กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2554 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบรูณ์

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 แสดงค่าความเขมขนที่ทำให้เซลลตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารละลาย beauvericin ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay.....32

3.4 แสดงค่าความเข่มขนที่ทำให้เซลลตายร้อยละ 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 เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยั้บยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....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