ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจาก *Metarhizium anisopliae*

Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Crude Extracts from *Metarhizium anisopliae*

กิตติพงษ์ มิตรขุนทด[1] สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม[1] และ เกษม สร้อยทอง[2]

Kittipong Mitkhunthod[1], Supattra Poeaim[1] and Kasem Soytong[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต (MA001 MA002 และ MA019) โดยนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต MA002 และ MA019 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งขนาด 15.22 และ 14.37 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดจากไอโซเลต MA019 ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis, S. aureus* และ *Micrococcus luteus* ที่ระดับความเข้มข้น 5 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิด (HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388) พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต MA001 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% cytotoxicity concentration: CC_{50}) เท่ากับ 1153.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบจากชั้นเฮกเซน และเมทานอล ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *M. anisopliae* จากชั้นเอทิลอะซิเตทอาจมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ABSTRACT

The aims of research was to study antimicrobial and cytotoxic activities of crude extracts from three isolates of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (MA001 MA002 and MA019) using paper disc diffusion method. The results showed that ethyl acetate crude extract from MA002 and MA019 at 10 mg/mL exhibited a significant antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* with a mean diameter of zone of inhibition of 15.22 and 14.37 millimeters, respectively. The crude extract of MA019 inhibited *Bacillus subtilis, S. aureus* and *Micrococcus luteus* at a MIC value of 5 5 and 2.5 mg/mL, respectively. Crude extracts were screened for in vitro cytotoxic activity by MTT assay method using five cell lines (HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 and P388). The result found that MA001 crude ethyl acetate extract was express CC_{50} value on P388 cell line with 1153.42 μg/mL. Hexane and methanol crude extract were not effective antimicrobial and weak cytotoxic effect on the different cell lines when

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

[1]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

[2]สาขาวิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

[2]Department of Pest Management Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

incubated for 24 hours. This results indicated that the ethyl acetate extract of *M. anisopliae* may be contained bioactive compounds.

Key Words: *Metarhizium anisopliae*, cytotoxic

e-mail address: cal_cal_68@hotmail.com

คำนำ

Metarhizium anisopliae เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง (entomopathogenic fungi) มีการนำมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) เนื่องจากสามารถสร้างสารเพื่อทำลายแมลงได้ ซึ่งสารที่ *M. anisopliae* สร้างออกมานี้บางส่วนอาจมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือฤทธิ์ในการฆ่าแมลง (insecticidal) กับแมลงศัตรูพืช (Kershaw *et al.,* 1999; Vey *et al.,* 2001) เชื้อรา *M. anisopliae*สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด เช่น destruxins swainsonine serinocyclins และ cytochalasins (C และ D) (Vey *et al.,* 2001; Krasnoff *et al.,* 2007) ซึ่งสาร destruxins (A, B และ E) จัดเป็นสารที่พบกลุ่มใหญ่ที่สุดและมีประโยชน์ในการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดที่ได้จาก *M. anisopliae* และฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น มีรายงานการพบสารใหม่ในกลุ่ม fungerin เช่น hydroxyfungerins A และ B ซึ่งแยกได้จากน้ำหมักของ *Metarhizium* sp. ไอโซเลต FKI-1079 สามารถยับยั้งการเจริญของไรสีน้ำตาล (*Artemia salina*) (Uchida *et al.,* 2005) เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Lee *et al.* (2008) ที่ได้ทดลองสกัดสารจากน้ำหมักของ *M. anisopliae* และได้สารชนิดใหม่คือ กรดเฮลโวลิค (helvolic acid) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้สารสกัดจากชั้นเมทานอลของเชื้อรา *Metarhizium flavoviride* พบสารสองชนิดคือ metarhizins A และ B ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไลน์แมลงและเซลล์ไลน์ของมนุษย์ (Kikuchi *et al.,* 2009)

เนื่องจากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อรา *M. anisopliae* ยังมีอยู่น้อย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาเชื้อราที่มีคุณสมบัติสร้างสารเมทาบอไลท์ที่เป็นประโยชน์ ซึ่งนอกจากเป็นการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆแล้ว ยังเป็นการประเมินฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อราที่นำมาใช้เป็นสารชีวภาพ โดยสกัดสารจากเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ MA001 MA002 และ MA019 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 5 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์ไตลิง (Vero) เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู (P388) ในหลอดทดลอง (*in* vitro) ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจเป็นแนวทางในการศึกษาสารบริสุทธิ์ องค์ประกอบ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จาก *M. anisopliae* ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเลี้ยงเชื้อราและสกัดสาร

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ MA001 MA002 และ MA019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน แยกเส้นใยนำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 วัน จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับกรอง

สารที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No.1 นำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* จากชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดคือ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* ATCC9341 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ด้วยวิธี disc diffusion ตามวิธีการของ Ansari *et al.* (2005) โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 จากนั้นทา (swab) เชื้อแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล เจือจางให้มีความเข้มข้น 0.625-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงแผ่น paper disc วางแผ่น paper disc บนอาหารที่ swab เชื้อแบคทีเรียแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. subtilis* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นการทดลองควบคุมแบบ positive control และเมทานอลเป็นการทดลองควบคุมแบบ negative control เมื่อครบเวลาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) ด้วยวิธี micro broth dilution ดัดแปลงจากวิธีการของ Doughari (2006) โดยเจือจางสารสกัดด้วย DMSO ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเจือจางสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) และใส่ในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มีเชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.039-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้ายในหลุมเป็น 100 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัด และหลุมที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae*

เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ (cell line) 5 ชนิด คือ HT-29, MCF-7, HepG2, P388 และ Vero ในอาหาร RPMI-1640 ที่เสริมด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) 8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Mosmann (1983) นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงต่อใน 96-well plate โดยให้มีปริมาณเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น $1.5x10^4$, $1x10^4$, $1.5x10^4$, $0.8x10^4$ และ $1.5x10^4$ เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรตามลำดับ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง และละลายผลึกฟอร์มาซานด้วยสารละลาย DMSO:เอทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในการทดลองใช้ DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเพื่อเป็นการทดลองควบคุมแบบ negative control และใช้ยาปฏิชีวนะ Mitomycin C ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นการทดลองควบคุมแบบ positive control

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิด คือ *B. subtilis, S. aureus, M. luteus, E. coli* และ *Ps. aeruginosa* ของสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ทั้ง 3 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.625-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อเปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 3 ไอโซเลตจากชั้นเอทิลอะซิเตทมีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด โดยสารสกัดจากไอโซเลต MA002 และ MA019 มีผลยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ15.22 และ14.37 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต MA002 และ MA019 มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.96 และ 10.96 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table1) ส่วนสารสกัดหยาบจากชั้นเฮกเซนและเมทานอลไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบทั้ง 5 ชนิด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มากขึ้นด้วย สำหรับเมทานอลที่ใช้เป็นการทดลองควบคุมแบบ negative control ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ดังแสดงตัวอย่างผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต MA002 ใน Figure 1

Table 1 Effect of *Metarhizium anisopliae* crude extract by ethyl acetate on growth of gram-positive bacteria using paper disc diffusion method

Isolates	Concentration (mg/ml)	Zone of inhibition (mm)*		
		B. subtilis	*S. aureus*	*M. luteus*
MA001	10	08.49±0.24[c*]	10.18±0.29[c]	07.86±0.24[c]
MA002	10	11.96±0.29[b]	15.22±0.15[ab]	12.60±0.35[b]
MA019	10	10.96±0.72[b]	14.37±0.57[b]	00.00±00
Gentamicin	0.1	18.90±0.34[a]	16.52±0.61[a]	17.09±0.36[a]

[1]Values represent mean (±SE) of three experiments each set up in triplicate

*Values followed by the same alphabet are not significantly different from each other analyzed by Duncan' s Multiple Range test at $P \leq 0.05$

ผลของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตทเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จึงได้ทำการทดลองเฉพาะสารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตทกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA019 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุด โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis, S. aureus* และ *M. luteus* เท่ากับ 5 5 และ 2.5 มิลกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ไอโซเลต MA001 มีค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งสามชนิดเท่ากัน คือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต MA002 มีค่า MIC ต่อเชื้อ *B.subtilis S. aureus* และ *M.*

luteus เท่ากับ 20 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2008) ที่ทดสอบสารสกัดจากน้ำหมักของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต HF293 พบว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ 209P การที่สารสกัดหยาบมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบของผนังเซลล์และการจัดเรียงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (Negi *et al.*, 2008) ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบมีชั้น outer phospholipidic membrane และโปรตีน porin ที่มีบทบาทในการควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่างๆ ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ของแบคทีเรีย (Nikaido and Vaara, 1985)

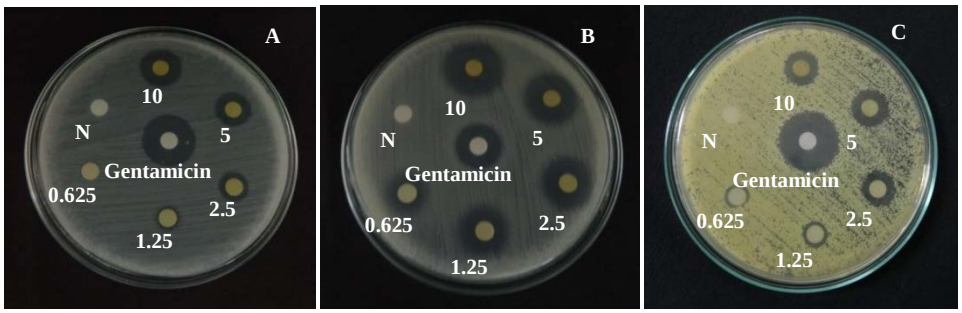

Figure 1 Antimicrobial activity of the crude ethyl acetate extracts from *M. anisopliae* isolate MA002, (A) *B. subtilis*, (B) *S. aureus* and (C) *M. luteus* after incubation for 24 hours. N= negative control, Methanol

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae*

เมื่อนำสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388 ด้วยวิธีการประเมินความอยู่รอดของเซลล์หลังจากทดสอบกับสารสกัด ด้วยวิธี MTT ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อเปลี่ยนสาร MTT ให้เป็นผลึก formazan และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีชีวิตที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (% cell viability) เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม ซึ่งนิยมรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ Mitomycin C (MMC) เป็นการทดลองควบคุมแบบ positive control ผลการทดลองพบว่า MMC ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าการมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีผลทำให้เซลล์ไลน์ P388 มีค่าความมีชีวิตรอดลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ Park *et al.* (2002) รายงานว่า MMC สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ alpha-TN4 mouse lens epithelial cells (LECs) ซึ่งฤทธิ์ของยาขึ้นอยู่กับปริมาณและเวลาที่ได้รับ อย่างไรก็ตาม MMC ยังมีผลทำให้เซลล์ไลน์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติมีค่าความมีชีวิตรอดลดลงอีกด้วย เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ไลน์ พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตท มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด เนื่องจากสารสกัดหยาบมีผลทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ P388 มีค่าลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}<2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิดอื่นในระดับต่ำ (CC_{50}>2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตท ของไอโซเลต MA001 มีพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1,153.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง Skrobek และ Butt (2005) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจาก *M.*

anisopliae สายพันธุ์ V275 เปรียบเทียบกับ Destruxin พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human promyelocytic leukemia cell line: HL-60) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (Sf9) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับการทดลอง Skrobek *et al.* (2006) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ V245 และ V275 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 ที่ความเข้มข้น 50 ppm และมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์แมลง Sf9 เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 300 และ 500 ppm ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero และ HepG-2 ในระดับต่ำ เนื่องจากทำให้ค่าการมีชีวิตรอดลดลงไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA019 และ MA002 จากชั้นเอทิลอะซิเตท พบว่ามีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 เนื่องจากทำให้ค่าการมีชีวิตรอดลดลง แต่ไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าความมีชีวิตรอดเท่ากับ 55.71 และ 76.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์โดยโปรแกรม GraphPad Prism 5 ดังแสดงใน Figure 2

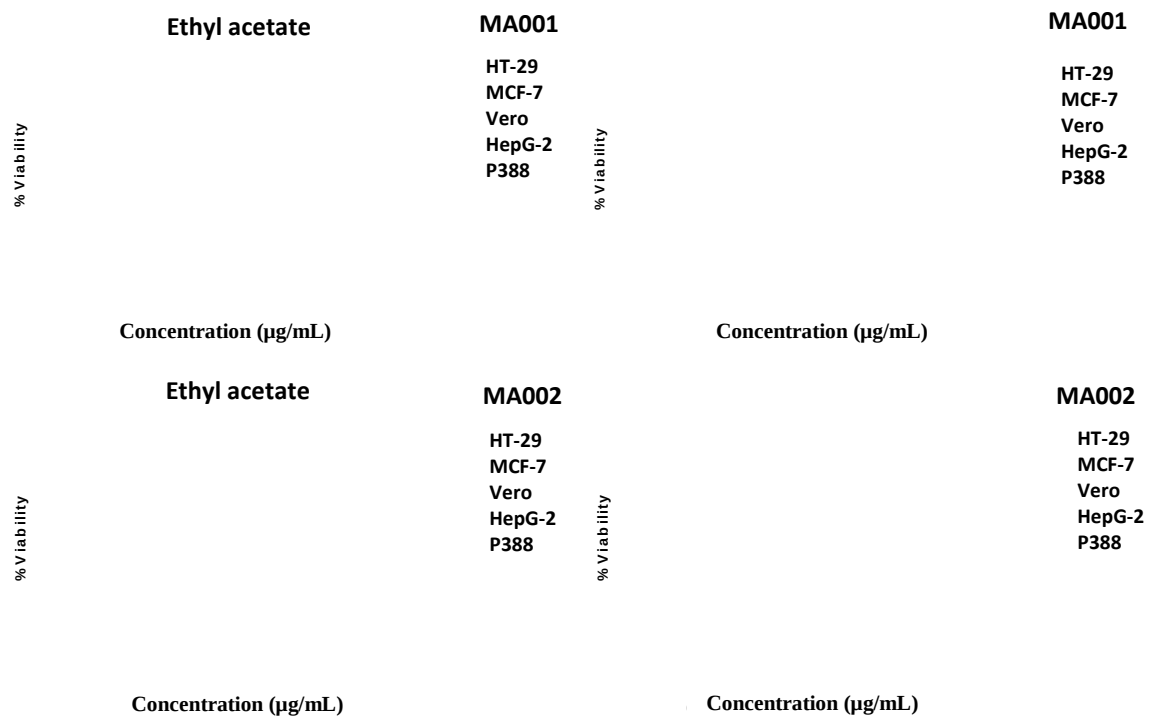

Figure 2 Effect of crude extracts from *M. anisopliae* on five different cell types (A) ethyl acetate extract of isolate MA001, (B) methanol extract of isolate MA001, (C) ethyl acetate extract of isolate MA002 and (D) methanol extract of isolate MA002 incubated for 24 hours

สารสกัดจากชั้นเฮกเซนทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดในชั้นเมทานอลสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ (Figure 2 B, 2 D) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saowanit and Angsumarin (2004) ที่ศึกษาสารสกัดจากเชื้อรา *H. thompsonii* เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ไตของหนูแฮมสเตอร์ (Hamster Syrian Kidney: BHK) และเซลล์ไลน์แมลง (Sf9) พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่ำ (0.78 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่ง

ยังไม่ทราบกลไกการกระตุ้น จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดจากไอโซเลต MA001 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไอโซเลต MA002 และ MA019 แม้ว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตจะเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดียวกันก็ตาม Zimmerman (2007) รายงานว่าคุณสมบัติของสารเมทาบอไลท์ที่ได้จากเชื้อราจะขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อาหารที่เพาะเลี้ยง และสภาวะแวดล้อมอีกด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดก็อาจมีผลต่อคุณสมบัติของสารที่ได้เช่นกัน (Ryan *et al*., 2003)

จากผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับนำมาสกัดสารจากเชื้อรา *M. anisopliae* เนื่องจากให้สารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มากที่สุด Zhang *et al.* (2004) รายงานว่าสารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยของเชื้อ *Cordyceps sinensis* ประกอบด้วยสารในกลุ่ม ergosterols glycosides และ polysaccharides แต่ไม่พบว่ามีสารประเภท alkaloids กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน หรือ peptides ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยของเชื้อ *M. anisopliae* อาจมีสารประกอบที่คล้ายคลึงกับสารที่ได้จาก *C. sinensis* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นเพียงงานวิจัยเบื้องต้นเท่านั้น ต้องมีการศึกษาถึงสารบริสุทธิ์ และคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อไป

สรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae* จากชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต MA002 และ MA019 มีผลยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ15.22±0.15 และ 14.37±0.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าอยู่ในช่วง 5-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ 5 ชนิด คือ HT-29, MCF-7, Vero, HepG-2 และ P388 ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิล-อะซิเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยพบความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดในเซลล์ชนิด P388 สารสกัดหยาบจากไอโซเลต MA001 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากที่สุด โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ1153.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้อาจกล่าวได้ว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. anisopliae* มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยง วิธีการสกัด หรือองค์ประกอบในสารสกัดเพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

Ansari, M.A., L. Tirry and M. Moens. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbions of entomopathogenic nematodes. **Biol. Control** 50: 465-475.

Doughari, J.H. 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. **Trop. J. Pharm. Res** 5: 597-603

Kikuchi, H., T. Hoshi, M. Kitayama, M. Sekiya, Y. Katou, K. Ueda, Y. Kubohara, H. Sato, M. Shimazu, S. Kurata and Y. Oshima. 2009. New diterpene pyrone-type compounds, metarhizins A and B, isolated from entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* and their inhibitory effects on cellular proliferation. **Tetrahedron** 65: 469-477.

Kershaw, M.J., E.R. Moorhouse, R. Bateman, S.E. Reynolds and A.K. Charnley. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. **J. Invertebr. Pathol** 74: 213-223.

Krasnoff, S.B., I. Keresztes, R.E. Gillilan, D.M.E. Szebenyi, B.G.G. Donzelli, A.C.L. Churchill and D.M. Gibson. 2007. Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. **J. Nat. Prod** 70: 1919-1924.

Lee, S.Y., H. Kinoshita, F. Ihara, Y. Igarashi and T. Nihira. 2008. Identification of novel derivative of helvolic acid from *Metarhizium anisopliae* grown in medium with insect component. **J. Biosci. Bioeng** 105: 476-480.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method** 65: 55-63.

Negi, P.S., G.K. Jayaprakasha and B.S. Jena. 2008. Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against food borne pathogens and spoilage bacteria. **LWT-Food Sci Technol** 41: 1857-1861.

Nikaido, H. and M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, **Microbiol. Rev** 49: 1-32.

Park, H.K., K.W. Lee, J.S. Choi and C.K. Joo. 2002. Mitomycin C induced cell death in mouse lens epithelial cells. **Ophthalmic Res** 34: 213-219.

Ryan, M.J., D. Smith, P.D. Bridge and P. Jeffries. 2003. The relationship between fungal preservation method and secondary metabolite production in *Metarhizium anisopliae* and *Fusarium oxysorum*. **Wold J. Microbiol Biotechnol** 19: 839-844.

Saowanit, M. and C. Angsumarin. 2004. Chemical Components of *Hirsutella thompsonii* Crude Filtrate and their Biological Activities. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 38: 331-339.

Skrobek, A. and T.M. Butt. 2005. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* **FEMS Microbiol. Lett** 2551: 23-28.

Skrobek, A., D. Boss, G. Defago, T.M. Butt and M. Maurhofer. 2006. Evaluation of different biological test systems to assess the toxicity of metabolites from fungal biocontrol agents. **Toxicol. Lett** 261: 43-52.

Uchida, R., R. Imasato, Y. Yamaguchi, R. Masuma, J. Shiomi, H. Tomoda and S. Omura. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxyfungerins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. **Jpn. J. Antibiot** 58: 804-809.

Vey, A., R. Hoagland and T.M. Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C.W., Magan N., editors. Fungi as biocontrol agents: problems and potential. Wallingsford, **UK: CABI International**, pp. 311-346.

Zhang, Q., J. Wu, Z. Hu and D.L. Bum. 2004. Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* fungal mycelium.**Life Sci**, 75: 2911-2919.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae.* **Ann. Bioeth** 17: 879-920.