

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเหยาบที่ได้จากเชื้อรา
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, ความเป็นพิษต่อ
สารพันธุกรรม,

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

บทคัดย่อ

เชื้อราสกุล *Beauveria* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน และแมลง ถูกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยชีววิธี (biological control) เพื่อลดการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพทั้งของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเหยาบจากเส้นใยของเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร beauvericin (BEA) และสารสกัดเหยาบจากเชื้อรา *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 นำสารสกัดเหยาบที่ได้มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (MCF-7) และเซลล์ไตของลิง (Vero cell) ในหลอดทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดเหยาบจากเชื้อรา *B. brongniartii* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ และสารสกัดเหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงความเป็นพิษต่อทุกเซลล์ และเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท Lymphocyte มากที่สุด โดยไอโซเลต B มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด ($CC_{50} = 220.55 \mu\text{g/ml}$)

เช่นเดียวกับสาร beauvericin ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดเช่นกัน ($CC_{50} = 2.25$ $\mu\text{g/ml}$) ในการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ต่อเซลล์ชนิด P388 ด้วยวิธี Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry พบว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเมื่อทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ไม่แพ้เลยในหลอดทดลองในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสูงสุด คือ 80 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด (*Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212) ด้วยวิธี disc diffusion ให้ผลเช่นเดียวกับความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมที่สารสกัดยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 2000 $\mu\text{g/ml}$ โดยสารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จากสารสกัดยับยั้งที่วิเคราะห์โดย GC-MS คือ Hexadecanoic acid, 9, 12-Octadecanoic acid และ 9-Octadecanoic acid จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Beauveria* ขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งจากตัวทำละลาย ชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด และสายพันธุ์ของเชื้อรา

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 determined. 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 ($CC_{50} = 220.55 \mu\text{g/ml}$) like a beauvericin ($CC_{50} = 2.25 \mu\text{g/ml}$). 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 ($80\mu\text{g/ml}$). 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 $2000 \mu\text{g/ml}$. 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.