การคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าว

Screening of Antibacterial Activity of Endophytes Isolated from Rice Plants

สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์*, วัชรพงษ์ ป้องปาน และรัตนาพร อยู่พร้อม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

Sakulrat Rattanakiat*, Watcharapong Pongpan and Rattanaporn Yooprom

Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University,

Kham Riang, Kantharawichai, Maha Sarakham 44150

บทคัดย่อ

เอนโดไฟต์คือจุลินทรีย์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อโรค เป็นแหล่งผลิตสารสำคัญในธรรมชาติที่พัฒนาเป็นยาใหม่ได้ ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เอนโดไฟต์จากข้าวสามารถเป็นแหล่งที่ดีในการพัฒนาเป็นยาใหม่สำหรับรักษาโรค ซึ่งรวมถึงยาปฏิชีวนะ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อแยกและศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ของเอนโดไฟต์ที่พบในราก ลำต้น และใบของต้นข้าว โดยแยกเอนโดไฟต์มาจากต้นข้าว 2 บริเวณ เพาะเลี้ยงแล้วสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ด้วยวิธี broth-macrodilution ในการศึกษานี้แยกเอนโดไฟต์จากต้นข้าวได้ 44 ไอโซเลต จากการคัดกรองเบื้องต้นพบตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 61.63) คัดเลือกเอนโดไฟต์ทดสอบในขั้นต่อไป 3 ไอโซเลต คือ S133, S232 และ R214 โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของเอนโดไฟต์ทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ให้โซนใสระหว่าง 7.09 ถึง 13.25 มิลลิเมตร ค่า MBC ระหว่าง 16.67 ถึงมากกว่า 33.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟต์จากต้นข้าวเป็นอีกแหล่งหนึ่งของสารต้านจุลชีพที่สามารถพัฒนาได้ต่อไป

คำสำคัญ : ข้าว; เอนโดไฟต์; ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Abstract

Endophytes are microorganisms that live inside the living plant tissues without causing any apparent disease symptoms in the host. The endophytes are known to produce various natural

**Corresponding author: sakulrat.r@msu.ac.th*

products, which could be a consistent and successful source of drugs. Rice (*Oryza sativa* L.) is the most important crop in Thailand. Endophytes from rice could be the great sources of new therapeutic compounds including antibiotics. The purpose of this study was to isolate endophytes from roots, leaves and stems of rice plant, and investigate their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa.* The endophytes were isolated from the plants collected from 2 areas, and ethanolic extracts of culture medium were screened for antibacterial activity using agar well diffusion method. Minimum bactericidal concentration (MBC) was investigated using broth- macrodilution method. The screening of antibacterial activity was found in 27 isolates (61.63 %), out of all 44 isolates. Three isolates with high activity were selected for further investigation including S133, S232 and R214. Inhibitory effects were observed in all 3 endophytes against tested bacteria with clear zone of 7.09 to 13.25 mm. and MBC 16.67 to more than 33.33 mg/ml. These indicated that endophytes isolated from rice plant could be a promising source of antimicrobial substances.

Keywords: *Oryza sativa* L.; endophyte; antibacterial activity

1. คำนำ

เอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโฮสต์ โดยไม่ทำอันตรายหรือส่งผลเสียต่อโฮสต์นั้น สามารถพบได้ทุกส่วนของพืชทุกวงศ์ทั่วโลก เป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา การอยู่ร่วมกันของเอนโดไฟต์และต้นพืชจะช่วยให้ทั้งพืชและเอนโดไฟต์ได้ประโยชน์ร่วมกัน โดยพืชให้สารอาหารกับเอนโดไฟต์ใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเอนโดไฟต์ช่วยปกป้องพืชจากจุลชีพก่อโรค ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุและอาหาร ช่วยการเจริญเติบโตและทำให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีขึ้น (Martinez-Klimovat *et al.*, 2017) ดังนั้นจึงทำให้เชื่อว่าต้นพืชที่มีเอนโดไฟต์อยู่จะเจริญเติบโตและแข็งแรงกว่าต้นพืชที่ไม่มีเอนโดไฟต์ จากสารที่เอนโดไฟต์สร้างขึ้น ซึ่งเรียกว่าสารทุติยภูมิ เป็นสารที่สามารถนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม การแพทย์ รวมทั้งอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ตัวอย่างสารที่เอนโดไฟต์สร้างขึ้นได้และมีประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ แพคลิแท๊กเซิล (paclitaxel) ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่เป็นที่รู้จักซึ่งดั้งเดิมสกัดได้จากพืช สารต้านอนุมูลอิสระ สารกดภูมิคุ้มกัน สารที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด สารต้านไวรัส รา และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Sun *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2016; Martinez-Klimova *et al.*, 2017) จึงทำให้เอนโดไฟต์เป็นแหล่งสำคัญทางธรรมชาติแหล่งหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจในค้นหาสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Porras-Alfaro and Bayman, 2011; Mousa and Raizada, 2013) ซึ่งปัจจุบันปัญหาเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเป็นปัญหาระดับโลกที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ รวมทั้งในประเทศไทย ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555) ยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่มีอยู่ในปัจจุบันนั้น ไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การค้นหายาต้านจุลชีพชนิดใหม่ จึงยังคงเป็นประเด็นที่ท้าทายของนักวิจัย (Laxminarayan *et al.*, 2013)

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่

สำคัญมากของไทย มีผู้รายงานว่าพบเอนโดไฟต์หลายชนิดในต้นข้าว (Mano และ Morisaki, 2008) มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟต์จากต้นข้าวทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศอย่างต่อเนื่อง เช่น งานวิจัยของ สายทอง (2557) สามารถแยก *Trichoderma* sp. ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคไหม้ของข้าวได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อนันต์ (2557) พบเอนโดไฟต์ไอโซเลต GR03 ที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว 6 ชนิด และยังส่งเสริมการเจริญของกล้าข้าวได้ เอนโดไฟต์ที่แยกโดย Naik และคณะ (2009) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าว 5 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ งานวิจัยเหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของเอนโดไฟต์จากข้าวในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคในข้าวและการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในมนุษย์นั้น แม้มีการศึกษาในเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชหลายชนิด แต่ยังมีการศึกษาน้อยในเอนโดไฟต์ที่แยกจากข้าว ผู้วิจัยพบเพียงงานวิจัยของ Supong และคณะ (2016) โดยพบว่าเอนโดไฟต์จากข้าวสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรียสายพันธุ์ดื้อยา เชื้อก่อโรควัณโรค *Bacillus cereus* และเชื้ออื่น ๆ ดังนั้นเอนโดไฟต์จากต้นข้าวอาจเป็นแหล่งค้นพบสารต้านจุลชีพที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่ได้ต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจแยกเอนโดไฟต์จากข้าวและคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารที่เอนโดไฟต์สร้างขึ้น

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่างและแหล่งเก็บตัวอย่าง

ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 3 เดือน เก็บในเดือนกันยายน พ.ศ. 2557 จาก 2 บริเวณ ซึ่งห่างกันประมาณ 20 เมตร ในแปลงเดียวกัน อยู่ในพื้นที่หมู่บ้านดอนหน่อง ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม โดยใช้ทั้งต้นโดยแยกส่วนเป็นราก ลำต้น และใบ เริ่มการทดลองภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างมา

2.2 แบคทีเรียทดสอบ

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* DMST8440, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20652, *Bacillus subtilis* DMST15896, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* DMST4739 ซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพาะเลี้ยงใน tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ

2.3 การแยกเอนโดไฟต์

นำใบ ลำต้น และรากมาทำความสะอาดโดยเปิดน้ำไหลผ่าน แล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร และทำความสะอาดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 2 นาที สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (มีความเข้มข้นของคลอรีนปลดปล่อยอิสระจากสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์) 5 นาที เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 30 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ทำความสะอาดแล้วมาวางในจานเพาะเชื้อที่ใส่ potato dextrose agar (PDA) ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อาจหลงเหลืออยู่ผิวนอกของเนื้อเยื่อพืช แล้วนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-12 วัน โดยสังเกตจากการเจริญเติบโตของเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยตัดเก็บส่วนปลายเส้นใยของเชื้อ หรือเก็บโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดที่มีลักษณะแตกต่างกัน แล้วเพาะแยกลงบน PDA บ่มต่ออีก 1-12 วัน โดยสังเกตจากการเจริญเติบโตของเชื้อ แยกเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันลงใน PDA ต่อไปจนได้เชื้อบริสุทธิ์ การกำหนดรหัสของเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ เป็นดังนี้ ชิ้นส่วน/บริเวณที่/ลำดับที่ของเชื้อที่แยกได้

โดย L คือ ส่วนใบ, R คือ ส่วนราก และ S คือ ส่วนลำต้น จากนั้นจึงศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเอนโดไฟต์ที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.4 การคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของเอนโดไฟต์

การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น โดยเพาะเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) 20 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อในวันที่ 7 โดยไม่ผ่านกรรมวิธีใด ๆ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น โดยวิธี agar well diffusion ในวันเดียวกัน

การทดสอบโดยวิธี agar well diffusion ทำ 1 ครั้ง ครั้งละมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ซ้ำ มีวิธีทำดังนี้ นำแบคทีเรียทดสอบที่บ่มไว้ 1 คืน กระจายตัวในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นเทียบเท่าระดับ 0.5 ของสารมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ (McFarland standard No. 0.5) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) ที่เตรียมไว้ เจาะหลุมในวุ้นเลี้ยงเชื้อ แล้วเติมน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโด-ไฟต์ หลุมละ 70 ไมโครลิตร มีคลอแรมเฟนิคอล 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก และ PDB เป็นตัวควบคุมผลลบ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) จากนั้นจึงคัดเลือกเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านแบคทีเรีย ไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ แล้วจึงนำอาหารเพาะเลี้ยงมาสกัดสารสกัดหยาบทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียซ้ำ และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี broth macrodilution

2.5 การสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟต์

เพาะเลี้ยงเอนโดไฟต์ใน PDB 200 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อดังนี้ นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเติมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 1 คืน จากนั้นนำมาสกัดด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ขนาดกำลังของความถี่ 55 วัตต์ นาน 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง กำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่เหลือไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เก็บสารสกัดที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป คำนวณร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบจากสมการ

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักน้ำเลี้ยงเชื้อ (กรัม)}} \times 100$$

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นของสารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเอนโดไฟต์

ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับการคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของเอนโดไฟต์ แต่สารทดสอบเป็นสารละลายสารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเอนโดไฟต์ที่เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวทำละลายสารสกัดและตัวควบคุมผลลบคือ PDB ที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC)

ผสมสารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้น 33.33, 16.67, 8.33, 4.17 และ 2.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเชื้อทดสอบความเข้มข้นคงที่ทุกหลอดประมาณ 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ

คือ tryptic soy broth ปริมาตรรวมในหลอดทดลองเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร หลอดควบคุมผลบวก คือ คลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดควบคุมผลลบ คือ เชื้อในอาหารเลี้ยง หลอดควบคุมความปราศจากเชื้อประกอบด้วยสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่มีเชื้อ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่ใสหรือไม่พบการเจริญของเชื้อเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าเมื่อเทียบกับหลอดควบคุม มาเพาะเพื่อนับจำนวนโคโลนีโดยวิธีการนับจุลินทรีย์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate count) เพื่อหาค่า MBC โดยใช้อาหาร TSA นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จานเพาะเชื้อของหลอดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ หรือมีจำนวนเชื้อไม่เกินร้อยละ 0.1 ของปริมาณเชื้อตั้งต้น ถือว่าเป็นหลอดที่มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับค่า MBC (Clinical laboratory standards institute, 1999) ทดสอบครั้งละ 1 หลอดต่อ 1 ความเข้มข้น จำนวน 3 ครั้ง

2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าโซนใสและค่า MBC ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการแยกเอนโดไฟต์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การศึกษานี้สามารถแยกเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต แยกได้จากใบ 14 ไอโซเลต (ร้อยละ 31.82) ในจำนวนนี้เป็นไอโซเลตที่ให้โซนใสกับเชื้อทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด 8 ไอโซเลต แยกได้จากลำต้น 18 ไอโซเลต (ร้อยละ 40.91) ในจำนวนนี้เป็นไอโซเลตที่ให้โซนใสกับเชื้อทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด 12 ไอโซเลต และแยกได้จากราก 12 ไอโซเลต (ร้อยละ 27.27) ในจำนวนนี้เป็นไอโซเลตที่ให้โซนใสกับเชื้อทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด 7 ไอโซเลต รวมเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจากการคัดกรองเบื้องต้นจำนวน 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 61.36) ดังแสดงในตารางที่ 1

จากการคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้น พิจารณาไอโซเลตที่ให้โซนใสกับเชื้อทดสอบมากกว่า 1 ชนิด รวมทั้ง MRSA และมีขนาดโซนใสที่กว้าง ได้คัดเลือกเอนโดไฟต์จำนวน 3 ไอโซเลต เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป คือ S133 ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน MRSA, *E. coli* และ *B. subtilis* ได้ดี S232 และ R214 ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* และ MRSA ได้ดี ทั้งนี้มีไอโซเลตอื่นอีกที่แสดงฤทธิ์ที่ดีในการคัดกรองเบื้องต้นด้วย เช่น S221, R211 แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้และเชื้อที่เก็บไว้ใช้งาน (stock culture) ตายระหว่างการทดสอบ จึงไม่สามารถนำมาทดสอบในขั้นต่อไป

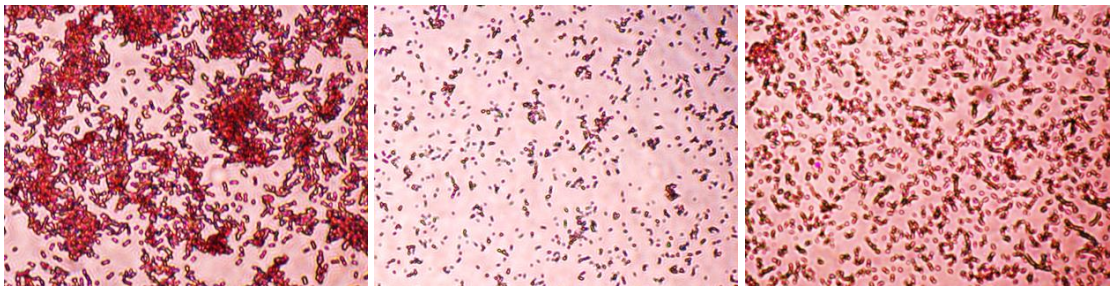
ลักษณะของเอนโดไฟต์บนอาหารแข็ง พบว่า S133 มีสีขาวแกมเขียว ขอบเรียบ ผิวเรียบ ส่วน R214 มีสีขาวครีม ขอบนูนขึ้นเป็นเส้น ผิวตรงกลางเรียบ และ S232 สีขาวครีมเป็นมัน ขอบเรียบ ผิวขรุขระ เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างรี คล้ายแบคทีเรีย เมื่อย้อมแกรมจะติดสีแดง (รูปที่ 1)

เมื่อนำทั้ง 3 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัด ได้ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 1.73 ถึง 2.58 ดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบยืนยันฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทุกชนิดให้โซนใสระหว่าง 7.09 ถึง 13.25 มิลลิเมตร และค่า MBC อยู่ระหว่าง 16.67 ถึงมากกว่า 33.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 จากผลโซนใสและค่า MBC พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อของทั้ง 3 ไอโซเลต มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้ง MRSA ที่เป็นเชื้อดื้อยา ไอโซเลต R214 ยับยั้ง *B. Subtilis* ได้ดีที่สุด และ S232 ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของเอนโดไฟต์ 27 ไอโซเลต แสดงค่าเฉลี่ยโซนใส ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิเมตร)

ลำดับที่	ไอโซเลต	*S. aureus*	MRSA	*E. coli*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*
1	L111	NZ	NZ	5.31±0.42	NZ	NZ
2	L112	NZ	NZ	5.13±0.70	NZ	NZ
3	L113	NZ	NZ	NZ	NZ	7.16±1.25
4	L121	6.33±0.60	6.89±0.38	NZ	NZ	NZ
5	L131	NZ	NZ	5.30±0.70	NZ	NZ
6	L211	NZ	NZ	NZ	11.73 ± 0.75	7.57±3.12
7	L222	7.30±0.44	6.72±0.91	NZ	9.50 ± 0.26	NZ
8	L233	5.48±0.45	6.75±0.17	4.95±0.52	NZ	NZ
9	S113	6.56±1.15	9.78±3.74	NZ	NZ	NZ
10	S122	NZ	NZ	5.53±0.50	NZ	NZ
11	S132	10.25±3.28	10.52±2.78	15.11±1.81	12.50 ± 1.19	NZ
12	S133	8.28±1.55	10.76±4.26	14.96±0.99	15.23 ± 3.93	10.95±1.34
13	S211	17.28±1.25	11.15±3.57	NZ	NZ	NZ
14	S221	14.16±4.04	13.79±3.07	NZ	NZ	NZ
15	S222	11.61±4.42	12.51±2.00	NZ	NZ	NZ
16	S223	9.62±0.82	6.73±0.73	NZ	NZ	NZ
17	S231	13.68±2.03	7.10±0.14	NZ	NZ	NZ
18	S232	13.22±2.31	11.10±5.36	4.68±0.33	NZ	NZ
19	S233	15.72±1.84	12.20±6.08	4.91±0.26	NZ	NZ
20	S235	9.88±5.33	8.92±3.6	NZ	NZ	NZ
21	R111	7.22±0.34	10.17±0.32	4.93±0.40	NZ	NZ
22	R121	8.17±2.71	9.42±0.68	5.96±0.15	NZ	NZ
23	R211	16.73±6.26	12.66±5.70	4.63±0.04	10.97±0.56	7.18±1.73
24	R213	NZ	NZ	7.20±1.05	NZ	10.34±0.544
25	R214	15.63±4.47	12.76±5.73	NZ	NZ	NZ
26	R232	NZ	NZ	NZ	NZ	22.28±1.64
27	R234	NZ	NZ	NZ	8.88±0.78	NZ
คลอแรมเฟนิคอล (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		33.39±3.52	33.49±2.66	34.48±3.78	25.92±1.59	17.83±1.38
PDB		4.57±0.25				

หมายเหตุ : NZ = ไม่เกิดโซนใส; PDB = potato dextrose broth



(ก) S133 **(ข) S232** **(ค) R214**

รูปที่ 1 (ก) S133 (ข) S232 (ค) R214 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟต์

ไอโซเลต	น้ำหนักน้ำเลี้ยงเชื้อ (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต
S133	103.22	1.79	1.73
S232	106.74	2.28	2.14
R214	104.73	2.70	2.58

ตารางที่ 3 โซนใสแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน หน่วยมิลลิเมตร ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟต์ S133, S232 และ R214

เชื้อทดสอบ	สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			คลอแรมเฟนิคอล (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
	S133	S232	R214	
S. aureus	7.09±2.01	13.03±0.72	13.25±1.02	33.39±3.51
MRSA	9.98±0.20	11.70±1.65	10.05±0.99	33.49±2.66
B. subtilis	9.24±0.09	11.14±1.03	11.50±1.11	25.92±1.59
E. coli	10.21±0.40	9.48±0.38	10.49±0.52	34.48±3.78
P. aeruginosa	7.14±0.62	8.51±1.28	8.61±0.43	17.83±1.38

หมายเหตุ : เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมเท่ากับ 4.57±0.25 มิลลิเมตร; ทดสอบ 1 ครั้ง ครั้งละมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ซ้ำ

4. วิจารณ์

การศึกษานี้ สามารถแยกเอนโดไฟต์จากข้าวทั้งหมด 44 ไอโซเลต แต่การอาศัยอยู่และเจริญของเอนโดไฟต์ในโฮสต์มีความซับซ้อนและยังไม่มีความเข้าใจที่ชัดเจน (Brader และคณะ, 2014) ทำให้การเพาะแยกเอนโดไฟต์ด้วยวิธีทั่วไปในปัจจุบันอาจไม่สามารถค้นพบได้หมดทุกชนิดที่มีในพืชตัวอย่าง ซึ่งจากการคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นพบว่าเอนโดไฟต์ที่แยกได้ครั้งนี้ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 61.36) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เป็นที่ทราบกันว่าเอนโดไฟต์มักสร้างสาร

ตารางที่ 4 ค่า MBC แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟต์ S133, S232 และ R214

เชื้อทดสอบ	S133	S232	R214
S. aureus	33.33±0	33.33±0	> 33.33
MRSA	33.33±0	33.33±0	33.33±0
B. subtilis	> 33.33	> 33.33	16.67±0
E. coli	> 33.33	33.33±0	> 33.33
P. aeruginosa	33.33±0	16.67±0	> 33.33

ทุติยภูมิเพื่อช่วยในการเจริญของพืช หรือตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมของพืชที่อาศัยอยู่ เช่น ศัตรูพืช เชื้อก่อโรคพืช ดังนั้นเอนโดไฟต์จึงเป็นแหล่งสร้างสารทุติยภูมิอีกแหล่งหนึ่งที่นักวิจัยสนใจศึกษา (Brader *et al*., 2014) และมีหลายการศึกษารายงานการค้นพบเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านมะเร็ง รวมทั้งฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Venugopalan and Srivastava, 2015) มีการศึกษาราเอนโดไฟต์จำพวก *Penicillium* sp. และ *Strepto-myces* sp. ที่แยกได้จากต้นข้าวสาลี (*Triticum durum*) พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *S. Aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Nouari *et al*., 2013) เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ มีอีกการศึกษาหนึ่งที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงศักยภาพของสารสำคัญที่ได้จากเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าวในการวิจัยและพัฒนายาใหม่ โดยเป็นเอนโดไฟต์ในจีนัส *Streptomyces* สายพันธุ์ BCC 72023 สามารถแยกสารออกฤทธิ์ได้หลายชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรียสายพันธุ์ดื้อยา เชื้อก่อโรควัณโรค *B. cereus* และเชื้ออื่น ๆ และยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งด้วย (Supong *et al*., 2016)

ไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ที่ดีในการคัดกรองเบื้องต้น คือ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบมากกว่า 1 ชนิด รวมทั้ง MRSA และมีขนาดโซนใสที่กว้าง จะถูกคัดเลือกเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณและทดสอบในขั้นตอนต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้แม้จะไอโซเลตเหล่านั้นสามารถถูกแยกได้ในอาหารแข็ง แต่บางไอโซเลตไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเหลว รวมทั้งสภาวะการเก็บเชื้อในอาหารแข็งชนิด PDA ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และต่อเชื้อหรือเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1-2 สัปดาห์ ไม่สามารถคงสภาพความมีชีวิตได้ จึงเหลือเพียงไอโซเลต S133, S232 และ R214 ที่สามารถใช้ในการศึกษาต่อไปได้

ขั้นตอนการคัดแยกเพื่อให้ได้ราเอนโดไฟต์จากชิ้นส่วนต้นข้าว มีการเติมคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งเป็นสารยับยั้งแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยง แต่เมื่อศึกษาลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า S133, S232 และ R214 มีลักษณะคล้ายแบคทีเรีย ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อดื้อต่อยาคลอแรมเฟนิคอล การศึกษาของ Jhala และคณะ (2014) และ Kumar และคณะ (2015) พบว่าเอนโดไฟต์แบคทีเรียบางชนิดที่แยกได้จากพืชดื้อต่อยาคลอแรมเฟนิคอล และการศึกษาของ Celador-Lera และคณะ (2016) สามารถแยกและเพาะเอนโดไฟต์แบคทีเรียได้ในอาหารที่มีคลอแรมเฟนิคอล

ผลผลิตสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกมาทดสอบ ได้ปริมาณไม่สูงนัก แสดงให้เห็นว่ายังต้องการการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร หากต้องการนำไปใช้ในทางการค้าหรืออุตสาหกรรม

ผลการนำสารสกัดหยาบทดสอบยืนยันฤทธิ์พบว่ายังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 ชนิด แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปโดยเฉพาะร่างกายมนุษย์ ก่อโรคฝีหนอง และโรค

อื่น ๆ ได้ MRSA เป็น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลินและยาอื่นในกลุ่มเดียวกัน จึงทำให้ยากต่อการรักษาเมื่อติดเชื้อนี้ และ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมสูงเพราะโครงสร้างที่มีแคปซูลและสามารถสร้างสปอร์ได้ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ซึ่งมักก่อโรคทางเดินอาหารและมักใช้บ่งชี้สุขลักษณะทางสุขาภิบาล และ *P. aeruginosa* ที่พบปนเปื้อนได้ทั่วไปและมักก่อโรคฉวยโอกาสในโรงพยาบาลและผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ (อิสยา และวัชรินทร์, 2551) เมื่อพิจารณาจากค่า MBC พบว่า R214 มีฤทธิ์ฆ่า *B. subtilis* ได้ดี และ S232 มีฤทธิ์ฆ่า *P. aeruginosa* ได้ดี ทั้ง S133, S232 และ R214 สามารถฆ่า MRSA ได้อีกด้วย การมีฤทธิ์ต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบแสดงให้เห็นถึงสมบัติของสารต้านจุลชีพแบบออกฤทธิ์กว้าง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในสารสกัดอาจเป็นได้หลายกลุ่ม ซึ่งหากเป็นสารสกัดเอทานอล สารที่ได้มีแนวโน้มอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล แทนนิน โพลีอะเซทิลีน ฟลาโวนอล เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอล และอัลคาลอยด์ (Tiwari และคณะ, 2011) จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion ก็ให้โซนใสในขนาดต่าง ๆ ค่อนข้างชัดเจน (ตารางที่ 1) แม้จะมีความเข้มข้นน้อยกว่าการทดสอบโดยใช้สารสกัด ดังนั้นจึงคาดว่าสารสำคัญที่เชื้อสร้างขึ้นบางส่วนอาจสูญเสียไประหว่างกระบวนการสกัด และอาจไม่ได้อยู่ในกลุ่มสารที่กล่าวข้างต้น เช่น สารกลุ่มเปปไทด์ หากมีการสกัดแยกส่วนหรือแยกสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ต่อไปอาจค้นพบสารใหม่ที่น่าสนใจและมีฤทธิ์แรงขึ้น คือมีค่า MBC ต่ำลง ทั้งนี้ปัจจัยในการเจริญและการสร้างสารของเอนโดไฟต์มีหลายปัจจัย นอกจากชนิดของสารอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแล้ว ยังมีอีกหลายการศึกษาที่แสดงถึงปัจจัยด้านอื่น ๆ เช่น การเลี้ยงในอาหารที่เป็นของเหลวและของแข็งให้ผลผลิตต่างกัน (Paranagama *et al*., 2007) การเพาะเลี้ยงร่วมกันของเอนโดไฟต์มากกว่า 1 ชนิด ให้ผลผลิตที่ดีกว่าเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยว (Kusari *et al*., 2012) และการเลี้ยงแบบเดี่ยวทำให้ผลผลิตลดลงเรื่อย ๆ ตามจำนวนครั้งของการเปลี่ยนอาหารใหม่ (Kusari และคณะ, 2014) การเพิ่มปริมาณผลผลิตโดยเพาะเลี้ยงเอนโดไฟต์ร่วมกับเซลล์พืชเจ้าบ้าน (Li *et al*., 2009) ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอนโดไฟต์เพื่อให้สร้างสารทุติยภูมิได้อย่างมีประสิทธิภาพยังต้องศึกษาต่อไป

5. สรุป

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเอนโดไฟต์จากต้นข้าวได้จากทั้งราก ลำต้น และใบ พบว่าเอนโด-ไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าวสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้าน *S. Aureus*, MRSA, *B. Subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดย R214 มีแนวโน้มต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี และ S232 มีแนวโน้มต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ดี ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นการพิสูจน์ให้เห็นว่าเอนโดไฟต์เป็นแหล่งทางธรรมชาติสำหรับการผลิตสารต้านจุลชีพที่สำคัญแหล่งหนึ่ง หากมีการศึกษาพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสาร การสกัดแยกสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ และดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสกัดที่ได้นี้ต่อไปในอนาคต จะได้สารที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพและสามารถแก้ปัญหาเชื้อดื้อยาได้ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนทรัพยากร เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และผู้ที่มีส่วนช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จทุกท่าน

7. รายการอ้างอิง

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555, รายงานพิเศษ เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ : วิกฤตและทางออกของสังคมไทย, จุลสาร HSRI Forum 1: 3.

สายทอง แก้วฉาย, 2557, การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบข้าวหอมกระดังงาและคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์, ว.มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 6: 112-120.

อนันต์ วงเจริญ, 2557, การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว, ว.แก่นเกษตร 42: 385-396.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2551, แบคทีเรียทางการแพทย์, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Brader, G., Compant, S., Mitter, B.,Trognitz, F. and Sessitsch, A., 2014, Metabolic potential of endophytic bacteria, Curr. Opin. Biotechnol. 27: 30-37.

Celador-Lera, L., Menendez, E., Flores-Felix, J.D., Mateos, P.F. and Rivas, R., 2016, Analysis of the PGPB Potential of Bacterial Endophytes Associated with Maize, pp. 23-35, In González-Andrés, F. and James, E., Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction, Springer International Publishing, Switzerland.

Clinical and laboratory standards institute, 1999, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline, CLSI Document M26-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Jhala, Y.K., Shelat, H.N., Vyas, R.V. and Panpatte, D.G., 2014, Biodiversity of endorhizospheric plant growth promoting bacteria, J. Biodivers. Bioprospect. Dev. 2: 137.

Jia, M., Chen, L., Xin. H.L., Zheng, C.J., Rahman, K., Han, T. and Qin, L.P., 2016, A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review, Front. Microbiol. 7: 906.

Kumar, V., Kumar, A., Pandey, K.D. and Roy, B.K., 2015, Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L, Ann. Microbiol. 65: 1391-1399.

Kusari, S., Hertweck, C. and Spiteller, M., 2012, Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites, Chem. Biol. 19: 792-798.

Kusari, S., Singh, S. and Jayabaskaran, C., 2014, Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype, Trends Biotechnol. 32: 297-303.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D. and Cars, O., 2013, Antibiotic resistance: The need for global solutions, Lancet Infect. Dis. 13: 1057-1098.

Li, Y.C., Tao, W.Y. and Cheng, L., 2009, Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-

producing endophytic fungi in a co-bioreactor, Appl. Microbiol. Biotechnol. 83: 233-239.

Mano, H. and Morisaki, H., 2008, Endophytic bacteria in the rice plant, Microbes Environ. 23: 109-117.

Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K. and Sánchez, S., 2017, Endophytes as sources of antibiotics, Biochem. Pharmacol. 134: 1-17.

Mousa, W.K. and Raizada, M.N., 2013, The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective, Front. Microbiol. 4: 65.

Naik, B.S., Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y.L., 2009, Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*, Microbiol. Res. 164: 290-296.

Nouari, S., Harzallah, D., Amina, Z., Saliha, D. and Saddek, B., 2013, Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum Durum*), J. Plant Prot. Res. 53: 128-136.

Paranagama, P.A., Wijeratne, E.M.K. and Gunatilaka, A.A.L., 2007, Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: Effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadriseptata* and *Chaetomium chiversii*, J. Nat. Prod. 70: 1939-1945.

Porras-Alfaro, A. and Bayman, P., 2011, Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes, Annu. Rev. Phytopathol. 49: 291-315.

Sun, K., Liu, J., Gao, Y., Jin, L., Gu, Y. and Wang, W., 2014, Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp, Sci. Rep. 4: 5462.

Supong, K., Thawai, C., Choowong, W., Kittiwongwattana, C., Thanaboripat, D., Laosinwattana, C., Koohakan, P., Parinthawong, N. and Pittayakhajonwut, P., 2016. Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.), Res. Microbiol. 167: 290-298.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H., 2011, Phytochemical screening and extraction: A review, Int. Pharm. Sci. 1: 98-106.

Venugopalan, A. and Srivastava, S., 2015, Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites, Biotechnol. Adv. 33: 873-887.