ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย

นางสาวรัชนี สวัสดิ์ชูพงศ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-1498-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM THAI MEDICINAL PLANTS

Miss Rachanee Sawatchupong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-1498-8

Thesis Title	ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM THAI MEDICINAL PLANTS
By	Miss Rachanee Sawatchupong
Field of Study	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph. D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph. D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph. D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph. D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph. D.)

..... Member

(Assistant Professor Suthep Wiyakrutta, Ph. D.)

นางสาวรัชนี สวัสดิ์ชูพงศ์ : ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย. ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM THAI MEDICINAL PLANTS อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. นิจศิริ เรืองรังษี , 105 หน้า. ISBN 974-03-1498-8.

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือการศึกษาหาราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดื้อยาและ/หรือจุลินทรีย์ที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะต่ำ ได้ใช้ gradient plate technique เพื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะต่ำจากจุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐานคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะต่ำโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกกับค่าต่อสายพันธุ์เดิมต้องมีค่ามากกว่าอย่างน้อย 4 เท่า เมื่อทดสอบโดยวิธี disk diffusion พบว่าสายพันธุ์ของ *S. aureus* และ *E. coli* ที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะต่ำทุกสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ยกเว้นสายพันธุ์ *S. aureus* ที่มีความไวรับต่อยา tetracycline ต่ำ สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลตจากใบและกิ่งที่ได้ทำให้พื้นผิวปราศจากเชื้อ โดยแยกราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ได้จากกิ่ง พบราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรไทย 6 ชนิด คือ กระดังงาไทย (*Canangium odoratum* Bail.), พญายา (*Hesperethusa crenulata* Roem.), เทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis* Linn.), แก้ว (*Murraya paniculata* (L.) Jack.), ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) และ ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* Merr.) ทำการทดสอบฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์โดยวิธี dual-culture agar diffusion พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ (74.14%) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐาน อาหารเพาะเชื้อราเอนโดไฟท์ต่างชนิดกันส่งผลถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ พบว่าราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27953 และ *Trichophyton mentagrophytes* (clinical isolate) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อที่มี malt extract เป็นส่วนประกอบมีจำนวนสูง ราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้าน *Pseudomonas aeruginosa* และ *Trichophyton mentagrophytes* มีจำนวนสูงเมื่อเพาะเลี้ยงบน yeast extract sucrose พบว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ที่เก็บรักษาไว้ไม่คงตัว ราเอนโดไฟท์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่คงตัวมีทั้งหมด 29 (29.00%), 4 (23.53%), 4 (7.14%) และ 1 (3.70%) ไอโซเลต ยังคงมีฤทธิ์ต้าน *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* และ *S. cereviseae*, ตามลำดับ พบราเอนโดไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลต (17.24%) มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ที่ดื้อยาและ/หรือที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะต่ำ พบว่าราเอนโดไฟท์จำนวน 4 ไอโซเลตไม่สร้างโคนีเดีย จึงจัดเป็น mycelia sterilia และ 1 ไอโซเลต คือ *Line* 13 สร้างโคนีเดียที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *Altemaria* sp.

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4276582833 : MAJOR Microbiology

KEY WORD: Endophytic fungi/ antimicrobial activities/ low susceptible strains/ dual-culture agar diffusion assay/ gradient plate technique

RACHANEE SAWATCHUPONG : THESIS TITLE. ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM THAI MEDICINAL PLANTS THESIS ADVISOR : Associate Professor Dr. NONGLUKSNA SRIUBOLMAS, THESIS COADVISOR : Associate Professor Dr.NIJSIRI RUANGRUNGSI, 105 pp. ISBN 974-03-1498-8.

This study aimed to search endophytic fungus isolates for antimicrobial activities against resistant and/or low susceptible microbial strains. Gradient plate technique was used to select for the low susceptible mutants from the standard strains including *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. The mutant that resisted to the antibiotic in concentration of at least 4 MIC was selected. Susceptibility test by disk diffusion method showed that all of low susceptible strains of *S. aureus* and *E. coli* were resistant strains except for *S. aureus* strain with low susceptibility to tetracycline antibiotic. A total of 58 endopytic fungus isolates could be collected from surface-sterilezed samples of 6 Thai medicinal plants, i.e. *Canangium odoratum* Bail., *Hesperethusa crenulata* Roem., *Lawsonia inermis* Linn., *Murraya paniculata* (L.) Jack., *Piper sarmentosum* Roxb. and *Sauropus androgynus* Merr. By dual-culture agar diffusion assay, most of them (74.14%) exhibited antimicrobial activities against the standard strains. Effect of culture media, used in cultivation of endophytic fungus isolates, on expression of antimicrobial activities was observed. Higher number of active endophytic fungus isolates grown on media containing malt extract expressed their activities against all test organisms except *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27953 and *Trichophyton mentagrophytes* (clinical isolate). Yeast extract sucrose was found to promote the expression of activities against these two organisms. Actimicrobial activities of these active isolates and active isolates preserved in stock culture were found to be unstable. A total of 29 (29.00%), 4 (23.53%), 4 (7.14%) and 1 (3.70%) isolates of the active fungal endophyte were still active against *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* and *S. cerevisiae*, respectively. It was found that only 5 isolates (17.24%) exhibited activities against the resistant and/or low susceptible *S. aureus*. Four isolates were found to be mycelia sterilia and one isolate was identified as *Alternaria* sp.

ภาควิชา Microbiology ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา Microbiology ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2001 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my infinite gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Nongluksna Sriubolmas and my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Nijsiri Ruangrungsi for their guidance, suggestion, kindness and encouragement throughout my research study. They are always stand beside me to help, consult and advise me in every way that would bring me success and great development.

I wish to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Pintip Pongpech and Assistant Professor Dr. Suthep Wiyakrutta for their kindness and helpful suggesting for the complements of this thesis.

I wish to express my thankful to all officers ant kitchen members in Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and helpful during my study.

I also wish to express my sincere appreciation to the Department of Microbiology and Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing facilities during my study.

Finally, I wish to express my thanks to my family and my friends for their great patience, love, understanding, assistance, and encouragement throughout this graduate study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... x

LIST OF FIGURES..... xii

LIST OF ABBREVIATIONS..... xv

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS..... 3

1. Endophytic fungi..... 3

1.1 Definition of Endophyte..... 3

1.2 Distribution of Endophytic Fungi..... 3

1.3 Fungal Endophytes and their Secondary Metabolites..... 5

2. Genetic Basis of Antibiotic Resistance..... 6

3. Biochemical Mechanisms of Antibiotic Resistance..... 7

3.1 Decreased Drug Uptake or Increased Efflux of the Drug..... 7

3.2 Enzymatic Inactivation of Drug..... 8

3.3 Decreased Conversion of a Drug to the Active Growth Inhibitory Compound..... 8

3.4 Increased Concentration of a Metabolite Antagonizing the Drug Action..... 8

3.5 Altered Amount of Drug Receptor..... 8

3.6 Decreased Affinity of Receptor for the Drug..... 9

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS..... 10

Materials..... 10

Methods..... 12

1. Collection of Plant Samples..... 13

2. Isolation of Endophytic Fungi..... 13

3. Preservation of Endophytic Fungus Isolates..... 13

3.1 Storage under Liquid Paraffin..... 13

CONTENTS (CONT.)

Page

3.2 Storage in 15% Glycerol.....13

4. Screening of Endophytic Fungus Isolates for their Antimicrobial Activities by Dual-Culture Agar Diffusion Assay.....14

4.1 Test Microorganisms.....14

4.2 Cultivation of Endophytic Fungus Isolates.....14

4.3 Preparation of Inoculum.....14

4.4 Testing for Antimicrobial Activity.....15

5. Determination of Stability of Antimicrobial Activities.....15

6. Selection of Low Susceptible Microbial Strains.....15

6.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibiotics for Reference Strains.....15

6.2 Selection of Low Susceptible Strains by Gradient Plate Technique.....18

7. Determination of Susceptibility of Selected Mutants.....18

7.1 Broth Microdilution Method.....18

7.2 Agar Diffusion Assay.....20

8. Determination of Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi against Low Susceptible Strains.....21

9. Determination of MICs of Crude Extracts obtained from Culture Broths of Selected Endophytic Fungus Isolates.....21

10. Identification of Selected Endophytic Fungus Isolates.....21

CHAPTER IV RESULTS.....23

1. Isolation of Endophytic Fungi.....23

2. Antimicrobial Activities of Isolated Endophytic Fungi.....24

3. Effect of Culture Media on Antimicrobial Activity of Endophytic Fungus Isolates.....29

4. Stability of Antimicrobial Activity of Active Endophytic Fungus Isolates.....30

5. Susceptibility of Selected Mutants.....31

CONTENTS (CONT.)

Page

6. Antimicrobial Activities of Active Endophytic Fungus Isolates Against Low Susceptible Strains 45
7. Identification of Selected Endophytic Fungus..... 47

CHAPTER V DISCUSSION..... 56
CHAPTER VI CONCLUSION..... 59
REFERENCES..... 60
APPENDIX..... 64
BIOGRAPHY..... 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Ranges of antibiotic concentrations used in determination of MICs for reference and low susceptible strains.....17
2. Final concentrations of antibiotics (xMIC) used in selection of low susceptible mutants.....19
3. Number of endophytic fungi isolated from leaves and limbs of Thai medicinal plants.....23
4. Minimum inhibitory concentrations (MICs) (μg/ml) of antibiotic for wildtype strains and the selected mutants.....32
5. The inhibition zone diameters (mm) of *S. aureus* ATCC 29213 and mutant strains around the antibiotic disks.....33
6. The inhibition zone diameters (mm) of *E. coli* ATCC 25922 and mutant strains around the antibiotic disks.....34
7. Inhibition zone (mm) measured from the agar block of endophytic fungus culture exhibiting antimicrobial activities against selected *S. aureus* mutants....46
8. The MICs (μg/ml) of crude extracts that were obtained from active endophytic fungus isolates exhibiting activities against *S.aureus* mutants.....46
9. Inhibition zone (mm) measured from the agar block of endophytic fungus culture.....67
10. Endophytic fungus isolates from stock culture exhibiting the loss of anti-*S. aureus* activity.....82
11. Inhibition zone (mm) measured from the agar block of endophytic fungus culture with stable anti-*S. aureus* activity.....83
12. Endophytic fungus isolates from stock culture exhibiting the loss of anti-*E. coli* activity.....84
13. Inhibition zone (mm) measured from the agar block of endophytic fungus culture with stable anti-*E. coli* activity.....84
14. Endophytic fungus isolates from stock culture exhibiting the loss of anti-*C. albicans* activity.....85

LIST OF TABLES (CONT.)

Table **Page**

15. Inhibition zone (mm) measured from the agar block of endophytic fungus culture with stable anti-*C. albicans* activity.....86
16. Endophytic fungus isolates from stock culture exhibiting the loss of anti-*S. cerevisiae* activity.....86
17. Inhibition zone (mm) measured from the agar block of endophytic fungus culture with stable anti-*C. albicans* activity.....87
18. Codes and plant hosts of endophytic fungus isolates retrieved from the stock culture.....87

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Numbers of endophytic fungus isolates exhibiting antimicrobial activities.....24
2. Dual-culture agar diffusion assay exhibiting anti-*S. aureus* activity of endophytic fungus isolate *Line* 13 grown on malt extract agar.....25
3. Dual-culture agar diffusion assay exhibiting anti-*P. aeruginosa* activity of endophytic fungus isolate *Hcre* 10 grown on yeast extract sucrose agar.....26
4. Dual-culture agar diffusion assay exhibiting anti-*C. albicans* activity of endophytic fungus isolate *Hcre* 11 grown on malt Czapek agar.....27
5. Dual-culture agar diffusion assay exhibiting anti-*T. mentagrophytes* activity of endophytic fungus isolate *Mpan* 01 grown on Czapek yeast autolysate agar, malt Czapek agar, malt extract agar, Sabouraud's dextrose agar and yeast extract sucrose agar.....28
6. Numbers of active endophytic fungus isolates demonstrating activities against test microorganisms when cultured on different media.....29
7. Numbers of endophytic fungus isolates, previously observed as active, exhibiting stable and unstable antimicrobial activities.....30
8. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating inhibition zone of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 around penicillin G, tetracycline and vancomycin antibiotic disks.....35
9. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating resistance of *S. aureus* mutant to penicillin G.....36
10. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating inhibition zone of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 around cephalosporin C, D-cycloserine, lincomycin and rifampin antibiotic disks.....37
11. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating resistance of *S. aureus* mutant to D-cycloserine.....38
12. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating resistance of *S. aureus* mutant to rifampin.....39

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure **Page**

13. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating inhibition zone of *Escherichia coli* ATCC 25922 around chloramphenicol, kanamycin, polymyxin B and tetracycline antibiotic disks.....40
14. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating resistance of *E. coli* mutant to polymyxin B.....41
15. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating inhibition zone of *Escherichia coli* ATCC 25922 around cephalosporin C, D-cycloserine and rifampin antibiotic disks.....42
16. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating resistance of *E. coli* mutant to D-cycloserine.....43
17. Antibiotic disk-agar diffusion assay demonstrating resistance of *E. coli* mutant to rifampin.....44
18. Obverse (A) and reverse (B) of colony morphology of endophytic fungus isolate *Bore* 04 grown on 5 different media at 30 °C for 14 days.....48
19. Obverse (A) and reverse (B) of colony morphology of endophytic fungus isolate *Ccoc* 08 grown on 5 different media at 30 °C for 14 days.....49
20. Obverse (A) and reverse (B) of colony morphology of endophytic fungus isolate *Cfis* 01A grown on 5 different media at 30 °C for 14 days.....50
21. Obverse (A) and reverse (B) of colony morphology of endophytic fungus isolate *Line* 13 grown on 5 different media at 30 °C for 14 days.....51
22. Obverse (A) and reverse (B) of colony morphology of endophytic fungus isolate *Oind* 05A grown on 5 different media at 30 °C for 14 days.....52
23. Microscopic morphology of endophytic fungus isolate *Line* 13 showing dematiaceous fungus with chain of conidia and sympodial conidiophore (x400).....53
24. Microscopic morphology of endophytic fungus isolate *Line* 13 showing conidia in the form of dictyospore (arrow) and sympodial conidiophore (x400).....54

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure **Page**

25. Microscopic morphology of endophytic fungus isolate *Line* 13 showing acropetal conidial development.....55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

CFU	colony forming unit
CzYA	Czapek yeast autolysate agar
DMSO	dimethylsulfoxide
h	hour
INT	*p*-iodonitrotetrazolium violet
L	litre
MCzA	malt Czapek agar
MEA	malt extract agar
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
PDA	potato dextrose agar
rpm	round per minute
µg	microgram
SDA	Sabouraud's dextrose agar
YES	yeast extract sucrose agar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย