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

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

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 ที่วงจรชีวิตเริ่มจากเชื้อรา ระยะที่เป็นสปอร์ตกไปบนผิวของแมลงอาศัย (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

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

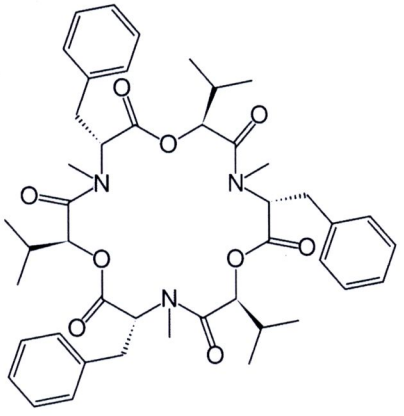
ได้แก่ เชื้อรา *B. brongniartii*, กลุ่ม C สปอร์มีรูปทรงกลมแต่ขนาดเล็กกว่ากลุ่ม A ขนาด 2.1-2.9 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana*, กลุ่ม D สปอร์มีรูปทรงกระบอก ขนาด 3.8-5.2 × 1.9-2.3 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. calendonica* และ *B. vermiconia*, กลุ่ม E สปอร์มีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่แต่สปอร์ยาวกว่ากลุ่ม 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

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

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),

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

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:

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

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