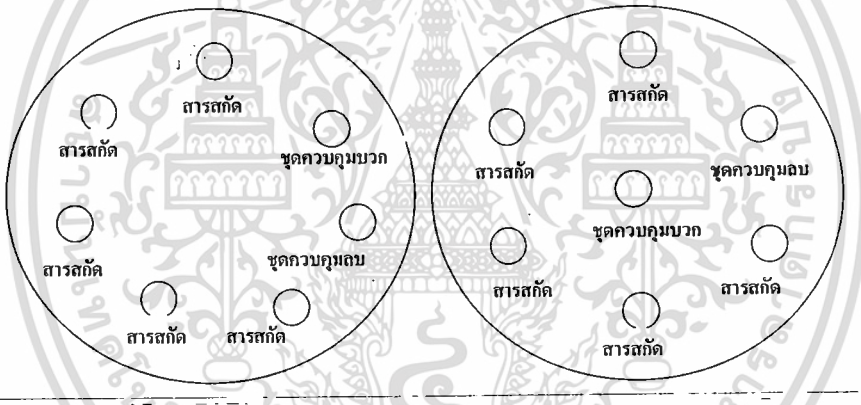
2.2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อได้สารละลายเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์ที่ต้องการแล้ว นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารแข็งโดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร MHA และเชื้อยีสต์จะเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA จากนั้นรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการหยดชุดควบคุมทางบวก (Positive control) ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมทางลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในกระดาษ AA paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อ paper disc จากนั้นรอให้แห้ง หรือทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก ใช้ปากคีบแผ่น paper disc วางลง และกดเบาๆ บนอาหารในจานเพาะเลี้ยงที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว โดยให้สารสกัดหยาบ ชุดควบคุมทางบวก และชุดควบคุมทางลบ อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกันตามตำแหน่งที่กำหนด (รูปที่ 2.2) นำไปบ่มสำหรับเชื้อแบคทีเรียนั้นจะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และเชื้อยีสต์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารสกัดหยาบ โดยในการวิเคราะห์ผลการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ใน 2 ซ้ำโดยนำมาหาค่าเฉลี่ย และในการวิเคราะห์ทางสถิตินำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2.2 แสดงตำแหน่งการวาง paper disc เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120226

2.2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

2.2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เลี้ยงเซลล์ชนิดเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29) และเซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร การ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติดังนี้ นำอาหารเก่าทั้งหมดออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังการนำสารละลาย PBS ออก ใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที ขึ้นกับชนิดของเซลล์ไลน์ เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ เมื่อเซลล์ใกล้หลุด นำสารละลายเอนไซม์ทริปซินออก และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ทริปซิน เคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์กับฝ่ามือเบา หรือใช้การดูด-ปล่อยเซลล์เบาๆ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และใส่อาหารให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

2.2.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย

ทำการเลี้ยงเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยในการ subculture ทำได้โดยดูดเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 – 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของอาหารเก่าทิ้ง แล้วเขย่าหลอดทดลองเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนกระจายตัว จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มิลลิลิตร ลง ไปผสมกับเซลล์ ดูดพ่นให้เข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

2.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.2.5.1 การปลูกเซลล์ใน 96 - wells plate

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการของ Hussain และคณะ (1993) ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารดังที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

trypsinization ด้วยทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25% และสำหรับเซลล์ชนิด P388 เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มีซีรัม 10% นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทริปแพนบลู จากนั้นปลูกเซลล์ โดยเซลล์ MCF-7 และ P388 เริ่มต้นจำนวน 1 X 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ HT-29 และ Vero cell เริ่มต้นจำนวน 1.5 X 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร (1 – 1.5 X 10^4 เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96 - wells plate หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.5.2 การเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 2000 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 100 ไมโครลิตร ในกรณีเป็นเซลล์ชนิด MCF-7, HT-29 และ Vero cell ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4900 ไมโครลิตร ในกรณีเป็นเซลล์ชนิด P388 ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ และทำการกรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1000, 500, 250, 125 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 - wells plate ครบ 24 ชั่วโมง นำมาลงสารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-wells plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีหลุมที่ไม่ต้องใส่สารสกัดหยาบ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (negative control) หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารที่มีซีรัม 5 % เพื่อใช้เป็น blank หลุมที่ใส่ DMSO ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5% ที่ระดับความเข้มข้น 2% เพื่อใช้ในการตรวจสอบว่าผลการทดลองเป็นผลมาจาก DMSO หรือไม่ และหลุมที่ใส่ Mitomycin C ที่เจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 % เพื่อใช้เป็น positive control จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์อนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.5.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดหยาบเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง นำ 96 – wells plate มาใส่สารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นหุ้ม 96 – wells plate ด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารที่มีสารละลาย MTT โดยใช้เครื่องดูดสาร หรือการคว่ำลงเบาๆบนกระดาษซับ จากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซานโดยเติมสารละลาย DMSO: ethanol 95% ปริมาตร 1: 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ วาดกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดและความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ในแกน y และ x ตามลำดับ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่าการการมีชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cytotoxicity: CC_{50})

2.2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

2.2.6.1 การเตรียมเลือด

ใช้ Heparin เคลือบกระบอกฉีดยาและเข็มเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นเปลี่ยนเข็มสำหรับเจาะเลือดเพื่อป้องกันไม่ให้ heparin เข้าสู่เส้นเลือด เจาะเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนของบุคคลตัวอย่างที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงโดยเพศชาย 1 คนและเพศหญิง 1 คน ใช้เลือดประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อคน

2.2.6.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผสมกับ 10% Fetal bovine serum ในขวดปลอดเชื้อ หยดเลือดประมาณ 8-10 หยด และ phytohemagglutinin-M: PHA ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดขวดและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยดสารสกัดหยาบที่ต้องการศึกษาในกลุ่มทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ mitomycin C ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นกลุ่ม negative และ positive control ตามลำดับ ก่อนครบชั่วโมงที่ 72 ประมาณ 50 นาที หยดสารละลาย colcemid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการแบ่งเซลล์ นำไปเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 72 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ และในทุกขั้นตอนต้องปลอดเชื้อ

2.2.6.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

หลังจากเลี้ยงเซลล์ครบ 72 ชั่วโมง นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเทใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง นำไปผสมให้เข้ากันเบาๆ บนเครื่องผสมสาร (vortex) เพื่อให้เซลล์กระจาย ใส่สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง ตามด้วยการคงสภาพเซลล์โดยดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และค่อยๆใส่น้ำยาคงสภาพทีละหยด จนครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ทำซ้ำกัน 3-4 รอบจนได้ตะกอนขาวของเม็ดเลือดขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.4 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

ก่อนการหยดเซลล์บนสไลด์ให้ปรับความเข้มข้นของเซลล์ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง และปรับความเข้มข้นด้วยน้ำยาคงสภาพให้เซลล์มีความขุ่นพอสมควร หยดเซลล์ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วลงบนสไลด์สะอาดที่ขัดด้วยน้ำยาคงสภาพ 1-2 หยด แล้วหยดตามด้วยน้ำยาคงสภาพที่เย็น 1 หยด ปล่อยให้สไลด์แห้ง ย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลายสี Giemsa ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ใน Phosphate wise buffer เป็นเวลา 5-7 นาที ตามด้วยการล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แห้ง นำไปศึกษาทั้งจำนวนเมทาเฟส และการแตกหักของโครโมโซม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.6.5 การศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์

ในการตรวจนับโครโมโซมจะนับเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสเท่านั้น เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่ออัตราการแบ่งเซลล์จะศึกษาจากค่า Mitotic index เพื่อประเมินผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบสุ่ม โดยการนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 2000 เซลล์ แล้วนำมาคำนวณหาค่า mitotic index จากสูตร

$$\text{Mitotic index} = [A / B] \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในหน่วยทดลอง

B = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในหน่วยควบคุม

2.2.6.6 การวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม

การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมศึกษาจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสที่โครโมโซมกระจายดี โดยในเซลล์นั้นต้องมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 47 โครโมโซม และนับจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกชนิดของความผิดปกติและนับจำนวนที่เกิดความผิดปกติตามชนิดของความผิดปกตินั้นดังนี้

- Single Chromatic gap (SG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนของโครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

- Isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

- Single chromatid break (SB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดแท่งหนึ่งเกิดการหักหรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักอาจอยู่หรือไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Isochromatid break (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดทั้งสองแท่งหักออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักอาจอยู่หรือไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ให้นับจำนวนหักเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

ในการคำนวณค่าเฉลี่ย จำนวนหักของโครโมโซม จะนับจำนวนหักทั้งหมด คำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา นำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละตัว กับกลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างได้จากการคัดเลือกเชื้อจำนวนทั้งหมด 33 ไอโซเลต ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยแยกได้จากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต และได้จากดินจำนวน 15 ไอโซเลต เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง และศึกษาทั้งลักษณะทางสันฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุลในบริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacers) โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ITS 1/ITS 4 สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก จึงเลือกเป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ MA 019, MA 001, MA 017 และ SNB 03 มีรายละเอียดดังนี้

MA 019 เป็นตัวแทนของกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่มีลักษณะของโคโลนีแบนราบ และเจริญเป็นวงซ้อนกัน (zonation) conidia มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเขียวขี้ม้า โดยระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน สีด้านหลังจานเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นสีจากเส้นใยที่เจริญแทรกในอาหารมีสีขาว (รูปที่ 3.1 A) และลักษณะรูปร่างของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของ conidia มีลักษณะเป็นทรงกระบอกที่มีการคอดหรือแคบตรงกลางเล็กน้อย มีความกว้างของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 3.387 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 9.720 ไมโครเมตร (รูปที่ 3.1 B) โดยมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 2.87 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มปานกลาง เมื่อมีการแบ่งกลุ่มตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia น้อย ($\leq$ 2.18) กลุ่มปานกลางที่มีอัตราส่วนมีค่าอยู่ระหว่าง 2.33-2.87 และอัตราส่วนมาก ($\geq$ 2.91)

MA 001 เป็นตัวแทนของกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีลักษณะทางสันฐานวิทยาคล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 1 และ 2 คือ โคโลนีมีลักษณะแบนราบ สีของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ในอาหารมีสีขาวถึงสีเหลือง มีการสร้าง conidia ที่มีลักษณะค่อนข้างเกาะอัดแน่น แต่ไม่เป็นแผ่นเดียวกันจึงสามารถสังเกตเห็นได้เป็นวงซ้อนกันได้บ้าง โดย conidia มีสีเขียวขี้ม้า (รูปที่ 3.1 C) และลักษณะรูปร่างของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของ conidia มีลักษณะเป็นทรงกระบอก มีความกว้างของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 3.340 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 7.289ไมโครเมตร (รูปที่ 3.1 D) และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าเพียง 2.18 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มน้อย

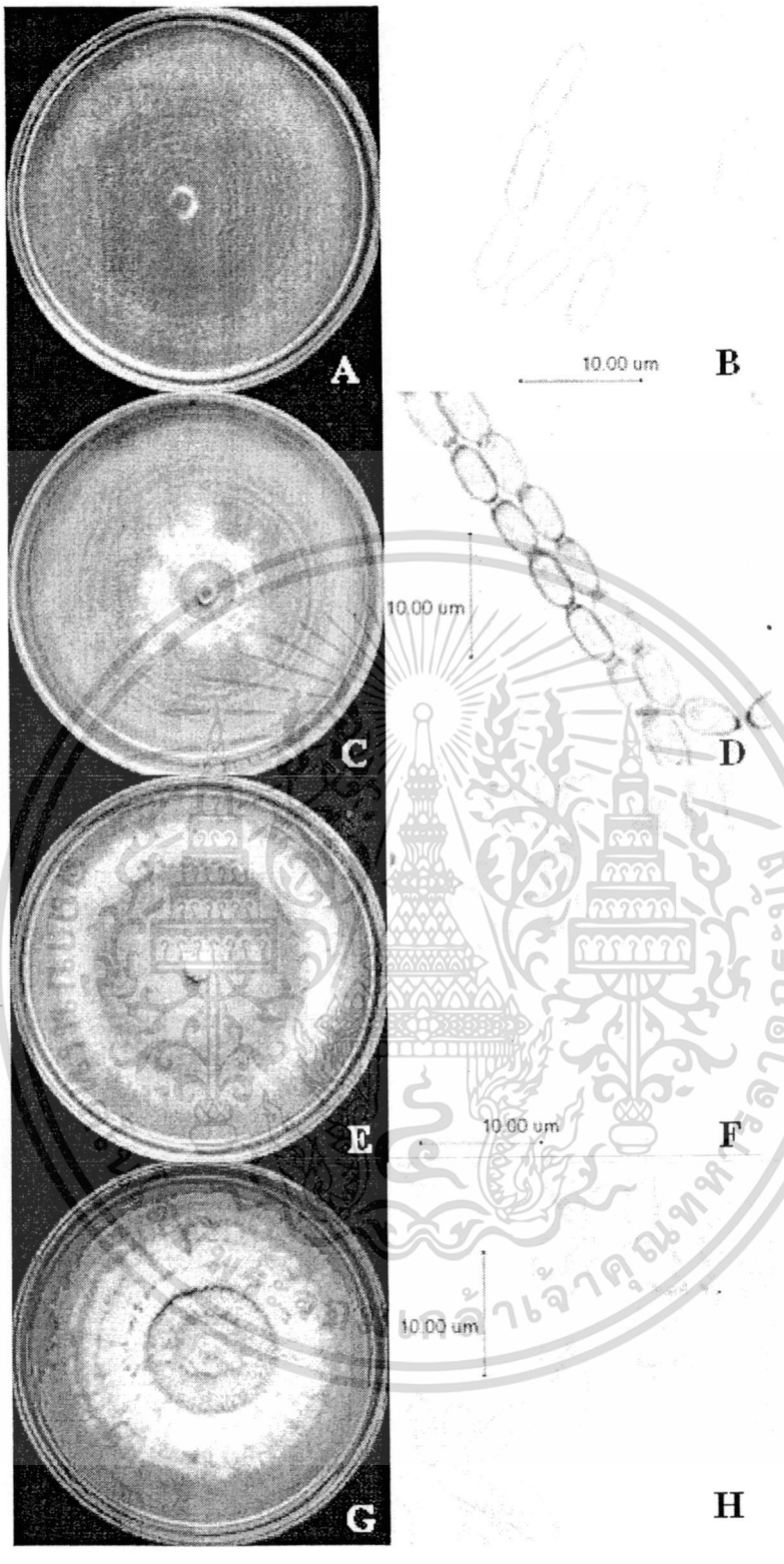
MA 017 เป็นตัวแทนของกลุ่มที่ 4 ซึ่งมีโคโลนีแบนราบ และมีการสร้างconidia จำนวนมาก เกาะแน่นเป็นแผ่นเดียวกันไม่พบการเจริญเป็นวงซ้อนกัน conidia มีสีเขียวปนเหลือง โดยระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน สีด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีสีขาวถึงสีเหลือง (รูปที่ 3.1 E) และลักษณะรูปร่างของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของ conidia มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเป็นทรงกระบอกที่มีการคอดหรือแคบตรงกลางเล็กน้อย มีความกว้างของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 3.500 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 9.225 ไมโครเมตร (รูปที่ 3.1 F) โดยมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 2.64 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มปานกลาง

และ SNB 03 เป็นตัวแทนของกลุ่มที่ 5 ซึ่งมีการสร้างเส้นใยเจริญฟูขึ้นบนผิวหน้าอาหารทำให้เห็นลักษณะของโคโลนีมีเส้นใยฟู ระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน และมีการสร้าง conidia ในปริมาณน้อย สีด้านหลังจานเพาะเลี้ยงจะมีสีน้ำตาลเข้มหรือดำแทรก (รูปที่ 3.1 G) และลักษณะรูปร่างของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของ conidia มีลักษณะเป็นทรงกระบอกที่มีการคอดหรือแคบตรงกลางเล็กน้อย มีความกว้างของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 2.419 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 5.848 ไมโครเมตร (รูปที่ 3.1 H) โดยมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 2.42 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนี และลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*; A-B: MA 019; C-D: MA 001; E-F: MA 017 และ G-H: SNB 03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยได้ทำการศึกษาจากการสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา 3 ไอโซเลต คือ MA 001, MA 019 และ SNB 03 โดยในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของไอโซเลต MA 001 พบสารทั้งหมด 16, 21 และ 14 พีค สำหรับไอโซเลต MA 019 พบสารทั้งหมด 23, 21 และ 12 พีค และไอโซเลต SNB 03 พบสารทั้งหมด 26, 29 และ 21 พีค ตามลำดับ ปริมาณสารที่พบที่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.1

โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA 001 ในชั้นเฮกเซนพบ Ergosta-5,7,22-trien-3-ol ปริมาณสูงสุดคือ 31.369 % ในชั้นเอทิลอะซิเตทพบ 9-Octadecenoic acid ปริมาณสูงสุดคือ 21.917 % และในชั้นเมทานอลพบ Hexadecanoic acid ปริมาณสูงสุดคือ 14.311 % โดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA 019 ในชั้นเฮกเซนพบ 9,12-Octadecadienoic acid ปริมาณสูงสุดคือ 37.766 % ในชั้นเอทิลอะซิเตทพบ 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo ปริมาณสูงสุดคือ 18.329 % และในชั้นเมทานอลพบ 9,12-Octadecadienoic acid ปริมาณสูงสุดคือ 26.079 % สำหรับไอโซเลต SNB03 ที่พบสารแตกต่างไป คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนพบ 4-methoxy benzo-2,1,3-thiadiazole ปริมาณสูงสุดคือ 69.00 % ในชั้นเอทิลอะซิเตทพบ 1,9-diazabicyclo ปริมาณสูงสุดคือ 46.588 % และในชั้นเมทานอลพบ 9-Octadecadienoic acid ปริมาณสูงสุดคือ 21.730 %

โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น Hexadecanoic acid หรือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid): $CH_3 (CH_2)_{14}COOH$ ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง 9-Octadecenoic acid หรือ กรดโอเลอิก (oleic acid): $CH_3 (CH_2)_7CH=CH (CH_2)_7 COOH$ และ 9, 12-Octadecadienoic acid หรือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid): $CH_3 (CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH2)_6 COOH$ ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้จึงจัดว่าเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) จากตารางที่ 3.1 พบว่าในแต่ละไอโซเลตมีปริมาณกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยไอโซเลต MA 001 และ MA 019 จะมีปริมาณกรดไขมันสูง โดยองค์ประกอบของสารในไอโซเลต MA 019 มีเฉพาะกรดไขมันเพียงอย่างเดียว แต่ไอโซเลต SNB 03 จะมีปริมาณกรดไขมันน้อย และไม่พบกรดไขมันชนิด 9, 12-Octadecadienoic acid ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

โดยเชื้อรา *M. anisopliae* จะนำคาร์บอนที่เหมาะสมจากแหล่งอาหารไปสังเคราะห์ไขมันโดยตรงจึงมีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาสามารถนำความรู้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการนำเชื้อรา *M. anisopliae* มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการด้านอุตสาหกรรม โดยมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่าง เช่น แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไขมันเพิ่มมากยิ่งขึ้น หรือปัจจัยด้านอุณหภูมิที่มีต่อปัจจัยด้านการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัว หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Somashekar และคณะ, 2001)

ในไอโซเลต SNB03 ที่พบสารแตกต่างไป คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนพบ 4-methoxy benzo-2, 1, 3-thiadiazole ปริมาณสูงสุดคือ 69.00 % โดยสารในกลุ่ม Benzothiadiazole: BTH หรือ Thiadiazole และอนุพันธ์ถูกนำมาเป็นสารกำจัดวัชพืช โดยเมื่อแทรกซึมเข้าไปในต้นพืชสามารถเหนี่ยวนำให้พืชเกิดความต้านทานโรคได้ทั้งระบบ (systemic resistance) มากกว่าการนำมาใช้เป็นฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น antiviral, antibacterial, antifungal และ antituberculous โดยตรง (Dabholkar and Ansari, 2008; Onkol และคณะ, 2008) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการกำจัดวัชพืชได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า BTH ไม่มีผลที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้งของมนุษย์ และสัตว์

ในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซนของไอโซเลต MA 001 พบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ปริมาณ 31.369 % และในไอโซเลต MA 019 พบในปริมาณ 11.618 % โดย Ergosterol เป็นสารในกลุ่มสเตรียรอล ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรวิตามินดี 2 (viosterol) และวิตามินดี 2 (ergocalciferol) ตามลำดับ โดยปริมาณของ Ergosterol จากเชื้อรา *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Candida* และ *Alternaria* มีปริมาณตั้งแต่ 0.4 - 14.3 µg/mg ซึ่งขึ้นกับชนิดของอาหาร และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จึงนิยมนำ Ergosterol มาใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Axelsson และคณะ,1995; Schnürer, 1993) เนื่องจาก Ergosterol เป็นสารประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ทำให้มีการศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งการสร้าง หรือการทำงานของ Ergosterol เพื่อใช้ผลิตยาต้านเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจาก**เส้นใย**ของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS จากตัวอย่าง MA 001, MA 019 และ SNB 03

Isolate	Hexane	Ethyl acetate	Methanol
MA001	- Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (31.369) - 9-Octadecenoic acid (19.404) - Hexadecanoic acid (15.111) - 9,12-Octadecadienoic acid (12.707)	- 9-Octadecenoic acid (21.917) - 9,12-Octadecadienoic acid (18.592) - Hexadecanoic acid (15.541)	- Hexadecanoic acid (14.311) - 9-Octadecenoic acid (11.894) - 9,12-Octadecadienoic acid (11.074)
MA019	- 9,12-Octadecadienoic acid (37.766) - Hexadecanoic acid (23.119) - 9-Octadecenoic acid (14.548) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (11.618)	- 1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo (18.329) - 9,12-Octadecadienoic acid (14.273) - Hexadecanoic acid (12.452)	- 9,12-Octadecadienoic acid (26.079) - 9-Octadecenoic acid (22.191) - Hexadecanoic acid (15.834) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (10.904)
SNB03	- 4-methoxy benzo-2,1,3-thiadiazole (69%) - 4-Methyl-1,2,3-thiadiazole	- 1,9-Diazabicyclo (46.588) - Hexadecanoic acid (10.928)	- 9-Octadecenoic acid (21.73)

ปริมาณใน () มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion

นำส่วนของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ คือ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida utilis* TISTR 5046 และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

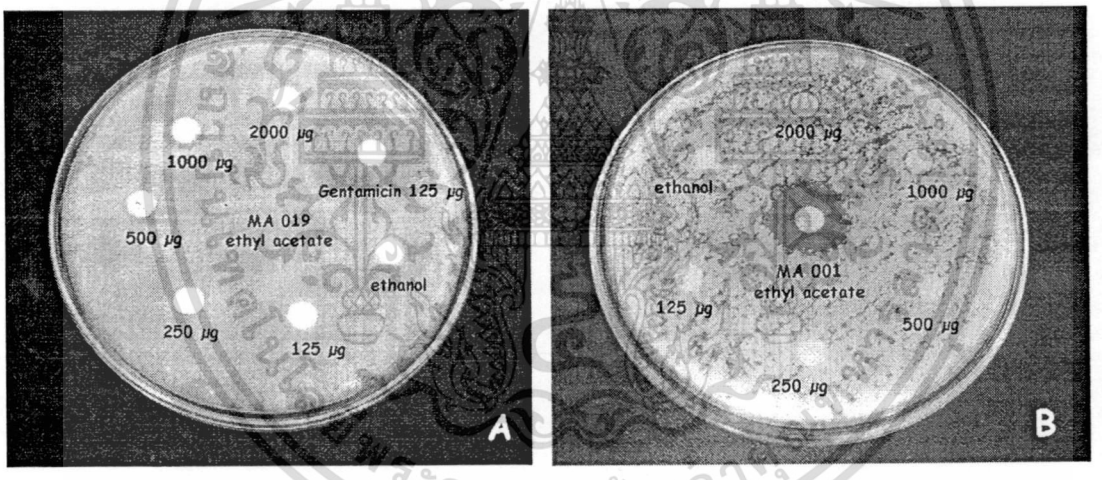
ชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเทรต และเอธานอล นั้น มีเฉพาะสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเทรต**เท่านั้นที่**สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *M. luteus* ได้เท่านั้น (รูปที่ 3.2) โดยการเกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต โดยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิด *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* และ *C. utilis* ได้ เนื่องจากไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition zone) อย่างไรก็ตามในแต่ละการทดลองมีเพียงยาปฏิชีวนะเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ได้

สำหรับสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *M. luteus* นั้น พบว่าในระดับความเข้มข้น 1000-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี แต่ที่ความเข้มข้นต่ำไม่สามารถยับยั้งได้ และในแต่ละไอโซเลตให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยไอโซเลต SNB 03 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ ดังแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญในตารางที่ 3.2 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต SNB03 พบสารแตกต่างไป คือ 1,9-Diazabicyclo ในปริมาณ 46.588 % ซึ่งมีรายงานถึงความสามารถของสารในกลุ่ม bicyclo ว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้ให้ผลต่างไปจากการการทดลองของ Lee และคณะ (2008) ซึ่งได้สกัดสารจาก *M. anisopliae* ไอโซเลต HF293 และนำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์พบว่ามีผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ 209P ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลอง อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อ *M. anisopliae* มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทั้ง สภาวะในการเพาะเลี้ยง วิธีการสกัด หรือ องค์ประกอบของสารที่สกัดได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี disk diffusion ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท

Isolate	Clear zone (mm)									
	Bacillus subtilis					*Micrococcus luteus*				
	2000	1000	500	250	125	2000	1000	500	250	125
MA 001	7.5	6.5	0	0	0	6.5	6.1	0	0	0
MA 017	6.5	6.3	0	0	0	6.3	6.3	0	0	0
MA 019	8.7	8.3	6.3	6.2	0	6.4	6.2	0	0	0
SNB 03	9.5	8.7	8	6.2	0	9.5	9.0	7.5	6.5	0



รูปที่ 3.2 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี Gentamicin และ ethanol เป็นตัวเปรียบเทียบ (A) แสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* จากสารสกัดของไอโซเลต MA 019 และ (B) แสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *Micrococcus luteus* จากสารสกัดของไอโซเลต MA 001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการของ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยเซลล์ที่มีชีวิต และมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่ไมโทคอนเดรียทำงานปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายจะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งนิยมรายงานผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50})

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells: MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer cells: HT-29), เซลล์ไตลิง (monkey kidney cells: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (leukemia cell in rats: P388) นำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิจารณาในแต่ละไอโซเลต จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.3 โดยมีรายละเอียดดังนี้

ไอโซเลต MA 001 ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) เท่ากับ 160.879, 172.406 และ 1083.054 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีผลต่อเซลล์ชนิด Vero โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด Vero ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 927.603 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ไอโซเลต MA 017 ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลมีผลต่อเซลล์ชนิด HT 29 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด HT 29 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1674.239, 251.890 และ 244.979 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีผลต่อเซลล์ทุกชนิด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด Vero, P388, MCF7 และ HT29 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 179.860, 284.450, 192.494 และ 251.890 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต MA 019 ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท มีผลต่อเซลล์ทุกชนิด โดยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด Vero, P388, MCF7 และ HT29 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 565.568, 479.221, 1717.875 และ 1716.771 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด Vero, P388 และ MCF7 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1875.125, 390.453 และ 512.624 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในไอโซเลต SNB 03 มีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 770.076 และ 1941.709 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นที่มีระดับต่ำสุดที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA 001 ในชั้นเฮกเซนมีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 160.879 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในไอโซเลต MA 001, MA 017, MA 019 และ SNB 03 เท่ากับ 172.406, 284.450, 390.453 และ 770.076 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA 017 มีแนวโน้มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆ มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด Vero, P388, MCF7 และ HT29 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 179.860, 284.450, 192.494 และ 251.890 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบยาปฏิชีวนะชนิด Mitomycin C กับเซลล์ชนิดต่าง เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวก โดย Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) ในเซลล์ชนิด MCF-7, HT-29, Vero cell และ P388 เท่ากับ 52.49, 99.34, 88.15 และ 49.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ซึ่งการศึกษาสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae* นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Skrobek และ Butt (2005) ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ไอโซเลต V275 เปรียบเทียบกับสาร Destruxin ต่อเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human promyelocytic leukemia cell line: HL-60) พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อเซลล์ชนิด HL-60 โดยมีค่า LC_{50} ที่ 193 ppm เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda*: Sf9 เมื่อใช้ความเข้มข้น 500 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับสาร Destruxin มีผลต่อเซลล์แมลงโดยมีค่า LC_{50} ในช่วง 5-12 ppm และการศึกษาของ Skrobek และคณะ (2006) ที่ศึกษาสารสกัดจาก *M. anisopliae* ไอโซเลต V275 และ V245 เปรียบเทียบกับสารสกัดจาก *Stagonospora convolvuli* และ Destruxin A โดยทดสอบกับเชื้อ *Pseudomanas syringae*, โปรโตซัว (*Tetrahymena pyriformis*) หนอนตัวกลม (*Daphnia magna*) เซลล์ชนิด HL-60 และ Sf9 ซึ่งสารสกัดหยาบจากไอโซเลต V275

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ V245 ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *P. syringae* ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และไม่เป็นพิษต่อ *T. pyriformis* แต่มีความเป็นพิษต่อ *D. magna* โดยมีค่า LC_{50} เท่ากันที่ 0.01 ppm ทั้งในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และให้ผลในเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยเมื่อทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ HL-60 สารสกัดจากไอโซเลต V275 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 221 และ 193 ppm ที่เวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สารสกัดจากไอโซเลต V245 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 303 ppm ที่เวลา 4 ชั่วโมง และมีค่า LC_{50} มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ชนิด Sf9 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้น 500 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลอง อาจกล่าวได้ว่าสารชีวภาพจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยมีภาวะเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ หรือต้องใช้ระดับความเข้มข้นของปริมาณสารในระดับที่สูงจึงจะแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบนี้มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น ซึ่งควรมีการศึกษาระดับความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิตต่อไปด้วย เนื่องจากการนำสารชีวภาพมาใช้ควรต้องคำนึงถึงความปลอดภัย อีกทั้งการตกค้างในธรรมชาติ ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการประเมินความเป็นพิษของสารชีวภาพ เป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อตรวจสอบ และยืนยันว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์เพียงใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ชนิดต่างๆด้วยวิธี MTT assay

Isolate	Crude extract	50% cytotoxic concentration: CC_{50} (µg/ml)			
		Vero cell	P388 cell	MCF7 cell	HT29 cell
MA001	Hexane	≥ 2000	160.879	≥ 2000	≥ 2000
	Ethylacetate	927.603	172.406	≥ 2000	≥ 2000
	Methanol	≥ 2000	1083.054	≥ 2000	≥ 2000
MA017	Hexane	1611.185	≥ 2000	≥ 2000	1674.239
	Ethylacetate	179.860	284.450	192.494	251.890
	Methanol	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	244.979
MA019	Hexane	565.568	479.221	1717.875	1716.771
	Ethylacetate	1875.125	390.453	512.624	≥ 2000
	Methanol	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
SNB 03	Hexane	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
	Ethylacetate	≥ 2000	770.076	≥ 2000	≥ 2000
	Methanol	≥ 2000	1941.709	≥ 2000	≥ 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA 017 มีแนวโน้มมีความเป็นพิษมากที่สุด จึงเลือกมาเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยจากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการแบ่งเซลล์ หลังการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเติมสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และ Mitomycin C ที่ใช้เป็นกลุ่ม positive control และน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่ม negative control ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ และกระจายเซลล์บนสไลด์ เมื่อนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดจำนวน 2,000 เซลล์ และคำนวณจำนวนเซลล์เมทาเฟส นำไปหาค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic index) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใส่เฉพาะน้ำกลั่น ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3.4 ดังนี้

ตารางที่ 3.4 แสดงผลของสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA 017 ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำกลั่น และ Mitomycin C ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

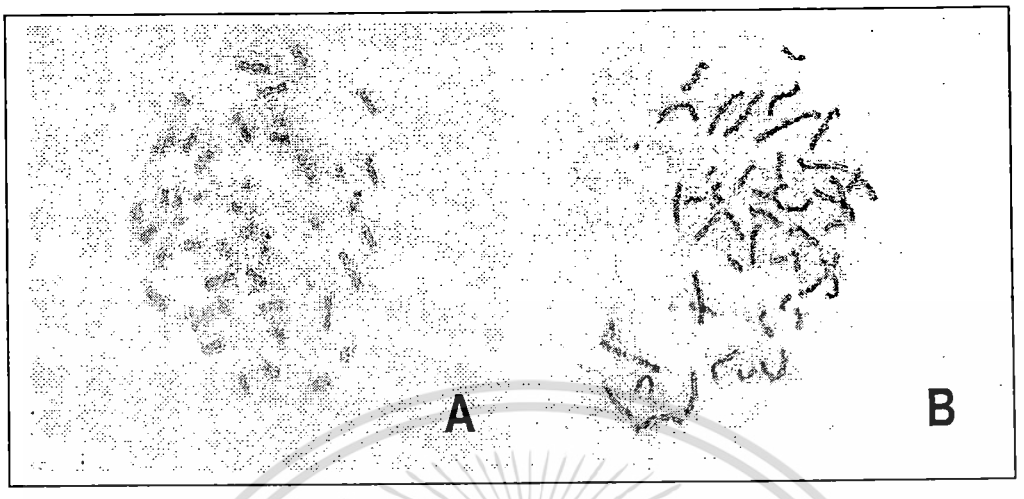
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากจากเส้นใย	จำนวนซ้ำ	ค่า Mitotic index (%)		
		เฮกเซน	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล
Negative Control	3	100[a]	100[a]	100[a]
40 µg/ml	3	69.57[b]	68.42[b]	66.66[b]
80 µg/ml	3	32.60[c]	44.74[c]	42.86[c]
Possitive Control 10 µg/ml	3	25.50[d]		

หมายเหตุ : อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความค่าแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA 017 ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำกลั่น และ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าในกลุ่มที่เติมเฉพาะน้ำกลั่นไม่พบความผิดปกติ (รูปที่ 3.3 A) สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบความผิดปกติน้อยมาก โดยพบเพียง single chromatid gap เพียง 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำแหน่งเท่านั้น แตกต่างจาก Mitomycin C ที่แสดงความผิดปกติของโครโมโซมทั้งชนิด single chromatid gap, isochromatid gap และ single chromatid break (รูปที่ 3.3 B)



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน A: โครโมโซมของคนปกติ และ B: ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
สรุป และเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *M. anisopliae* ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในอาหารเพาะเลี้ยง รวมทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยได้คัดเลือกเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลต คือ MA 019, MA 001, MA 017 และ SNB 03 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ด้วยการศึกษาทั้งลักษณะทางสันฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุลในบริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacers) โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ITS 1/ITS 4 ที่สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก จึงคัดเลือกมาเพียง 4 ตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตัวแทน

เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของ *M. anisopliae* ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา 3 ไอโซเลต คือ MA 001, MA 019 และ SNB 03 ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยสารที่พบโดยส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น hexadecanoic acid หรือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง 9-Octadecenoic acid หรือ กรดโอเลอิก (oleic acid) และ 9, 12-Octadecadienoic acid หรือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) รวมทั้ง 4-methoxy benzo-2, 1, 3-thiadiazole และ Ergosterol ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสเตรียรอล และเป็นสารประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา โดยในแต่ละไอโซเลตให้สารที่แตกต่างกัน จึงมีแนวโน้วในการนำเชื้อรานี้มาใช้ประโยชน์ในเรื่องของการผลิตกรดไขมันเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการด้านอุตสาหกรรม

เมื่อนำส่วนของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ คือ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบ คือ *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Candida utilis* มีเฉพาะสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *M. luteus* ได้ ในระดับความเข้มข้น 1000-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเสต SNB 03 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์ไตลิง (Vero) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (P388) ด้วยวิธี MTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

assay ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500, 1000 และ 2000 µg/ml) พบความแป็นเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50 % (50% Cytotoxicity Concentration) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในไอโซเลต MA 001, MA 017, MA 019 และ SNB 03 เท่ากับ 172.406, 284.450, 390.453 และ 770.076 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA 017 มีแนวโน้มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆ มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด Vero, P388, MCF7 และ HT29 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 179.860, 284.450, 192.494 และ 251.890 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในทุกความเข้มข้นในทุกๆตัวทำละลาย ไม่มีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซม โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงถึงความปลอดภัยระดับหนึ่งในการนำเชื้อรา *M. anisopliae* มาใช้ในสภาพแวดล้อม จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือด เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นฤมล ตั้งธีระสุนันท์, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, เกษม สร้อยทอง, พิมพ์พรรณ สมมาตย์ และเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2552. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS, ใน การประชุมวิชาการแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาวิทยาศาสตร์.

Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman M.L. and Butt T.M. 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. Mycol Res. 104: 447-452.

Ansari, M.A., Vestergaard, S., Tirry, L. and Moens, M. 2004. Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. J. Invertebr. Pathol. 85: 89-96.

Axelsson, B.-O., Saraf, A. and Larsson L. 1995. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. 666: 77-84.

Aziz, D.M. 2006. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. Animal Reproduction Science. 92:1-8.

Blanford, S., Chan, B.H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R.J., Read, A.F., and Thomas, M.B. 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. Science. 308: 1638–1641.

Brett, H.K., Eun-Min, C. and Nemat, O.K. 2004. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Biol. Control. 31: 414-421.

Bridge, P.D., Williams, M.A.J., Prior, C. and Paterson, R.R.M. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Journal of General Microbiology. 139: 1163-1169.

Bridge P. D., C. Prior, J. Sagbohan, C. J. Lomer, M. Carey and A. Buddie. 1997. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. Biodi. and Cons. 6: 177-189.

Bidochka M. J., A. M. Kamp, T. M. Lavender, J. Dekoning and J. N. A. De Croos. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* : uncovering cryptic species. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1335-1342.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bidochka, M.J. and Small, C.L. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: Vega, F.E. and Blackwell, M. editors. Insect-fungal associations ecology and evolution. Oxford. University Press. pp. 28-50.

Buchwaldt, L. and J.S. Jensen. 1991. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. Phytochemistry 30: 2311-2316.

Bugeme, D.M., Knapp, M., Boga, H.I., Wanjoya, A.K. and Maniania, N.K. 2009. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. Mycopathologia. 167: 221–227.

Cai, P., D. Smith, B. Katz, C. Pearce, D. Venables and D. Houck. 1998. Destruxin-A4 chlorohydrin, a novel destruxin from fungus OS-F68576: isolation, structure determination, and biological activity as an inducer of erythropoietin. J. Nat. Prod. 61: 290-293.

Chen, H.C., C.K. Chou, C.M. Sun and S.F. Yeh. 1997. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. Antiviral Res. 34: 137-144.

Dabholkar, V.V. and Ansari, F. Y. 2008. Synthesis and biological studies of bis (thiadiazole/triazole) by sonication. Acta Pol Pharm. 65: 521-526.

Dong, C., Zhang, J., Chen, W., Huang, H. and Hu, Y. 2007. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenic analysis. Microbiological. 162: 53-61.

Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research. 104: 134-150.

Dumas, C., Robert, P., Pais, M., Vey, A., and Quiot, J.M. 1994. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 108: 195–203.

Dumas, C., Matha, V., Quiot, J. M. and Vey, A. 1996a. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 114: 213-219.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fegan, M., Manners, J.M., MacLean, D.J., Irwin, J.A.G., Samuels, K.D.Z., Holdom, D.G. and Li, D.P. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliue* var. *anisopliae.* Journal of General Microbiology. 139: 2075-2081.

Fornelli, F., Minervini, F. and Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). J. Invert. Pathol. 85: 74-79.

Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C., Pizzarani-Kleiner, A.A. and de Azevedo, J.L. 1996. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. Letters in Applied Microbiology. 22: 389-392.

Gillespie A. T. and N. Claydon. 1989. The use of entomopathogenic fungi for pets control and the role of toxins in pathogenesis. Pestic. Sci. 27: 203-215.

Gupta, S., D.W. Roberts, and J. A. A. Renwick. 1989. Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2347-2357.

Gupta, S., Krasnoff, S. B., Renwick, J. A. A., Roberts, D. W., Steiner, J. R., and Clardy, J. 1993. Viridoxins A and B: Novel toxins from the fungus, *Metarhizium flavoviridae.* J. Organic. Chemistry, 58, 1062–1067.

Hansen, J. and P. Bross. 2010. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. Methods in Molecular Biology Part 2: 303 – 311.

Hsiao, Y.M. and Ko, J.L. 2001. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. Toxicon. 39: 837-841.

Iijima, M., Masuda, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Kurasawa, S., Okami, Y., Ishizuka, M., Takeuchi, T., and Iitaka, Y. 1992. Metacytofilin, a novel immunomodulator produced by *Metarhizium* sp. TA2759. J. Antibiotics. 45: 1553–1556.

Issa, Y., Watts, D.C., Brunton, P.A., Waters, C.M. and Duxbury, A.J. 2004. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human fibroblast in vitro. Dental Materials. 20: 12-20.

Jestoi, M., Somma, M.C., Kouval, M., Veijalainen, P., Rizzol, A., Ritieni, A. and Peltonen, K. 2004. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. Mol. Nutr. Food Res. 48: 299-307.

Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S. E., and Charnley, A.K. 1999. The

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. J. Invert. Pathol. 74: 213–223.

Kopecky, J., V. Matha and A. Jegorov. 1992. The inhibitory effect of destruxin A on the replication of arboviruses in *Aedes albopictus* C6/36 cell line. Comp. Biochem. Physiol. 103: 23-25.

Kuboki, H., Tsuchida, T., Wakazono, K., Isshiki, K., Kumagai, H., and Yoshioka, T. 1999. Mer-f3, 12-Hydroxy-ovalicin, produced by *Metarrhizium* sp. f3. J. Antibiotics 52: 590–593.

Lee S. Y., Kinoshita H., Ihara F., Igarashi Y., and Nihira T. 2008. Identification of novel derivative of helvolic acid from *Metarhizium anisopliae* Grown in Medium with Insect Component J. Biosci. Bioeng, 105, 476–480.

Mavridou, A. and Typas, M.A. 1998. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. Mycological Research. 102: 1233-1241.

Mohla, S, M. j. Humphries, S. L. White, K., Matsumoto, S. A, Newton, C. C, Sampson, D. Bowen and K. Olden. 1989. Swainsonine: a new antineoplastic immunomodulator. J. Natl. Med. Assoc. 8: 1049-1056.

Nemr, A. E. 2000. Synthetic methods for the stereoisomers of swainsonine and its analogues. Tetrahedron. 56, 8579–8629.

Onkol, T., Dogruer, D.S, Uzun, L., Adak, S., Ozkan, S. and Sahin, M.F. 2008. Synthesis and antimicrobial activity of new 1, 2, 4-triazole and 1, 3, 4-thiadiazole derivatives. J Enzyme Inhib Med Chem. 23: 277-284.

Oselys R. J., Chrissana S. C., Victor H. P., Ranulfo M. A. 2007. Screening of *Metarhizium* spp. strains for anticancer indolizindine alkaloid production and its rapid detection by MS analysis. Bra. J. Microbiol. 38: 780-784.

Pais, M., B.C. Das, and P. Ferron. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. Phytochemistry 20: 715-72.

Pantou, M.P., Mavridou, A. and Typas, M.A. 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fungal Genetics and Biology. 38: 159-174.

Roberts, D.W., 1966. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. II.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Symptoms and detection in moribund hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 8, 222–227.

Samson, P.R., Staier, T.N. and Bull, J.I. 2006. Evaluation of an application procedure for *Metarhizium anisopliae* in sugarcane ratoons for control of the white grub *Dermolepida albohirtum*. Crop. Protection. 25: 741-747.

Schnürer, J. 1993. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. Appl. Environ. Microbiol. 59: 552-555.

Seger, C., Eberhart, K., Sturm, S., Strasser, H. 2006. Apolar chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography High yield strategy for structurally closely related analytes-Destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case study. J. Chroma. 1117: 67-73.

Skrobek, A. and T. M. Butt. 2005. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 251: 23–28.

_____, Boss, D., G. Defago, TM. Butt, Maurhofer, Monika. 2006. Evaluation of different biological test systems to assess the toxicity of metabolites from fungal biocontrol agents. Toxicology Lett. 161: 43–52.

Sun, J., Fuxa, J. R., and Henderson, G. 2003. Effects of virulence, sporulation and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in nests of *Coptotermes formosanus*. J. Invert. Patho. 84: 38-46.

Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Srividya, C., Krishnanand, S.K. and Lokesh, B.R. 2001. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17: 317-320.

Tangthirasunun, N., S. Poeaim, K. Soytong, P. Sommartya, and S. Popoonsak. 2010. Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. J. Agr. Tech. 6(2): 317-329.

Wang, C. Skrobek, A. and Butt, T.M. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invert. Pathol. 85: 168-174.

Yeh, S.F., Pan, W., Ong, G.T., Chiou, A.J., Chuang, C.C., Chiou, S.H. and Wu, S.H. 1996. Study of structure–activity correlation in destruxins, a class of Cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 229: 65-72.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the ~~entomopathogenic~~ fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. 17: 879-920.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้