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 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่พบในปริมาณน้อย 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

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