191055
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
191055

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

b00255696

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
191055

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง: *Beauveria bassiana* และ *Beauveria brongniartii*

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

ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

191055

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)

191055

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

ABSTRACT

191055

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.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2554 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

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 เชื้อจุลิทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....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

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

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

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

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