การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง: *Beauveria bassiana* และ *Beauveria brongniartii*

Biological Activities of Crude Extracts from Entomopathogenic Fungi: *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*

ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง: *Beauveria bassiana* และ *Beauveria brongniartii*

Biological Activities of Crude Extracts from Entomopathogenic Fungi: *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*

ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

RCH QR245 ส831ก

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา
สาเหตุโรคในแมลง: *Beauveria bassiana* และ *Beauveria brongniartii*

(ภาษาอังกฤษ) Biological Activities of Crude Extracts from Entomopathogenic Fungi: *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงิน 300,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 - 30 กันยายน 2554

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail: poeaim@hotmail.com

คำสำคัญ: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, ความเป็นพิษต่อเซลล์, ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม,

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, Cytotoxicity, Genotoxicity

บทคัดย่อ

เชื้อราสกุล *Beauveria* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน และแมลง ถูกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยชีววิธี (biological control) เพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร beauvericin (BEA) และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* (ไอโซเลต A และไอโซเลต B) และ *Beauveria brongniartii* (ไอโซเลต C และไอโซเลต D) โดยการนำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิด Yeast Extract Sucrose (YES) เป็นระยะเวลา 1 เดือน มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (MCF-7) และเซลล์ไตของลิง (Vero cell) ในหลอดทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. brongniartii* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงความเป็นพิษต่อทุกเซลล์ และเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท Lymphocyte มากที่สุด โดยไอโซเลต B มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด (CC_{50} = 220.55 µg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับสาร beauvericin ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดเช่นกัน (CC_{50} = 2.25 µg/ml) ในการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ต่อเซลล์ชนิด P388 ด้วยวิธี Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเมื่อทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสูงสุด คือ 80 µg/ml และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด (*Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212) ด้วยวิธี disc diffusion ให้ผลเช่นเดียวกับความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมที่สารสกัดหยาบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 2000 µg/ml โดยสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ Hexadecanoic acid, 9, 12-Octadecanoic acid และ 9-Octadecanoic acid จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Beauveria* ขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งจากตัวทำละลาย ชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบ ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ และสายพันธุ์ของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Beauveria sp. is entomopathogenic fungi that found in soil and insects. *Beauveria* sp. is 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 *Beauveria* sp. were investigated. The cytotoxicity of beauvericin (BEA) and crude extracts from *Beauveria bassiana* (isolate A and isolate B) and *Beauveria brongniartii* (isolate C and isolate D) were determinated. The mycelium was cultured in Yeast Extract Sucrose (YES) broth for one month and was extracted using maceration technique with different organic solvents (hexane, ethyl acetate and ethanol). Crude extracts and beauvericin were investigated for their cytotoxic activity against for four cell lines: murine leukemia cell (P388), human colon adenocarcinoma cell (HT-29), human breast cancer cell (MCF-7) and African green monkey kidney cell (Vero cell) in culture using the MTT assay. The crude extracts from *B. brongniartii* were exhibited the low cytotoxic effect on cell lines. The hexane extracts from *B. bassiana* were exhibited the most effective cytotoxic activity for every cell lines. The hexane extract from isolate B exhibited the most potent cytotoxic activity against P388 cell line (CC_{50} = 220.55 µg/ml) like a beauvericin (CC_{50} = 2.25 µg/ml). For apoptosis test, cell apoptosis was evaluated in P388 cell line using Annexin V/PI staining assay by fluorescence flow cytometry. The hexane and ethyl acetate extracts from *B. bassiana* (isolate B) were exhibited the most effective apoptosis activity. However, no genotoxic activity was observed in human lymphocytes cell culture at maximum concentration (80µg/ml). Crude extracts were tested against 4 pathogenic (*Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* DMST 4212) using disc diffusion methods. Like genotoxic activity, crude extracts were not inhibited those bacteria at concentrations lower than 2000 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. In this study, the crude extracts from *Beauveria* sp. induced cytotoxic effect to mammalian cells that showed differences between the extraction solvents, cell types and concentration in the crude extracts as well as the isolation of fungus.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2554 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III
กิตติกรรมประกาศ.....IV
สารบัญ.....V
สารบัญตาราง.....VI
สารบัญรูป.....VII

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.....12
2.1 วัสดุ อุปกรณ์.....12
2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....12
2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....12
2.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย.....12
2.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....12
2.1.5 วัสดุ และสารเคมี.....13
2.2 วิธีการทดลอง.....14
2.2.1 การคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Beauveria* เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....14
2.2.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *B. bassiana* และ *B. brongniartii*.....15
2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion.....16
2.2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....18
2.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....19
2.2.6 การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis.....20
2.2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....20

บทที่ 3 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....23
3.1 การคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Beauveria* เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....23
3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion.....29
3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์.....31
3.5 การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis.....37
3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม.....40

บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ.....42

บรรณานุกรม.....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS 27
3.2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS 28
3.3 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารละลาย beauvericin ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay.....32
3.4 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบ จากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ต่อเซลล์ชนิดต่างๆด้วยวิธี MTT assay.....33
3.5 แสดงค่าร้อยละของเซลล์ชนิด P388 ที่มีชีวิต เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรก และเซลล์ที่เกิด apoptosis ระยะท้าย จากกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบ ของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จาก Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescent flow cytometry.....40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 แสดงโครงสร้างของ beauvericin (BEA) ที่มีลักษณะแบบ Cyclic hexadepsipeptide.....6
2.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *Beauveria*.....16
2.2 แสดงตำแหน่งการวาง paper disc เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....18
3.1 แสดงลักษณะของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B015 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยแสดงผลต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) และ *Escherichia coli* (C) ที่เพาะเลี้ยงรวมกันเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง 24
3.2 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี Gentamicin และ ethanol เป็นกลุ่มควบคุม และในกลุ่มทดลอง คือ *Staphylococcus aureus* (A), *Bacillus cereus* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C) และ *Escherichia coli* (D) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....30
3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ beauvericin ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ 4 ชนิด คือ P388, HT-29, MCF-7 และ Vero cell lines.....32
3.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และไอโซเลต B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388.....34
3.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย เฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A (A) และไอโซเลต B (B) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388, MCF-7, HT-29 และ Vero cell.....35
3.6 แสดง dot plot histogram จาก Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry ของกลุ่มควบคุม (A) และสารสกัดหยาบจาก เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซน (B) เอทิลอะซิเตท (C) และเอทานอล (D) ที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ P388 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (A) โครโมโซมของคนปกติ
และ (B) ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C
ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพื่อให้เพียงพอกับจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นมีผลต่อความต้องการปริมาณพื้นที่ในการเพาะปลูกมากขึ้นทำให้เกิดการทำลายพื้นที่ป่า ซึ่งมีผลกระทบต่อต้นน้ำ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และสิ่งมีชีวิตซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกันอย่างสมดุล และมีการใช้สารเคมีในพื้นที่การเกษตรในปริมาณสูงมากขึ้น ก่อให้เกิดสารพิษปนเปื้อนในดิน น้ำ อากาศ และในผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค จากปัญหาสภาวะแวดล้อมดังกล่าวจึงมีการส่งเสริมให้มีการทำการเกษตรแบบเกษตรอินทรีย์ (organic agriculture) มากขึ้น ซึ่งการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) เป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้กันมากในปัจจุบัน ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ แต่ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบคือการระบาดของแมลงศัตรูพืช การควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้ และผู้บริโภค รวมทั้งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

เชื้อราสาเหตุโรคแมลง (entomopathogenic fungi) เป็นการควบคุมโดยชีววิธีวิธีหนึ่ง โดยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมีคุณสมบัติในการทำลายแมลงได้ เชื้อราที่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (biopesticide) มีหลายสกุล เช่น *Entomophthora*, *Verticillium*, *Beauveria* , *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Cordyceps*, *Culicinomyces* และ *Paecilomyces* เป็นต้น โดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรามีทั้งการสร้างเส้นใยแพร่กระจายไปทั่วตัวแมลงอาศัย (host) มีผลทำให้แมลงขาดอากาศ หรือเส้นใยของเชื้อราใช้น้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย รวมทั้งการสร้างสาร เช่น destruxin จากเชื้อราในสกุล *Metarhizium*, hissutellin จากเชื้อราในสกุล *Hirsutella* และ beauvericin จากเชื้อราในสกุล *Beauveria* และ *Fusarium* เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลง และเป็นสารพิษทำให้แมลงตายได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีแนวโน้มในการนำไปเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดแมลง (insecticide) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ซึ่งสารนี้จะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ค้นพบมีทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (anti-malaria) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungus) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (anti-viral) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ต้านวัณโรค (anti-tuberculosis) เป็นต้น โดยสารดังกล่าวควรมีความจำเพาะเจาะจง และจะต้องมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์น้อยที่สุด

ในประเทศไทยได้มีการนำเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงมาใช้ในการเกษตรแล้วหลายชนิด เช่น *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Hirsutella thompsonii*, *Paecilomyces* sp. และ *Nomuraea rileyi* เป็นต้น และจากผู้วิจัยทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* พบสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสังเกตเห็นบริเวณ clear zone ได้อยู่เสมอ ซึ่งนำไปสู่ความสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาถึงสารเคมีที่มีอยู่ในเชื้อราสาเหตุโรคแมลงนี้ พร้อมกับศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว โดยส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ

โดยในการศึกษาครั้งนี้มีแนวคิดที่จะนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* ที่พบมากในประเทศไทย 2 สปีชีส์ คือ *B. bassiana* และ *B. brongniartii* มาสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติหรือกับเซลล์มะเร็ง รวมทั้งความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม เพื่อพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ทั้งในทางการเกษตรและการแพทย์ โดยข้อมูลที่เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งการต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ยังมีอยู่น้อย ผลที่ได้จากงานวิจัยอาจมีส่วนช่วยสนับสนุนหรือส่งเสริมการพัฒนาวิธีการใช้สารสกัดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยตรง หรือนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง การรักษาโรคติดเชื้อ รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำให้ทราบถึงระดับความปลอดภัยของสารที่อาจตกค้างหรือปนเปื้อนที่ก่อให้เกิดอันตราย ที่ใช้ในการดำเนินงานในระบบการผลิต ระบบการรับรอง และการตรวจสอบสินค้าเกษตรอินทรีย์ เพื่อการกำหนดมาตรฐานคุณภาพของสินค้าที่มีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้ผลิต ผู้บริโภค และรักษาสภาพแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1.2.1 ศึกษาถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ได้จาก *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.2.2 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จาก *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ปกติที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ด้วยวิธี Methyl tetrazolium (MTT) assay

1.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบที่ได้จาก *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ด้วยวิธี MTT assay

1.2.4 ศึกษาการตายของเซลล์ชนิด apoptosis ด้วยวิธี Annexin V/PI staining assay ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry

1.2.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดหยาบที่ได้จาก *B. bassiana* และ *B. brongniarti* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในอาหารเพาะเลี้ยง และหาระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว และชนิดของการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเฉพาะ *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่ได้จากการรวบรวมจากสถานที่ต่างๆ ในประเทศ และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางสัณฐานวิทยา และระดับโมเลกุล ที่ผู้วิจัยศึกษามาก่อนหน้านี้ และนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 เป็นต้น การศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ปกติและเซลล์มะเร็ง เช่น เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) เซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (in vitro) และศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในหลอดทดลองเท่านั้น

1.4 ทฤษฎี

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

โดยส่วนใหญ่เชื้อรากลุ่มนี้จะเป็น 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 เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงบางชนิดจะตายในขณะที่ไมซีเลียมเจริญเติบโตทั่วตัวแมลงอาศัยทำให้แมลงขาดอากาศหรือตาย รวมทั้งบางชนิดแมลงอาศัยจะตายเนื่องจากสารพิษที่เชื้อราปล่อยออกมาในช่วงเริ่มต้นของการเข้าทำลาย โดยเชื้อราจะสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารพิษ (mycotoxin) คือสารพิษธรรมชาติที่สร้างจากเชื้อรา เช่น destruxins และ cytochalasin C จากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* หรือ bassianin, beauvericin, bassianolide, beauverolide และ tenellin จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* หรือ oosporein จากเชื้อรา *Beauveria brongnairtii* โดยสารพิษเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตายได้ เมื่อแมลงตายแล้วจึงสร้างเส้นใยบนซากแมลง ดูดน้ำเลี้ยงและสารอาหารจากแมลงทำให้ซากแมลงแห้ง จากนั้นเส้นใยส่วนที่อยู่ภายนอกจะสร้างสปอร์ และฟุ้งกระจายเข้าสู่วงจรการทำลายต่อไป

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ แต่ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบคือการระบาดของโรคพืช และแมลงศัตรูพืช การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการนำเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและมีคุณสมบัติในการทำลายแมลงได้มาใช้มากขึ้น แต่ปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากรา (mycotoxin) มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและต่อสุขภาพของมนุษย์ สารพิษจากเชื้อราที่เป็นปัญหา คือ aflatoxin (จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus*) ที่เป็นพิษต่อตับ นอกจากนั้นยังมี sterigmatocystin (จาก *Aspergillus versicolor*) zearalenone (จากเชื้อราในสกุล *Fusarium*) ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นพิษต่อระบบฮอร์โมนในเพศหญิง 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 แต่ยังไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษกับระดับความเข้มข้นของสารพิษจากเชื้อรานั้นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการที่เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงมีการนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดมาสกัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบคุณสมบัติเพื่อพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ (Blanford และคณะ, 2005) รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำให้ทราบถึงระดับความปลอดภัยของสารที่อาจตกค้างหรือปนเปื้อนที่ก่อให้เกิดอันตราย ที่ใช้ในการดำเนินงานในระบบการผลิต ระบบการรับรอง และการตรวจสอบสินค้าเกษตรอินทรีย์ เพื่อการกำหนดมาตรฐานคุณภาพของสินค้าที่มีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้ผลิต ผู้บริโภค และรักษาสภาพแวดล้อม

เชื้อราในสกุล *Beauveria* เป็นเชื้อราที่นำมาใช้ในลำดับแรกๆ และเพิ่มมากขึ้น เชื้อราสกุล *Beauveria* จัดเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง (Entomopathogenic fungi) ปัจจุบันเชื้อราสกุล *Beauveria* มีรายงานไว้อย่างน้อย 7 สปีชีส์ ได้แก่ *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata*, *B. amorpha*, *B. malawiensis*, *B. vermiconia* และ *B. caledonica* (Rehner และคณะ, 2006) ซึ่งสามารถพบและแยกได้จากแมลงและดิน เชื้อราสกุล *Beauveria* ที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมี 2 สปีชีส์ คือ *B. bassiana* และ *B. brongniartii* เนื่องจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีฤทธิ์รุนแรงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช และสามารถทำลายแมลงได้หลากหลายชนิด

ในการบ่งชี้โดยส่วนใหญ่ใช้การศึกษารูปร่างลักษณะภายนอก โดยลักษณะของ *B. bassiana* ในระยะ teleomorph จะมีสโตรมาสีเหลืองหรือเหลืองอมส้ม เจริญขึ้นมาจากตัวแมลงอาศัย หรือโพล่ขึ้นมาพ้นผิวดิน ในระยะ anamorph โคนิเดียและเส้นใยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มช่อขนาดใหญ่ โคนิเดียมีลักษณะทรงกลม เจริญอยู่บนโคนิดิโอจีนัสเซลล์ (conidiogenous cell) ที่มีลักษณะคล้ายแจกัน (flask-shaped) หรือทรงกระบอก (subcylindrical) (Li และคณะ, 2001) โคโลนีเรียบเป็นฝุ่นคล้ายแป้ง ผิวหน้าแตก ผิวสีด้านล่างของอาหารจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร เช่น ในอาหาร PDA จะไม่มีสี สำหรับ *B. brongniartii* ในระยะ teleomorph มีสโตรมายาวออกมาเช่นกัน แต่ในระยะ anamorph โคนิเดียมีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ โคโลนีสีขาวอมเหลือง เส้นใยฟูอัดตัวกันค่อนข้างแน่น เมื่อเขี่ยจะราบไปกับผิวของอาหาร แต่อย่างไรก็ตามการจำแนกสปีชีส์ทำได้ยากเนื่องจากโครงสร้างของเชื้อราเจริญเป็นกลุ่มแบบแตกออกจากกอ และลักษณะโคโลนีมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายตามสภาพแวดล้อม ดังเช่น Rehner และ Buckley (2005) สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยอาศัยรูปร่างสปอร์ได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม A สปอร์มีรูปทรงกลม ขนาด 2.3-3.2 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana*, กลุ่ม B สปอร์มีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ ขนาด 3.3-4.8 × 2.1-2.5 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ เชื้อรา *B. brongniartii*, กลุ่ม C สปอร์มีรูปทรงกลมแต่ขนาดเล็กกว่ากลุ่ม A ขนาด 2.1-2.9 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana*, กลุ่ม D สปอร์มีรูปทรงกระบอก ขนาด 3.8-5.2 × 1.9-2.3 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. calendonica* และ *B. vermiconia*, กลุ่ม E สปอร์มีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่แต่สปอร์ยาวกว่ากลุ่ม B ขนาด 3.0-4.4 × 2.5-3.2ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *Cordyceps* sp. กลุ่ม F สปอร์มีรูปทรงกระบอก ขนาด 4.2-5.2 × 1.7-2.1ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. amorpha* รวมทั้ง Aung (2008) ที่ศึกษาเชื้อราสกุล *Beauveria* ในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าขนาดสปอร์ของเชื้อรา *B. brongniartii* มีขนาด 2.2-6 ไมโครเมตร ซึ่งยาวกว่าตัวอย่างเชื้อราจากประเทศบราซิล ญี่ปุ่น เกาหลี สาธารณรัฐประชาชนจีน และฟิลิปปินส์ และสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* มีขนาด 1.2-3 × 1-3 ไมโครเมตร ที่มีขนาดเล็กกว่าตัวอย่างเชื้อราจากประเทศบราซิล ฝรั่งเศส สาธารณรัฐประชาชนจีน โปแลนด์ สหรัฐอเมริกา และเวียดนาม และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์ของเชื้อรา *B. brongniartii* แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามแมลงอาศัยซึ่งบางกลุ่มมีขนาดเล็กกว่าสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* รวมทั้ง de Muro และคณะ (2005) ที่ศึกษาเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 110 ไอโซเลต ที่รวบรวมจาก 7 ประเทศในตะวันออกกลางและเอเชียตะวันตก แยกเป็น *B. bassiana* จำนวน 104 ไอโซเลต *B. brongniartii* จำนวน 1 ไอโซเลต และที่ไม่สามารถบอกสปีชีส์ได้อีกจำนวน 5 ไอโซเลต จึงอาจกล่าวได้ว่าการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจมีการคาดเคลื่อนได้ นำไปสู่การนำไปใช้ที่ไม่มีประสิทธิภาพ จึงนิยมใช้การบ่งชี้ และศึกษาโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล ก่อนการนำไปใช้

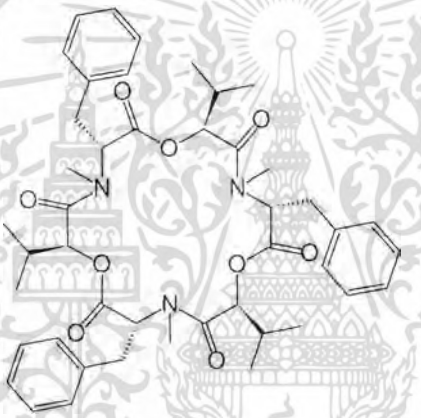
การศึกษาโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลมีหลายวิธีโดยใช้หลักการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และเทคนิค DNA sequencing เป็นต้น ดังเช่น Wada และคณะ (2003) ศึกษา *B. brongniartii* จำนวน 38 ไอโซเลต *B. bassiana* จำนวน 5 ไอโซเลต และ *B. amorpha* จำนวน 1 ไอโซเลต จากแมลงอาศัยและจากถิ่นกำเนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของบริเวณ 18S และ 28S โดยเอนไซม์ *AluI*, *HaeIII* และ *HhaI* จะให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอของ *B. bassiana* ต่างจาก *B. brongniartii* และ *B. amorpha* และเอนไซม์ *MspI* จะให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอของ *B. amorpha* ต่างจากเชื้อราในสกุล *Beauveria* อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ de Muro และคณะ (2005) ที่เอนไซม์ *AluI*, *HhaI*, *ThaI*, *Tsp509 และ MseI* ให้ผลแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ของเชื้อราในสกุล *Beauveria*

และจากการศึกษาวิจัยเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่แยกได้จากแมลงและดินในประเทศไทย จำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต นำมาศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพทั้งจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางโมเลกุล โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาศึกษาจากลักษณะของโคโลนี และจากอัตราส่วนความยาวและความกว้างของสปอร์ ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถจำแนกอย่างได้แน่นอนว่าเป็นเชื้อรา *Beauveria* สปีชีส์ใด จึงนำเฉพาะไอโซเลต B001-B029 มาศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) และบางส่วนของ 18S และ 28S ของ rDNA (ribosomal DNA) โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 สามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ และจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HhaI* (*Asp*LEI) สามารถแยกเชื้อรา *Beauveria bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต ออกจากเชื้อรา *Beauveria brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบด้วยโปรแกรม ClustalX และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยการใช้ Kimura-two parameter จากจำนวนชุดข้อมูล 1000 ชุด ด้วยโปรแกรม PHYLIP หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree ในบริเวณ ITSs สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้อย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม คือ เชื้อรา *B. bassiana, B. brongniartii* และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (ไม่ได้นำเสนอข้อมูลทั้งหมด และในสุวิชา, 2551)

เชื้อราในสกุล *Beauveria* สามารถผลิตสารต่างได้หลายชนิด เช่น beauvericin, bassianin, bassianolide, beauverolide, oosporein และ tenellin เป็นต้น โดย beauvericin (BEA) เป็นสารชนิด cyclic hexadepsipeptide แสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่ 1.1 ที่มีฤทธิ์ทั้งต้านเชื้อจุลินทรีย์และสารกำจัดแมลง ที่อยู่ในกลุ่มของ enniatin และเป็นสารพิษจากเชื้อราที่ได้จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Hamill และคณะ, 1969) และเชื้อราอื่นโดยเฉพาะในสกุล *Fusarium* ที่พบปนเปื้อนมากับธัญญาพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ (Moretti และคณะ, 1995; Logrieco และคณะ, 1998)



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของ beauvericin (BEA) ที่มีลักษณะแบบ Cyclic hexadepsipeptide
ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Beauvericin

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-colorimetric assay เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบ IC_{50} (50% Inhibiting Concentration) ของ beauvericin เท่ากับ 2.5 μM (Fornelli และคณะ, 2004) รวมทั้งการศึกษาในเซลล์สัตว์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Calo และคณะ, 2004) Beauvericin มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย เชื้อแกรมบวก และยังสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (apoptosis) เช่น ในเซลล์ชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) (Lin และคณะ, 2005) และเซลล์เม็ดเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lymphocyte (Dombrink-Kurtzman, 2003) ซึ่งอาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันอันเนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงจากการยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการเกิด apoptosis

Beauvericin ในระดับความเข้มข้นต่ำระดับไมโครโมลาร์พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ murine P815 mastocytoma, Yac-1 lymphoma และ EL-4 thymoma, rat mast cell-like RBL-1, simian fibroblastoid CV-1 และ human IARC/BL 41 (จาก Burkitt's lymphoma), HeLa cells (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ Hep G2 cells (เซลล์มะเร็งตับ) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า beauvericin มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ในหลอดทดลอง (Ojcius และคณะ, 1991; Macchia และคณะ, 1995; Que และคณะ, 1997; Harnois และคณะ, 1997; Logrieco และคณะ, 2002)

Calo และคณะ (2004) ศึกษาผลของ 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

Wat และคณะ (1977) วิเคราะห์สารสีเหลืองที่เกิดขึ้นในการเจริญของเชื้อราสกุล *Beauveria* เป็นโครงสร้างของ tenellin และ bassianin ซึ่งมีการศึกษาความเป็นพิษน้อย เช่น Quesada-Moraga และ Vey (2004) ทำการศึกษาสารพิษจากเชื้อราที่ได้จาก *B. bassiana* ที่แยกได้จากตั๊กแตน คือ Bassiacridin ที่สามารถแยกได้ในปริมาณระหว่าง 0.1- 0.3% ของสารสกัดหยาบ เมื่อทดสอบความเป็นพิษโดยการฉีดสารบริสุทธิ์ในหนอนของ *Locusta migratoria* ในระดับความเข้มข้นต่ำประมาณ 3.3 μg/น้ำหนักตัว 1 g ทำให้เกิดการตาย 50% และเมื่อศึกษาในระดับเซลล์ และเนื้อเยื่อ จะพบลักษณะของจุดสีดำที่ท่อลม และถุงลม

Oosporein (OOS) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ dibenzoquinone พบครั้งแรกในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Oospora colorans* ต่อมาพบในการเพาะเลี้ยง *Chaetomium aureum* ที่คัดแยกได้จากดิน และให้สารสีแดงปริมาณมากในขณะการเพาะเลี้ยง และเมื่อนำไปทดสอบพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* และ *Micrococcus lysodeikticus* โดยมีค่า inhibitory concentration (MIC) ประมาณ 12.5-50 μg/ml (Taniguchi และคณะ, 1984) ซึ่งต่อมาพบว่าเชื้อราหลายชนิดสามารถผลิต Oosporein ได้รวมทั้งเชื้อราในสกุล *Beauveria* (Strasser และคณะ, 2000; Seger และคณะ, 2005) โดยเฉพาะ *B. brongniartii* (Strasser และคณะ, 2000) และจากการที่ใช้เชื้อรามาเป็นสารควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีมากขึ้น ซึ่งเชื้อราโดยส่วนใหญ่จะสร้างสารพิษหลากหลายชนิด ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่จะมีการปนเปื้อนสู่สภาพแวดล้อม การตรวจสอบสารพิษจึงควรกระทำอย่างรวดเร็ว แม่นยำ และราคาไม่สูง Favilla และคณะ (2006) ได้ใช้ *Artemia salina* และ *Daphnia magna* ในการประเมินความเป็นพิษจากสารพิษที่ผลิตจากเชื้อรา 7 ชนิด คือ alamethicin (ALA), paracelsin (PCS), antiamoebin (AAM), gliotoxin (GTX), destruxin A (DA), oosporein (OOS) และ elsinochrome A (EA) พบว่า *A. salina* และ *D. magna* มีความไวต่อสารพิษจากเชื้อราทุกชนิด ยกเว้น OOS

จากการศึกษาในเชื้อราในสกุล *Fusarium* ที่สามารถผลิตสารพิษหลากหลายชนิด โดยสารหลักที่ผลิตได้ คือ กลุ่ม trichothecenes เช่น diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 toxin (T-2),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nivalenol (NIV), fusarenon-X (FX) และ deoxynivalenol (DON) โดยผลิตได้จากทั้ง *F. culmorum* และ *F. graminearum* รวมทั้ง *F. sambucinum* (Miller และคณะ, 1991; Thrane และ Hansen, 1995) ซึ่งต่างจาก *F. sporotrichioides* และ *F. kyushuense* ที่พบว่าผลิต trichothecenes ได้ในปริมาณที่น้อย และยังพบว่า *F. langsethiae* และ *F. sporotrichioides* สามารถผลิตสารในกลุ่ม trichothecenes ได้ใกล้เคียงกันมาก แม้ว่าลักษณะของ *F. langsethiae* จะใกล้เคียงกับ *F. poae* มากกว่า (Thrane และคณะ, 2004) อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมในการเจริญมีผลต่อการสร้าง trichothecenes

นอกจากนั้นเชื้อราในสกุล *Fusarium* สามารถผลิตสารพิษชนิด beauvericin ได้ แต่อย่างไรก็ตามในแต่ละสปีชีส์จะผลิตและให้ปริมาณของสารแตกต่างกันไป หรือแม้แต่ในสปีชีส์เดียวกัน ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน แต่สายพันธุ์แตกต่างกันจะให้ปริมาณของ beauvericin แตกต่างกันด้วย ดังเช่นการทดลองของ Thrane และคณะ (2004) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตสารพิษจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* คือ *F. langsethiae, F. poae, F. sporotrichioides* และ *F. kyushuense* จำนวนทั้งหมด 109 สายพันธุ์ โดย *F. langsethiae* จำนวน 23 สายพันธุ์ มีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิต beauvericin ได้ และเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต beauvericin ได้จำนวนมากที่สุด และสามารถผลิตจาก *F. sporotrichioides* ได้เพียง 19 สายพันธุ์จากทั้งหมด 35 สายพันธุ์ จาก *F. poae* ได้เพียง 24 สายพันธุ์จากทั้งหมด 49 สายพันธุ์ ซึ่งให้ปริมาณสารที่แตกต่างกันออกไป และไม่พบการผลิต beauvericin จาก *F. kyushuense* ทั้งสองสายพันธุ์ จึงอาจเป็นได้ว่าเชื้อราในสกุล *Beauveria* สามารถผลิต beauvericin ที่แตกต่างกัน

ตัวอย่างสารที่เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงอื่นๆสร้างได้ เช่น *M. anisopliae* ได้แก่ destruxins และ swainsonine ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่ นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับสารชนิดอื่นๆที่แยกได้ เช่น cytochalasin C และ D, 12-hydroxyovalicin, viridoxin, myroridins และ hydroxyfungerin (Krasnoff และคณะ, 2006)

Destruxins (dtxs) เป็นสารในกลุ่ม cyclic hexadepsipeptides toxins มีโครงสร้างเป็นวงที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารฆ่าแมลง (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 รวมทั้ง Swainsonine เป็นสารประเภท indolizidine alkaloid ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน piperidine และ pyrrolidine เชื่อมกัน

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amiri-Besheli และคณะ (2000) ศึกษาทั้งชนิด และปริมาณของ destruxins พบว่าสายพันธุ์ *M. anisopliae* var. *anisopliae* มีปริมาณของ destruxins A, B และ E แตกต่างกัน 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 โดยในการศึกษาสารสกัดมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง (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:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 *Beauveria* มีการศึกษาความเป็นพิษต่อแมลง เซลล์แมลง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่เน้นการศึกษาไปที่การสกัดสารจากเชื้อราเพื่อนำไปใช้เป็นสารควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ยังมีอยู่น้อยดังนี้

Watts และคณะ (2003) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ภายในหลอดทดลอง โดยทดสอบจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงในสกุล *Hypocrella* จำนวน 7 สปีชีส์ และสกุล *Aschersonia* จำนวน 11 สปีชีส์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane: methanol 1: 1 ต่อเซลล์แมลงชนิด Sf9 และ C6/36 cells และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด L929, BHK (21) C13 และ HepG2 ด้วยวิธี MTT assay พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์แมลง (ID_{50} < 10 µg/ml) แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ID_{50} > 10 µg/ml)

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%) และสำหรับสกุล *Beauveria* มีฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไปโดย *B. brongniartii* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อต่างๆได้ดีกว่า *B. bassiana* และเมื่อนำบางตัวอย่างมาศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสาร เช่น ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อราในสกุล *Beauveria* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิด SMY medium และ Gelatin medium เป็นระยะเวลา 14 วัน เมื่อนำส่วนของน้ำใสมาทดสอบ พบเฉพาะฤทธิ์ต้าน Bacillus เท่านั้น โดยสูตรอาหารไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ดังกล่าว รวมทั้ง *B. bassiana* มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *Photorhabdus luminescens* ด้วย (Ansari และคณะ, 2005)

Segvit Klarit และคณะ (2008) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการชักนำให้เกิด apoptosis ใน porcine kidney PK15 cell โดยใช้สาร fumonisin B(1) (FB(1)), beauvericin (BEA) และ ochratoxin A (OTA) ทั้งแบบสารชนิดเดียว การรวมกันของสาร 2 และ 3 ชนิด ด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lactate dehydrogenase (LDH) activity และ caspase-3 activity ที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 5 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าทั้งระยะเวลาและความเข้มข้นของสารมีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์และการชักนำให้เกิด apoptosis โดยที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง FB(1), BEA และ OTA ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด มีผลทำให้ LDH activity เพิ่มขึ้นเป็น 45, 84 และ 77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่ระดับความเข้มข้น 0.5 µg/ml OTA ทำให้ caspase-3 activity เพิ่มมากขึ้น 84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ในขณะที่ BEA และ FB(1) ทำให้ caspase-3 activity เพิ่มมากขึ้น 319 และ 419 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยการทำงานของเอมไซม์ที่เพิ่มมากขึ้นนี้จะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงการเกิด apoptosis

สำหรับสารสกัดที่ได้จากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Beauveria* นี้ยังมีงานวิจัยไม่เพียงพอต่อการยอมรับของผู้บริโภคว่ามีผลข้างเคียงต่อร่างกายหรือไม่ทั้งต่อเซลล์ปกติ หรือสารพันธุกรรม ในกรณีมีการนำมาใช้และมีฤทธิ์ตกค้างอยู่ในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งองค์ประกอบทางเคมี ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราในสกุล *Beauveria* ที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะสปีชีส์ที่นำไปใช้ในแปลงเกษตรกรรม รวมทั้งความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม เพื่อการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยปราศจากความเป็นพิษต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

จากการรวบรวมเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่แยกได้จากแมลงและดินในประเทศไทย จำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต นำมาระบุสปีชีส์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะของโคโลนี และจากอัตราส่วนความยาวและความกว้างของสปอร์ และเทคนิคทางโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) และบางส่วนของ 18S และ 28S ของ rDNA (ribosomal DNA) โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hha*I (*Asp*LEI) สามารถแยกเป็นเชื้อรา *Beauveria bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และเชื้อรา *Beauveria brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.1.2.2 *Escherichia coli* DMST 4212

2.1.2.3 *Staphylococcus aureus* TISTR 118

2.1.2.4 *Bacillus cereus* DMST 5040

2.1.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1.3.1 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7)

2.1.3.2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29)

2.1.3.3 เซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell)

2.1.3.4 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: 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)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

2.1.4.40 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)

2.1.5 วัสดุ และสารเคมี

2.1.5.1 ยาปฏิชีวนะ gentamycin

2.1.5.2 สาร beauvericin (Sigma)

2.1.5.3 สาร mitomycin C

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

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

2.1.5.6 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Malt Extract Agar (MEA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.7 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Corn Meal Agar (CMA)

2.1.5.8 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Yeast Extract Sucrose (YES)

2.1.5.9 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

2.1.5.10 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

2.1.5.11 สารละลาย McFarland standard

2.1.5.12 อาหารชนิด Roswell Park Memorial Institue (RPMI-1640)

2.1.5.13 ซีรัม (fetal bovine serum, FBS)

2.1.5.14 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin enzyme)

2.1.5.15 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO)

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

2.1.5.17 ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytohemagglutinin-M, PHA)

2.1.5.18 เฮปาริน (heparin)

2.1.5.19 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)

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

2.1.5.21 โคลซิมิด (colcemid)

2.1.5.22 ฟอสเฟตไวน์บัฟเฟอร์ (phosphate wise buffer)

2.1.5.23 สีย้อมจิมซ่า (giemsa)

2.1.5.24 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan bule)

2.1.5.25 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline: PBS)

2.1.5.26 เฮกเซน (hexane)

2.1.5.27 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)

2.1.5.28 เมทานอล (methanol)

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

2.1.5.30 Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry

2.1.5.31 น้ำกลั่น (distilled water)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 **การคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Beauveria* เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ**

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และ *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เก็บรักษาไว้ เมื่อจะนำมาทำการทดลองจึงนำมาถ่ายเชื้อในอาหารสูตร PDA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวก่อนการลงเชื้อ คัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด 2 อันดับแรกในแต่ละสปีชีส์ ด้วยวิธี Dual-culture agar diffusion โดยศึกษาทั้งชนิดอาหาร และระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารได้ดี และเพื่อใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยใช้ cork

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตรเจาะตร งส่วนเส้นใย พร้อมนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปวางในจานที่เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดการเกิดวงใส (clear zone) รอบชิ้นวุ้น โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0

2.2.2 **การสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *B. bassiana* และ *B. brongniartii***

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* แต่ละไอโซเลต จำนวนสปีชีส์ละ 2 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เชื้อรามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10-14 วัน ให้ได้ปริมาณเส้นใยมากเพียงพอ ศึกษาและระบุสปีชีส์พร้อมทั้งต้องไม่มีการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นๆ จากนั้นใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซนต์แล้วเผาไฟทิ้งให้เย็น เจาะวุ้นส่วนที่มีเส้นใยแล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟเขี่ยชิ้นวุ้นที่เจาะได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือขวดขนาด 8 ออนซ์ ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารได้ดี โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารอย่างน้อย 3 ลิตร จากนั้นนำส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนเส้นใยแห้งโดยมีน้ำหนักคงที่ นำส่วนของเส้นใยที่ได้มาบดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก สกัดด้วยตัวทำละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนเส้นใย 1 กรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร โดยในแต่ละตัวทำละลาย นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วประมาณ 150-200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้ นำส่วนของเส้นใยไปสกัดซ้ำด้วยสารละลายอีกจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยที่เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดหยาบ (crude) ที่ได้แห้งสนิท จะได้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน จากนั้นนำเส้นใยไปสกัดในสารละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และนำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายใส่ในขวดสีชาขนาดเล็กที่แห้งสนิท และอบฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกน้ำหนัก เก็บในที่เย็น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป พร้อมนำบางส่วนส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยการชั่งสารสกัดหยาบทั้งจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล 50 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อราสกุล *Beauveria*

2.2.3 **การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี** disc diffusion

2.2.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212 โดยเชื้อแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำให้อยู่ในรูปสารละลายเซลล์แขวนลอย โดยใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hilton broth (MHB) ปริมาตรหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตรวจสอบปริมาณของเชื้อ โดยการนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้มีค่าประมาณ 0.5 – 1 ซึ่งจะได้เชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10^{8}- 10^{9} cfu/ml หรือนำไปเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้มีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 1.5 X 10^8 cfu/ml จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อจุ่มในเชื้อที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ซับให้แห้งกับข้างหลอดทดลอง นำไปเกลี่ย (swab) บางๆให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ชื้อจุลินทรีย์กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

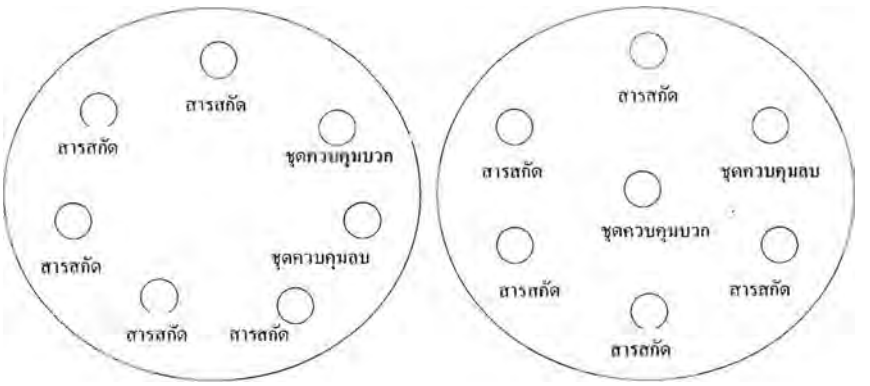
2.2.3.2 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาละลายด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร นำ stock มาเจือจางให้ได้สารสกัดหยาบหยาบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น เป็น 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 200 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอลปริมาตร 4800 ไมโครลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จะมีความเข้มข้น 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการทดสอบให้เจือจางสารละลายด้วยเอทานอลในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 4000, 2000, 1000, 500 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำไปทดสอบ

2.2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อได้สารละลายเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์ที่ต้องการแล้ว นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารแข็งโดยแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหาร MHA จากนั้นรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการหยดชุดควบคุมทางบวก (Positive control) ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมทางลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในกระดาษ AA paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ paper disc จากนั้นรอให้แห้ง หรือทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก ใช้ปากคีบแผ่น paper disc วางลง และกดเบาๆ บนอาหารในจานเพาะเลี้ยงที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว โดยให้สารสกัดหยาบ ชุดควบคุมทางบวก และชุดควบคุมทางลบ อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน ตามตำแหน่งที่กำหนด (รูปที่ 2.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารสกัดหยาบ โดยในการวิเคราะห์ผลการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ใน 2 ซ้ำโดยนำมาหาค่าเฉลี่ย และในการวิเคราะห์ทางสถิตินำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงตำแหน่งการวาง paper disc เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

2.2.4 **การเพาะเลี้ยงเซลล์**

2.2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว

เลี้ยงเซลล์ชนิดเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 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

ทำการเลี้ยงเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: 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 ลงไปผสมกับเซลล์ ดูดพ่นให้เข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดหยาบต่อไป

2.2.5 **การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์**

2.2.5.1 การปลูกเซลล์ใน 96 - wells plate

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีการจาก Mosmarin (1983) และ Hussain และคณะ (1993) ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารดังที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิวทำการ 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 P388 เริ่มต้นจำนวน 0.8 X 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร MCF-7 เริ่มต้นจำนวน 1 X 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ HT-29 และ Vero cell เริ่มต้นจำนวน 1.5 X 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร (0.8-1.5 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 4000 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 200 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4800 ไมโครลิตร และทำการกรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 4000, 2000, 1000, 250 และ 125 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 Beauveracin (Sigma) ที่ละลายใน methanol และเจือจางในอาหารที่เติมซีรัม 5 % เพื่อใช้เป็น positive control จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 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 นำไปบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารที่มีสารละลาย MTT โดยใช้เครื่องดูดสาร หรือการคว่ำลงเบาๆบนกระดาษซับ จากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซานโดยเติมสารละลาย DMSO: ethanol 95% ปริมาตร 1: 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ วาดกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด และความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ ในแกน y และ x ตามลำดับ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่าการการมีชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% cytotoxicity: CC_{50})

2.2.6 **การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis**

ตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis ด้วยวิธี annexin V/propidium iodide โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry ด้วยการเพิ่มจำนวนเซลล์ P388 โดยการเลี้ยงเซลล์จำนวน 0.8-1X10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม Fetal Bovine Serum เข้มข้น 10 % ใน 24 well plate บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อครบเวลา แล้วเติมสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พร้อม positive control ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ โดยการดูดเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติม PBS buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง พร้อมเตรียม 1X annexin-binding buffer เช่น ต้องการเตรียม 1X buffer 1 มิลลิลิตร ให้ดูด 5X annexin-binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส) และเตรียม PI working solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการดูด PI stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน 1X annexin-binding buffer ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 45 ไมโครลิตร เติม 1X annexin-binding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ และเติม annexin V conjugate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ PI working solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและเติม 1X annexin-binding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ด้วยเครื่อง Fluorescence Flow Cytometry หรือ Fluorescence activated cell sorter (FACS) รายงานผลเป็นร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายในระยะต่างๆ จากจำนวนเซลล์ 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง

2.2.7 **การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม**

2.2.7.1 การเตรียมเลือด

ใช้ Heparin เคลือบกระบอกฉีดยาและเข็มเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นเปลี่ยนเข็มสำหรับเจาะเลือดเพื่อป้องกันไม่ให้ heparin เข้าสู่เส้นเลือด เจาะเส้นเลือดดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณท้องแขนของบุคคลตัวอย่างที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงโดยเพศชาย 1 คนและเพศหญิง 1 คน ใช้เลือดประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อคน

2.2.7.2 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

2.2.7.3 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

2.2.7.4 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

2.2.7.5 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.7.6 การวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม

การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมศึกษาจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสที่โครโมโซมกระจายดี โดยในเซลล์นั้นต้องมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 47 โครโมโซม และนับจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกชนิดของความผิดปกติ และนับจำนวนที่เกิดความผิดปกติตามชนิดของความผิดปกตินั้นดังนี้

- 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

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

ในการคำนวณค่าเฉลี่ย จำนวนหักของโครโมโซม จะนับจำนวนหักทั้งหมด คำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา นำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละตัว กับกลุ่มควบคุม

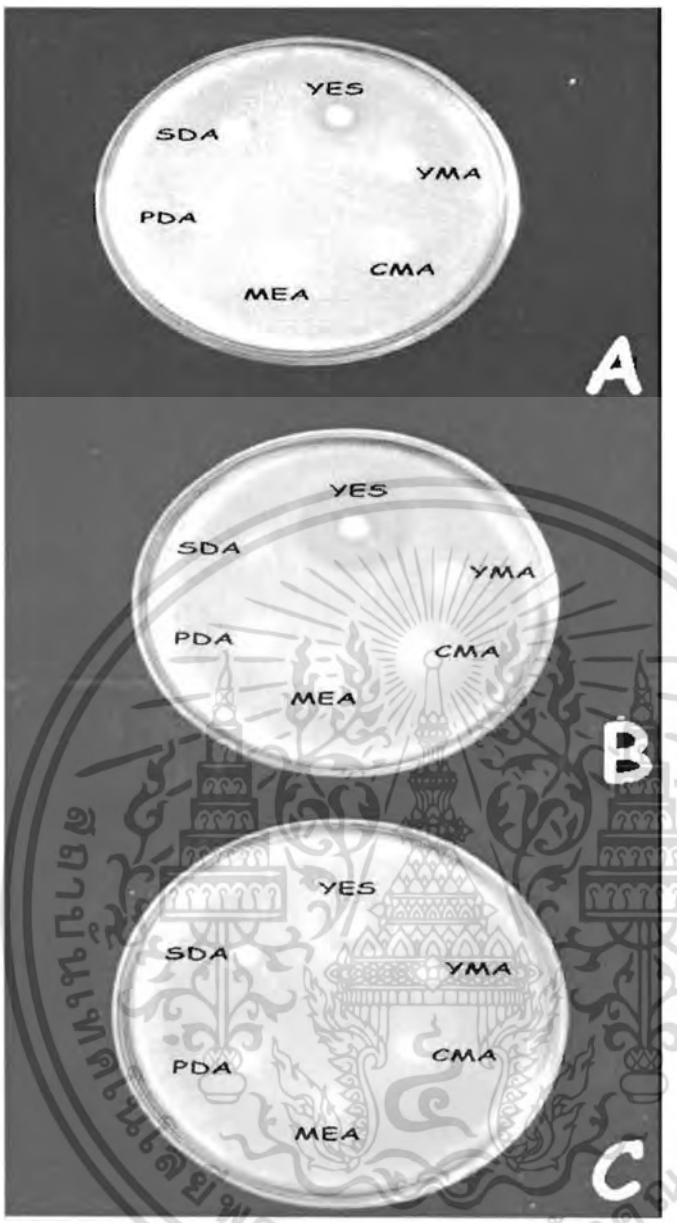
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Beauveria* เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และ *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เก็บรักษาไว้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PDA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวก่อนการลงเชื้อ คัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด 2 อันดับแรกในแต่ละสปีชีส์ ด้วยวิธี Dual-culture agar diffusion โดยศึกษาทั้งชนิดอาหาร และระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารได้ดี เพื่อใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป โดยนำเชื้อราแต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เมื่อครบเวลาใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตรเจาะลงบริเวณขอบโคโลนี และนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปวางในจานที่เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดการเกิดวงใส (clear zone) รอบชิ้นวุ้น โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ พบว่า *B. bassiana* ไอโซเลต B019 (ไอโซเลต A) และ B015 (ไอโซเลต B) และ *B. brongniartii* ไอโซเลต B013 (ไอโซเลต C) และ B027 (ไอโซเลต C) ที่เลี้ยงในอาหาร YES มีขนาดของรัศมีการเกิดวงใสที่มีขนาดใหญ่ 2 อันดับแรก ในแต่ละสปีชีส์ ดังแสดงตัวอย่างของไอโซเลต B015 (ไอโซเลต B) ดังรูปที่ 3.1 โดยมีผลทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* (รูปที่ 3.1 A) และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* (รูปที่ 3.1 B) และ *Escherichia coli* (รูปที่ 3.1 C) โดยอาหารสูตร YES อาจจะมีแหล่งอาหารที่กระตุ้นให้เชื้อราสกุล *Beauveria* ผลิตสารออกมายับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และพบว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 28 วัน สามารถเกิดวงใสที่กว้างที่สุด ดังนั้นจะใช้อาหารชนิด YES ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการสกัดสาร เป็นระยะเวลา 1 เดือน ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B015 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยแสดงผลต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) และ *Escherichia coli* (C) ที่เพาะเลี้ยงรวมกันเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยได้ทำการศึกษาจากการสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต A (B019) และไอโซเลต B (B015) และจากเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต C (B013) และไอโซเลต D (B027) โดยในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ของไอโซเลต A พบสารทั้งหมด 22, 25 และ 25 พีค ไอโซเลต B พบสารทั้งหมด 20, 22 และ 29 พีค ไอโซเลต C พบสารทั้งหมด 45, 32 และ 17 พีค และไอโซเลต D พบสารทั้งหมด 16, 25 และ 17 พีค ตามลำดับ ปริมาณสารที่พบที่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.1 และ 3.2

โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 49.07, 35.75 และ 22.50 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ที่พบว่าสารสกัดหยาบทั้งจากชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท มี 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 57.60 และ 40.53 % ตามลำดับ แต่พบ Hexadecanoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 24.91 % และพบ 9, 12-Octadecadienoic acid เพียง 8.99 % สำหรับ *B. brongniartii* ไอโซเลต C ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 23.42, 29.41 และ 25.33 % ตามลำดับ สำหรับ *B. brongniartii* ไอโซเลต D ในชั้นเฮกเซนพบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 29.90 % แต่สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทพบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณ 21.71 % และไม่พบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในชั้นเอทานอล โดย *B. brongniartii* ไอโซเลต D สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทและเอทานอลพบ 9-Octadecenoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 23.65 และ 46.25 % ตามลำดับ

โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล 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 และ 3.2 พบว่าในแต่ละไอโซเลตมีปริมาณกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยเชื้อราจะนำคาร์บอนที่เหมาะสมจากแหล่งอาหารไปสังเคราะห์ไขมันโดยตรงจึงมีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาสามารถนำความรู้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการด้านอุตสาหกรรม โดยมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่างๆเช่น แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันเพิ่มมากยิ่งขึ้น หรือปัจจัยด้านอุณหภูมิที่มีต่อปัจจัยด้านการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัว หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Somashekar และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และไอโซเลต B ในชั้นเอทานอลพบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ในปริมาณ 6.24 และ 12.50 % ตามลำดับ และในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. brongniartii* ไอโซเลต C ในชั้นเอทานอลพบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ในปริมาณ 7.30 % แต่ไอโซเลต D ไม่พบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ในชั้นเอทานอล แต่พบในชั้นเอทิลอะซิเตทในปริมาณ 8.55 % 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

B. brongniartii ไอโซเลต C พบสารที่แตกต่างไปคือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และเอทานอลพบกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ปริมาณ 6.69 และ 10.28 % ตามลำดับ ซึ่งไม่พบในไอโซเลตอื่นๆ โดยกรดเบนโซอิกเป็นสารถนอมอาหาร หรือสารกันเสีย หรือสารกันบูด (preservative agent) ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร และในปัจจุบันยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางและยาด้วย ในธรรมชาติกรดเบนโซอิกผลิตได้จากผลไม้ประเภทเบอรี่ พรุน และกานพลู กรดเบนโซอิกออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์จะดูดซึมกรดเข้าไปในเซลล์มีผลทำให้กระบวนการแทรกซึมของอาหารเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ผิดปกติไป ในขณะเดียวกันจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์บางชนิดและปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ เช่น ฟอสโฟฟรุคโตไคเนส (phosphofructokinase enzyme) ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ กรดเบนโซอิกผ่านการประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยาว่ามีความเป็นพิษต่ำ มีความปลอดภัยสูง และไม่ได้อยู่ในรายชื่อของสารก่อมะเร็ง จึงนำมาใช้ในการผลิตอาหารได้ และ The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) กำหนดค่าความปลอดภัยหรือค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ซึ่งเป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถรับสารนั้นได้ต่อวันตลอดชั่วชีวิตโดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใดๆ ต่อสุขภาพไว้ที่ 0 - 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน

นอกจากนั้นแล้ว *B. bassiana* ไอโซเลต A ในสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทพบ Cephalosporolide ปริมาณ 0.32 และ 0.40 % ตามลำดับ และ *B. brongniartii* ไอโซเลต C พบทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ในปริมาณ 0.69, 0.57 และ 0.87 % ตามลำดับ แม้ว่าพบในปริมาณน้อยแต่น่านำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เชื้อรานี้ผลิตในปริมาณที่มากขึ้น เนื่องจาก Cephalosporolide มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

Isolate	Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
B. bassiana (B019) ไอโซเลต A	- Cephalosporolide (0.32) - Hexadecanoic acid (23.80) - 9,12-Octadecadienoic acid (49.07) - 9-Octadecenoic acid (14.15)	- Cephalosporolide (0.40) - Hexadecanoic acid (21.57) - 9,12-Octadecadienoic acid (35.75) - 9-Octadecenoic acid (13.04)	- 1;2,3-Propanetriol (14.83) - Hexadecanoic acid (19.60) - 9,12-Octadecadienoic acid (22.50) - 9-Octadecenoic acid (12.33) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (6.24)
B. bassiana (B015) ไอโซเลต B	- Hexadecanoic acid (27.66) - 9,12-Octadecadienoic acid (57.60)	- Hexadecanoic acid (28.39) - 9,12-Octadecadienoic acid (40.53)	- Hexadecanoic acid (24.91) - Ethyl linoleate (22.84) - 9,12-Octadecadienoic acid (8.99) - 9-Octadecenoic acid (10.50) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (12.50)

ปริมาณใน () มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

Isolate	Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
B. brongniartii (B013) ไอโซเลต C	- Cephalosporolide (0.69) - Hexadecanoic acid (18.79) - 9,12-Octadecadienoic acid (23.42) - 9-Octadecenoic acid (18.30)	- Cephalosporolide (0.57) - Cyclohexanone (1.48) - Benzoic acid (6.69) - Thiazol (6.04) - Hexadecanoic acid (18.20) - 9,12-Octadecadienoic acid (29.41) - 9-Octadecenoic acid (7.84)	- Cephalosporolide (0.87) - Benzoic acid (10.28) - Hexadecanoic acid (18.71) - 9,12-Octadecadienoic acid (25.33) - 9-Octadecenoic acid (11.84) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (7.30)
B. brongniartii (B027) ไอโซเลต D	- Hexadecanoic acid (27.66) - 9,12-Octadecadienoic acid (29.90) - 9-Octadecenoic acid (19.35) - Ethyl oleate (9.08)	- Cyclohexanone (1.04) - Thiazol (0.22) - Hexadecanoic acid (21.88) - 9,12-Octadecadienoic acid (21.71) - 9-Octadecenoic acid (23.65) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (8.55)	- Hexadecanoic acid (18.60) - 9-Octadecenoic acid (46.25)

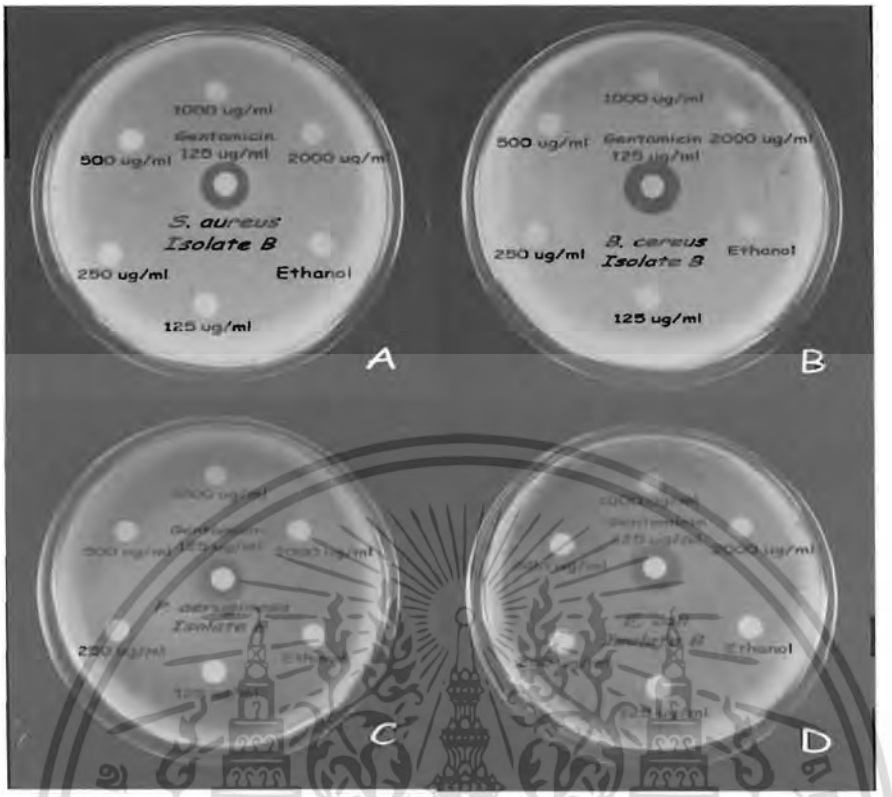
ปริมาณใน () มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion

นำส่วนของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอลที่ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ คือ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212 และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่าในทุกไอโซเลตของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อราสกุล *Beauveria* ทั้งในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอลนั้น ไม่เกิดบริเวณใส (clear zone) หรือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ เนื่องจากไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition zone) อย่างไรก็ตามในแต่ละการทดลองมีเพียงยาปฏิชีวนะเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยจากภาพเป็นการศึกษาจากสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเตทของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ต่อเชื้อ *S. aureus* (รูปที่ 3.2 A), *B. cereus* (รูปที่ 3.2 B), *P. aeruginosa* (รูปที่ 3.2 C) และ *E. coli* (รูปที่ 3.2 D) โดยผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของ *M. anisopliae* เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *M. luteus* ที่ระดับความเข้มข้น 1000-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้นต่ำไม่สามารถยับยั้งได้ และในแต่ละไอโซเลตให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยไอโซเลต SNB 03 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของ *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 พบสารแตกต่างไป คือ 1,9-Diazabicyclo ในปริมาณ 46.588 % ซึ่งมีรายงานถึงความสามารถของสารในกลุ่ม bicyclo ว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับองค์ประกอบของสารทั้งชนิดและปริมาณของสารที่พบในส่วนของสารสกัดหยาบที่น่าจะมีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทั้ง สภาวะในการเพาะเลี้ยง วิธีการสกัด หรือองค์ประกอบของสารที่สกัดได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี Gentamicin และ ethanol เป็นกลุ่มควบคุม และในกลุ่มทดลอง คือ *Staphylococcus aureus* (A), *Bacillus cereus* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C) และ *Escherichia coli* (D) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ที่ดัดแปลงวิธีการมาจาก Mosmarin (1983) และของ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยเซลล์ที่มีชีวิต และมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติเอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายจะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งนิยมรายงานผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50})

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 4 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) นำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิจารณาในแต่ละไอโซเลต จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongniartii* พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

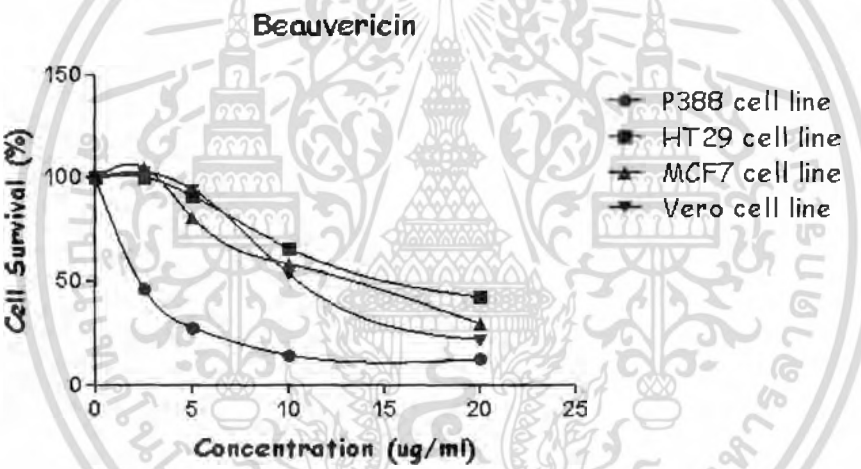
ก่อนการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารละลาย beauvericin ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด เพื่อนำไปใช้เป็น positive control ในความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF-7, Vero และ HT-29 cell ที่ทำการทดสอบด้วยสารละลาย beauvericin ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่มี 1% methanol ร่วมในการตรวจสอบด้วย และนำมาตรวจสอบหาค่าระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% พบว่าสารละลาย beauvericin ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเป็นพิษต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท lymphocyte มากที่สุด โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.25, 10.48, 13.40 และ 15.05 µg/ml ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.3 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย beauvericin กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ในรูปที่ 3.3 สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า beauvericin มีผลต่อความอยู่รอดของ mammalian cell lines หลายชนิด โดยอัตราการตายของเซลล์ขึ้นกับทั้งความเข้มข้นของสารและระยะเวลา โดยมีผลทำให้เพิ่มการหลั่งของ cytochrome C จากไมโทคอนเดรียและเพิ่มการทำงานของ caspase-3 ซึ่งมีผลต่อการทำงานของแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ (Dombrink-Kurtzman, 2003; Calo และคณะ, 2003; Calo และคณะ, 2004; Jow และคณะ, 2004; Lin และคณะ, 2005; Segvit Klarit และคณะ, 2008) ซึ่งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย beauvericin ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็น positive control ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารละลาย beauvericin ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

Treatment	Cell Line Types	50% cytotoxic concentration: CC_{50} (µg/ml)
Beauvericin (BEA)	P388	2.25
	MCF-7	13.40
	HT-29	15.05
	Vero Cell	10.48



รูปที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ beauvericin ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ 4 ชนิด คือ P388, HT-29, MCF-7 และ Vero cell lines

ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการทดสอบยาปฏิชีวนะชนิด Mitomycin C กับเซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวก โดย Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) ในเซลล์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell เท่ากับ 49.77, 88.15, 52.49 และ 99.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้พบว่า beauvericin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.25, 10.48, 13.40 และ 15.05 µg/ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอล ของทั้งเชื้อรา *B bassiana* และ *B. brongniartii* มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์มะเร็ง คือ P388, MCF-7 และ HT-29 และเซลล์ปกติ คือ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ และค่า CC_{50} โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 2000 µg/ml ดังนั้นหาก CC_{50} > 2000 µg/ml นับว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำ พบว่าสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลายจากเชื้อรา *B. brongniartii* มีค่า CC_{50} > 2000 µg/ml ยกเว้นสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากไอโซเลต C มีค่า CC_{50} = 1788 µg/ml (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

สำหรับค่า CC_{50} ของสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลายจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงในตารางที่ 3.4

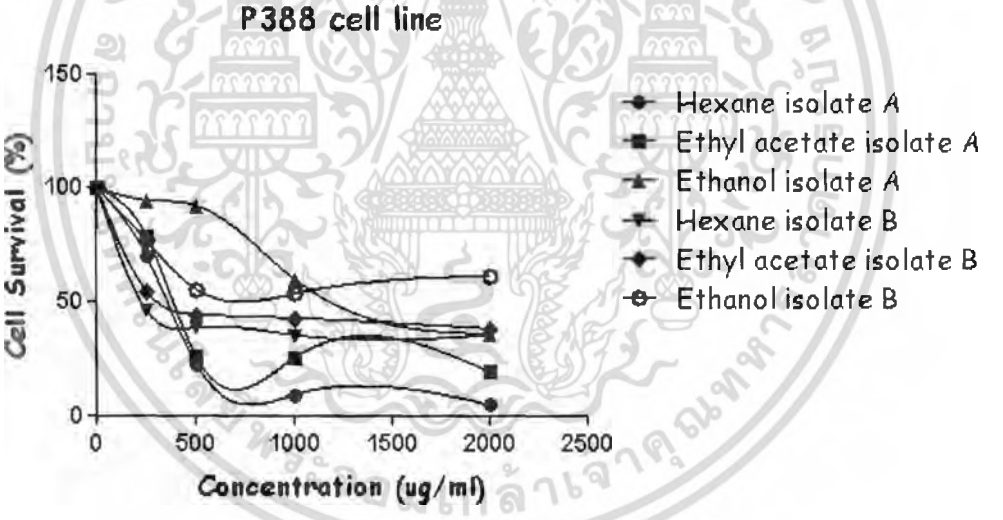
ตารางที่ 3.4 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอลต่อเซลล์ชนิดต่างๆด้วยวิธี MTT assay

Isolates	Cell Types	50% Cytotoxic Concentration: CC_{50} (µg/ml)		
		Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
A	P388	354.18	384.27	1176.12
	MCF-7	488.07	1019.90	>MCT
	HT-29	914.92	988.98	>MCT
	Vero	447.16	719.21	>MCT
B	P388	220.55	300.45	669.53
	MCF-7	379.52	>MCT	>MCT
	HT-29	808.08	>MCT	>MCT
	Vero	>MCT	>MCT	>MCT

MCT=maximal concentration tested (≥2000 µg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

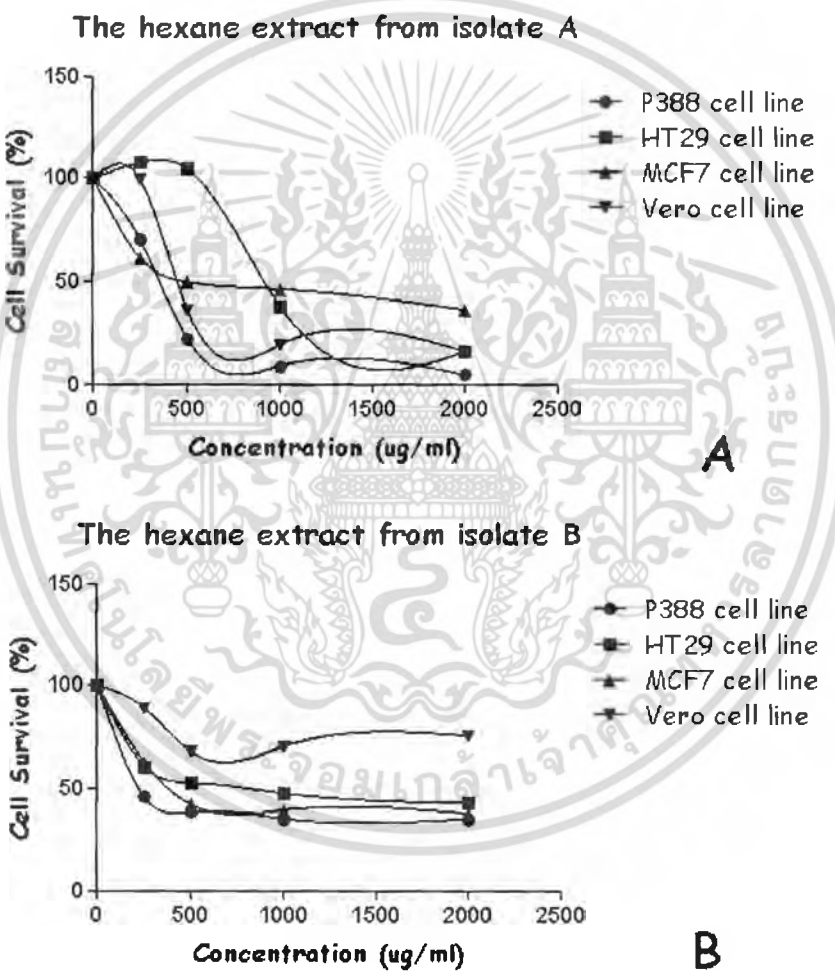
สารสกัดจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) เท่ากับ 354.18, 384.27 และ 1176.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลที่ไม่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ MCF-7, HT-29 และ Vero cell ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุด คือ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับไอโซเลต B ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 220.55, 300.45 และ 669.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ MCF-7 และ HT-29 โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 379.52 และ 808.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากทุกตัวทำละลายของทั้งสองไอโซเลตจากเชื้อรา *B. bassiana* มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของไอโซเลต B มีค่า CC_{50} ต่ำสุดเพียง 220.55 µg/ml โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และ B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388 (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และไอโซเลต B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้งสองไอโซเลตแสดงความเป็นพิษมากที่สุด โดยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆมากที่สุด โดยเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A มีผลต่อเซลล์ชนิด P388, MCF-7, HT-29 และ Vero cell โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 354.18, 488.07, 914.92 และ 447.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไอโซเลต B มีผลต่อเซลล์ชนิด P388, MCF-7 และ HT-29 โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 220.55, 379.52 และ 808.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ Vero ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุด โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และ B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดต่างๆ (รูปที่ 3.5 A และ B)



รูปที่ 3.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A (A) และไอโซเลต B (B) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388, MCF-7, HT-29 และ Vero cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยไอโซเลต A มีค่า CC_{50} ส่วนใหญ่มากกว่าไอโซเลต B ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า B จัดเป็นไอโซเลตที่น่าจะเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า เนื่องจากใช้ปริมาณสารเพียงเล็กน้อยสามารถที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลอะซิเตทของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A แสดงความเป็นพิษต่อ Vero cell ซึ่งเป็นเซลล์ปกติจากไตของลิงได้ ดังนั้นในการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอาจกล่าวได้ว่าเชื้อรา *B. bassiana* น่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่า *B. brongniartii* แต่อย่างไรก็ตามอาจมีโอกาสปนเปื้อนของสารเข้าสู่สิ่งแวดล้อม หรือห่วงโซ่อาหารที่จะมีผลกระทบต่อสุขภาพได้ ซึ่งควรมีการศึกษาการปนเปื้อนของสารที่ได้จากเชื้อรา ดังเช่นการรายงานการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราและประเมินฤทธิ์ของสารพิษจากเชื้อราในตลาดฟินแลนด์และอิตาลี แม้ว่าปริมาณที่พบมีระดับต่ำ (Jestoi *et al.*, 2004) ฉะนั้นสารจากเชื้อราจึงไม่ควรที่จะมีฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะเซลล์ของสัตว์และมนุษย์ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อราในสกุล *Beauveria* มีปัจจัยทั้งจากตัวทำละลาย ชนิดของเซลล์ที่นำมาทดสอบ ระดับความเข้มข้น และสายพันธุ์ของเชื้อรา

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae* พบว่ามีผลต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู และสอดคล้องกับการศึกษาของ 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 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 อาจกล่าวได้ว่าสารชีวภาพจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยมีภาวะเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ หรือต้องใช้ระดับความเข้มข้นของปริมาณสารในระดับที่สูงจึงจะแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงความเป็นพิษในทุกเซลล์แต่มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น สำหรับ beauvericin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดเช่นกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้น (screening method) เท่านั้น เนื่องจากมีปัจจัยอีกหลายชนิดที่มีผลต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองโดยเฉพาะเรื่องของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีอื่นๆ ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ รวมทั้งการประเมินความปลอดภัยในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ด้วย เนื่องจากการนำสารชีวภาพมาใช้ควรต้องคำนึงถึงความปลอดภัย อีกทั้งการตกค้างในธรรมชาติ ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการประเมินความเป็นพิษของสารชีวภาพเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อตรวจสอบ และยืนยันว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์เพียงใด

3.5 การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis

อะพอพโทซิส (Apoptosis) เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ (cell death) แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการพัฒนาการ การรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต เช่น นิ้วทั้งห้าแยกออกจากกัน เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ระหว่างนิ้วเกิดอะพอพโทซิส การกำจัดเซลล์ที่เสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส หรือเกิดจากการกลาย (mutation) แต่หากอะพอพโทซิสเกิดขึ้นมากเกินไปจะทำให้เกิดการฝ่อของอวัยวะได้ ซึ่ง apoptosis เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีลักษณะที่เฉพาะ โดยเซลล์จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ เช่น การบวมของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุง (membrane blebbing) การหดตัวหรือการเหี่ยวของเซลล์ (cell shrinkage) นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน (nuclear fragmentation) การหดสั้นของโครมาติน (chromatin condensation) และการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอ (chromosomal DNA fragmentation) ซึ่งมีผลทำให้เซลล์แตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ เรียก apoptotic body ที่เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงโดยเหี่ยวฝ่อลงและห่อหุ้มส่วนของนิวเคลียสและองค์ประกอบของเซลล์ โดย apoptotic body นี้จะถูกกำจัดหรือสลายไปโดย phagocyte หรือ macrophage ซึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบหรือความเสียหายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง ซึ่งกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้จะแตกต่างจากการตายแบบเนโครซิส (necrosis)

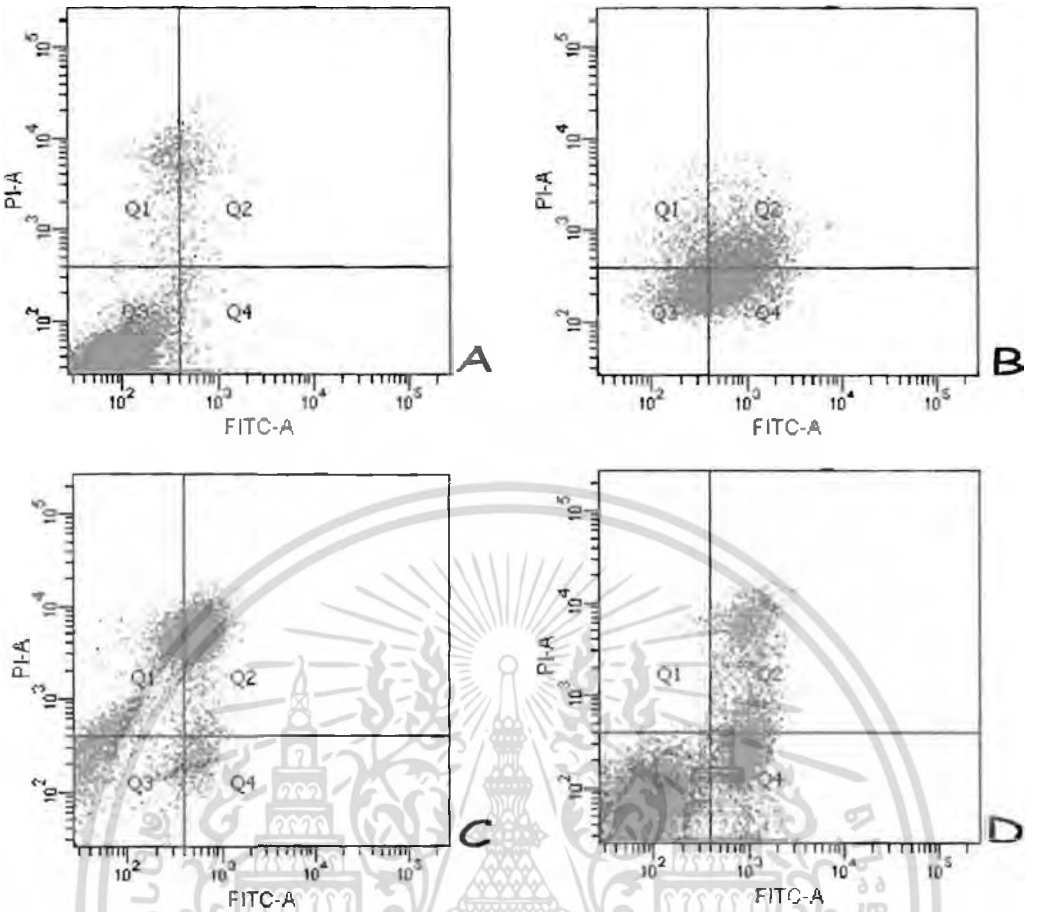
การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis มีหลากหลายวิธี เช่น การย้อมสี DAPI เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลง การศึกษาการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะประมาณ 180-200 คู่เบส การประเมินการทำงานของ Caspase ชนิดต่างๆ การตรวจวัดปริมาณ mRNA ของยีน หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการตรวจด้วยการจับของ Annexin V และ propidium iodide: PI (Annexin V/ PI staining) การตรวจด้วยวิธี annexin V/ propidium iodide มีหลักการจากเซลล์ระยะเริ่มแรกที่เกิด apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ โดย phosphatidyl serine (PS) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ปกติ แต่จะมีการเคลื่อนที่ไปอยู่ด้านนอกเซลล์ในระยะเริ่มแรกของการ apoptosis ซึ่ง annexin V สามารถเข้าไปจับกับประจุลบของ phosphatidyl serine ได้ ในสภาพที่ต้องมี calcium ดังนั้นหากนำสารเรืองแสง (fluorescein) เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC) จับกับ annexin V จะสามารถตรวจสอบเซลล์ที่เกิดการตายของเซลล์ในระยะเริ่มแรก (early apoptosis) ได้จากการเรืองแสงสีเขียว แต่การย้อมสีด้วย propidium iodide อาศัยหลักการความแตกต่างของการให้สารผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิต (viable) ระยะเริ่มแรกของการเกิด apoptosis (early apoptotic) และระยะสุดท้ายของการเกิด apoptosis (late apoptotic) หรือการเกิด necrosis โดย propidium iodide จะไม่แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ขณะเซลล์มีชีวิต แต่จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อเซลล์ตายหรือไม่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถย้อมนิวเคลียสหรือดีเอ็นเอติดสีแดง ถ้าหากตรวจสอบด้วย annexin V พร้อมกับ propidium iodide จะทำให้สามารถแบ่งเซลล์เป็นเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าไม่พบการเรืองแสงทั้งสองสีของ Annexin V และ PI (Annexin V negative/ PI negative) ระยะเริ่มแรกของการเกิด apoptosis (early apoptosis) ถ้าตรวจพบการเรืองแสงของ Annexin V (Annexin V positive/ PI negative) และระยะสุดท้ายของการเกิด apoptosis (late apoptosis) หรือการเกิด necrosis ถ้าตรวจพบการเรืองแสงของ PI (PI positive) ซึ่งสามารถตรวจสอบจากกล้องจุลทรรศน์ หรือการใช้เครื่อง fluorescence flow cytometry

โดยในการศึกษาในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต B มีแนวโน้มมีความเป็นพิษมากที่สุด จึงเลือกมาเพื่อใช้ในการตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด apoptosis โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร Beauvericin ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ชนิด P388 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยการย้อม Annexin V/PI staining assay และตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry โดยวิเคราะห์จากจำนวนเซลล์ 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นกราฟชนิด dot plot ที่ใช้จุดแทนตัวข้อมูล โดยในการวิเคราะห์ข้อมูลจะแบ่งออกเป็น 4 quadrant (Q1-Q4) โดย Q1 แสดงการตรวจพบการติดสีหรือการเรืองแสงของ PI (PI positive) ซึ่งหมายถึงการเกิด necrosis ของเซลล์, Q2 แสดงการตรวจพบการติดสีหรือการเรืองแสงทั้งสองสีของ Annexin V และ PI (Annexin V positive/ PI positive) หมายถึงระยะสุดท้ายของการเกิด apoptosis (late apoptosis), Q3 แสดงการตรวจที่ไม่พบการเรืองแสงทั้งสองสีของ Annexin V และ PI (Annexin V negative/ PI negative) ซึ่งหมายถึงเซลล์ที่มีชีวิต (Normal cell) และ Q4 แสดงการตรวจพบการเรืองแสงของ Annexin V เพียงอย่างเดียว (Annexin V positive/ PI negative) ซึ่งหมายถึงระยะเริ่มแรกของการเกิด apoptosis (early apoptosis) ดังแสดงค่าร้อยละของเซลล์ชนิด P388 ที่มีชีวิต เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรก และเซลล์ที่เกิด apoptosis ระยะท้าย จากกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในตารางที่ 3.5 และแสดงตัวอย่างกราฟ dot plot ในรูปที่ 3.6 โดยเป็นของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.6 A) และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซน (รูปที่ 3.6 B) เอทิลอะซิเตท (รูปที่ 3.6 C) และเอทานอล (รูปที่ 3.6 D) ที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่แสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ร้อยละ 87.40 ซึ่งอาจเป็นได้ว่าเซลล์ชนิด P388 เป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วทำให้มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากมีผลทำให้อาหารไม่เพียงพอ ดังนั้นควรลดปริมาณเซลล์เริ่มต้นลดน้อยลง และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เพียงร้อยละ 22.87 และแสดงเซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรกร้อยละ 44.50 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี MTT assay ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.6 แสดง dot plot histogram จาก Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry ของกลุ่มควบคุม (A) และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซน (B) เอทิลอะซิเตท (C) และเอทานอล (D) ที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ P388 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 แสดงค่าร้อยละของเซลล์ชนิด P388 ที่มีชีวิต เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรก และเซลล์ที่เกิด apoptosis ระยะท้าย จากกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จาก Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescent flow cytometry

	% Normal cell	% Early apoptosis cell	% Late apoptosis cell or Necrosis
Control	87.40	3.53	9.10
DMSO 2%	83.80	3.73	12.43
Hexane 1000 µg/ml	41.43	22.60	35.93
Hexane 2000 µg/ml	22.87	44.50	32.67
Ethyacetate 1000 µg/ml	29.77	5.53	64.70
Ethyacetate 2000 µg/ml	47.50	3.57	48.90
Ethanol 1000 µg/ml	78.07	11.43	10.50
Ethanol 2000 µg/ml	56.00	25.60	18.73
BEA 5 µg/ml	87.00	3.83	9.10
BEA 10 µg/ml	87.03	2.00	11.00
BEA 20 µg/ml	85.40	2.73	11.87
Mitomycin 5 µg/ml	78.63	4.50	16.83
Mitomycin 10 µg/ml	67.40	10.70	21.87
Mitomycin 20 µg/ml	44.17	10.93	44.87

3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต B มีแนวโน้มมีความเป็นพิษมากที่สุด จึงเลือกมาเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยจากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการแบ่งเซลล์ หลังการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเติมสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 2000 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ใช้เป็นกลุ่ม positive control และน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่ม negative control ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ และกระจายเซลล์บนสไลด์ เมื่อนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดจำนวน 2,000 เซลล์ และคำนวณจำนวนเซลล์เมทาเฟส นำไปหาค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic index) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใส่เฉพาะน้ำกลั่น

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ในชั้นเฮก-เซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 2000 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลั่น และ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าทั้งกลุ่มทดลอง และกลุ่มที่เติมเฉพาะน้ำกลั่นไม่พบความผิดปกติของโครโมโซมใดๆ (รูปที่ 3.7 A) แตกต่างจาก Mitomycin C ที่แสดงความผิดปกติของโครโมโซมทั้งชนิด single chromatid gap, isochromatid gap และ single chromatid break (รูปที่ 3.7 B) จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในระดับโครโมโซม

รูปที่ 3.7 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (A) โครโมโซมของคนปกติ และ (B) ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
สรุป และเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ทั้ง *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วย MTT assay การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด apoptosis ด้วยวิธี Annexin V/PI staining assay และตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry และศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human lymphocyte) ในอาหารเพาะเลี้ยง รวมทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยคัดเลือกจากเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และ *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน และแมลง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ช นิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 ด้วยวิธี Dual-culture agar diffusion พบว่าเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร YES ที่ระยะเวลา 28 วัน สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด และไอโซเลตที่แสดงผลในการยับยั้งที่ดีที่สุดใน *B. bassiana* คือ ไอโซเลต A (B019) และ ไอโซเลต B (B015) และ *B. brongniarti* คือ ไอโซเลต C (B013) และ ไอโซเลต C (B027) ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไป

เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากเชื้อรา 4 ไอโซเลต 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 และพบสารอื่นเช่น benzoic acid และ cephalosporolide ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่พบในปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion ที่นำส่วนของสารสกัดหยาบจากเส้นใยในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212

เมื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร beauvericin และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (murine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

leukemia cell: P388) เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast cancer cell: MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (human colon adenocarcinoma cell: HT-29) และ เซลล์ไตลิง (african green monkey kidny cell: Vero cell) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. brongniartii* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงความเป็นพิษในทุกเซลล์แต่มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น ซึ่งขึ้นกับไอโซเลตด้วยเช่นกัน โดยในการศึกษาในครั้งนี้ไอโซเลต B แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าไอโซเลต B และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำกว่า และเมื่อนำสารสกัดหยาบของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 2000 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด apoptosis ด้วยวิธี Annexin V/PI staining assay และตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท แสดงความเป็นพิษเช่นเดียวกัน แต่เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในระดับโครโมโซม พบว่าไม่มีความผิดปกติของโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นหากต้องการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* ไปใช้เป็นสารชีวภาพควรใช้เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบประสิทธิภาพต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆก่อนการนำไปใช้

จึงอาจกล่าวได้ว่าในการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในสภาวะแวดล้อมมีแน้วโน้มที่จะมีผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยง และมนุษย์ ในระดับต่ำ โดยเฉพาะเชื้อรา *B. brongniartii* และหากต้องการศึกษาถึงสารที่สามารถนำมายับยั้งเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ควรสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน หรือเอทิลอะซิเตท แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลา สายพันธุ์ของเชื้อรา และชนิดของเซลล์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้น (screening method) เท่านั้น เนื่องจากมีปัจจัยอีกหลายชนิดที่มีผลต่อการทดลองโดยเฉพาะเรื่องของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีอื่นๆ ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ รวมทั้งการประเมินความปลอดภัยในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สุวิชา ฮั้งตระกูล. 2552. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงด้วยเทคนิคทางโมเลกุล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Ansari, M.A., Tirry, L. and Moens M. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. BioControl. 50: 465–475.

Aung, O.M. 2008. Biodiversity and molecular phylogeny of entomopathogenic fungi in Chiangmai province, Thailand. Ph.D.Thesis of Philosophy in Biotechnology in Plant Pathology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

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.

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 Repro. Sci. 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.

Calo, L., Fornelli, F., Nenna, S., Tursi, A., Caiaffa, M.F. and Macchia, L. 2003. Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9. J. Appl. Genet. 44: 515-520.

Calo, L., Fornelli, F., Ramires, R., Nenna, S., Tursi, A., Caiaffa, M.F. and Macchia, L. 2004. Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. Pharmacol. Res. 49: 73-77.

de Muro, M.A., Elliott, S., Moore, D., Parkwe, B.L., Skinner, M., Reaid, W. and Bouhssini M.E. 2005. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (Eurygaster and Aelia species). Mycol. Res. 109: 294-306.

Dombrink-Kurtzman M.A. 2003. Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in Turkey peripheral blood lymphocytes. Mycopathologia. 156: 357-364.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Favilla, M., Macchia, L., Gallo, A, and Altomare, C. 2006. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. Food. Chem. Toxicol. 44: 1922–1931.

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.

Hamill, R.L., Higgens, C.E., Boaz, H.E. and Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Lett. 49: 4255-4258.

Harnois, D.M., Que, F.G., Celli, A., LaRusso, N.F. and Gores, G.J. 1997. Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line. Hepatology. 26: 884–890.

Henke, M.O., De Hoog, G.S., Gross, U., Zimmermann, G., Kraemer, D. and Weig, M. 2002. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. J Clin Microbiol 40: 2698-2702.

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.

Hussain, R.F., Nouri, A.M. and Oliver, R.T. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. J. Immunol Methods 160: 89-96.

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.

Jeffa, L.B. and Khachatourians, G.G. 1997. Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. Toxicon 1351-1356.

Jestoi, M., Somma, M.C., Kouva1, M., Veijalainen, P., Rizzo1, 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.

Jow, G-M., Chou, C-J., Chen, B-F. and Tsai, J-H. 2004. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. Cancer Lett 216: 165-173.

Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S. E., and Charnley, A.K. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. J. Invert. Pathol. 74: 213–223.

Krasnoff, S.B., Sommers, C., Moon, Y.S., Donzelli, B.G.G., Vandenberg, J. D., Churchill, A.C.L., and Gibson, D.M. 2006. Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. J. Agric. Food Chem. 54: 7083-7088.

Lee, S.Y., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H. and Nihira1, T. 2005. Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. Mycopathologia. 160: 321–325.

Li, Z., Li, C., Huang, B. and Meizhen, F. 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. Chinese Science Bulletin. 46: 751-753.

Lin, H.I., Lee, Y.J., Chen, B.F., Tsai, M.C., Lu, J.L., Chou, C.J. and Jow, G.M. 2005. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. Cancer Letters. 230: 248–259.

Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostecki, M., Golinski, P., Ritieni, A. and Chelkowski, J. 1998. Beauvericin production by Fusarium species. Appl Environ Microbiol. 64: 3084–3088.

Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Caiaffa, M.F., Macchia, L. 2002. Beauvericin: chemistry biology and significance. In: Upadhyay, R, editor. Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation. New York: Kluwer Academic, p. 23–30.

Macchia, L., Di Paola, R., Fornelli, F., Nenna, S., Moretti, A., Napoletano, R., Logrieco, A., Caiaffa, M.F., Tursi, A. and Bottalico, A. 1995. Cytotoxicity of beauvericin to mammalian cells. In: Proceedings of the International Seminar on *Fusarium* Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity. p. 72–73.

Miller, J.D., Greenhalgh, R., Wang, Y.Z. and Lu, M. 1991. Trichothecene chemotypes of 3 *Fusarium* species. Mycologia. 83: 121-130.

Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Randazzo, G. and Corda, P. 1995. Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. Mycol. Res. 99: 282-286.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method 65: 1017-1023.

Ojcius, D.M., Zychlinsky, A., Zheng, L.M., Young, JD-E. 1991. Ionophore induced

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. Exp. Cell. Res. 197: 43–49.

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.

Parine, N.R., Pathan, A.K., Sarayu, B., Nishanth, V.S. and Bobbarala, V. 2010. Antibacterial efficacy of secondary metabolites from entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Int J Chem Anal Sci* 1: 94-96.

Que, F.G., Gores, G.J. and LaRusso, N.F. 1997. Development and initial application of an in vitro model of apoptosis in rodent cholangiocytes. Am. J. Phys. 272: 106–115.

Quesada-Moraga, E., and Vey, A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Mycol. Res. 108: 441–452.

Rehner, S.A. and Buckley, E.P. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia. 97: 84-98.

Rehner, S.A., Posada, F., Buckley, E.P., Infante, F., Castillo, A. and Vega, F.E. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. J. Invert. Pathol. 93: 11-21.

Schnurer, 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., Langle, T., Pernfuss, B., Stuppner, H. and Strasser, H. 2005. High-performance liquid chromatography-diode array detection assay for the detection and quantification of the *Beauveria* metabolite oosporein from potato tubers. J. Chromato. 1092: 254–257.

Segvit Klarit M.S., Rumora, L., Ljubanovic, D. and Pepeljnjak, S. 2008. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. Arch Toxicol 82: 247-255.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Strasser, H., Vey, A., Butt, T.M. 2000. Are there any risks in using pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and species?. Biocontrol Sci. Technol. 10: 717-735.

Strasser, H., Abendstein, D., Stuppner, H. and M. Butt, T. 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. Mycol. Res. 104: 1227-1233.

Taniguchi, M., Kawaguchi, T., Tanaka, T. and Oi, S. 1984. Antimicrobial and respiration inhibitory activities of oosporein. Agric. Biol. Chem. 48: 1065-1067.

Thrane, T., Adler, A., Clasen, P.E., Galvano, F. Langseth, W., Lew, H. Logrieco, A., Nielsen, K.F. and Ritieni, A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. Inter. J. Food. Microbiol. 95: 257-266.

Thrane, U. and Hansen, U. 1995. Chemical and physiological characterization of taxa in the *Fusarium sambucinum* complex. Mycopathologia. 129: 183-190.

Wada, S. and Horita, M. 2003. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. Appl. Entomol. Zoo. 38: 551-557.

Watts P, Kittakoop P, Veeranondha S, Wanasith S, Thongwichian R, Saisaha P, Intamas S, Hywel-Jones NL. 2003. Cytotoxicity against insect cells of entomopathogenic fungi of the genera *Hypocrella* (anamorph Aschersonia): possible agents for biological control. Mycolog Res. 107: 581–586.

Wat, C.K., Mcinnes, A.G., Smith, D.G., Wright, J.L.C. and Vining, L.C. 1977. The yellow pigments of *Beauveria* species. structures of tenellin and bassianin. Can. J. Chem. 55: 4090-4098.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้