บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติการค้นพบ

แอกติโนมัยซีทีส (actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะและความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียและรา แต่ในปัจจุบันถูกจัดให้อยู่ในโปรคาริโอท (prokaryote) โดยในอดีตที่ผ่านมาแนวทางในการจำแนกเชื้อ การบัญญัติศัพท์เฉพาะเพื่อระบุสกุล และชื่อชนิดของจุลินทรีย์นี้มีความสับสนเป็นอย่างมาก มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแอกติโนมัยซีทีสในปี 1875 โดย Ferdinand Cohn ซึ่งอ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สร้างเส้นใยและมีสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายซึ่งแยกได้จากก้อนนิ่วที่พบในท่อน้ำตา (concretions of human lachrymal ducts) ว่า *Streptothrix foersteri* โดย Cohn เน้นว่าจุลินทรีย์นี้มีความคล้ายคลึงกับ *Leptothrix* ต่อมาในปี ค.ศ.1877 Harz อ้างถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่ เป็นสาเหตุของโรค lumpy jaw ในวัวที่ถูกค้นพบโดย Bollinger ว่า *Actinomyces bovis* เหตุที่ตั้งชื่อดังกล่าวเนื่องจากกลุ่มเส้นใยของเชื้อแผ่ออกเป็นรัศมี ซึ่งชื่อ actinomyces นี้มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ *aktisc* แปลว่า a ray beam และ *mykes* แปลว่า fungus ซึ่งเมื่อรวมทั้งสองคำสามารถอธิบายได้ถึงลักษณะโคโลนีที่เป็นกลุ่มเส้นใยแผ่ออกเป็นรัศมี (ray fungus) แต่การตั้งชื่อสกุลทั้งสองแบบที่กล่าวมาข้างต้นไม่ได้รับการยอมรับ เนื่องจากชื่อ *Streptothrix* ได้มีการนำไปใช้ตั้งชื่อในจุลินทรีย์อื่นก่อนแล้ว และชื่อ *Actinomyces* ก็ไม่เป็นที่นิยมเช่นกัน

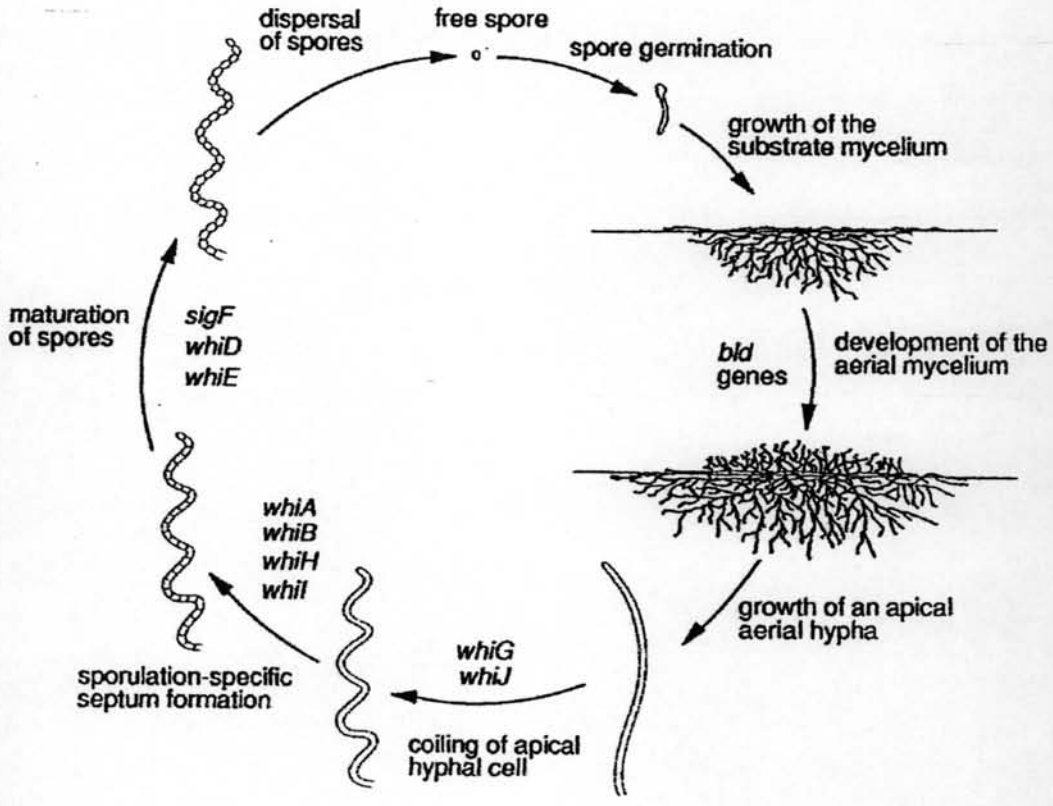
ภายหลังได้มีการตั้งชื่อสกุลของจุลินทรีย์นี้อย่างแพร่หลาย โดยอาศัยจากแหล่งอาหารตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ หรือจากลักษณะทางกายภาพแต่ละแบบของจุลินทรีย์นั้นๆ แต่ก็เป็นชื่อที่ไม่สามารถสื่อความหมายครอบคลุมทางด้านสัณฐาณวิทยา และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ได้ครบถ้วน (Waksman, 1950) ต่อมามีการจัดกลุ่มจุลินทรีย์นี้ออกเป็นหมวดหมู่โดยใช้หลักการจำแนกเดียวกันคือ อาศัยลักษณะทางสัณฐาณวิทยาและสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส ได้แก่ ลักษณะเฉพาะเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ลักษณะของรงควัตถุที่สร้างขึ้น การสร้างกลิ่น การสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ และองค์ประกอบของเซลล์แอกติโนมัยซีทีส เป็นต้น (William และคณะ, 1989) และปัจจุบันได้ใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่มที่สำคัญด้วย (Ueda และคณะ , 1999)

2.2 ลักษณะทั่วไป และแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างเส้นใยคล้ายลักษณะของรา ติดสีแกรมบวก และมีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ใน DNA มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Kieser และคณะ, 2000) แม้ว่าแอกติโนมัยซีทีสจะสามารถสร้างเส้นใยได้คล้ายกับรา แต่มีลักษณะต่างๆที่แตกต่างจากราคือ แอกติโนมัยซีทีสไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไมโตคอนเดรีย (Cross และ Goodfellow, 1973) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทีสยังประกอบด้วยสารจำพวก 2, 6 diaminopimelic acid, mucopeptide (*N*-acetyl glucosamine เชื่อมกับ *N*-acetyl muramic acid), glutamic acid, glycine และ alanine (Waksman และ Henrici, 1974) ต่างจากผนังเซลล์รา ซึ่งประกอบด้วย glucans, mannans และ chitin (Commins, 1958) และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของรา คือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร เส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสประกอบด้วย เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ โดยมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือต่อกันเป็นสายยาวเรียกว่า สายสปอร์ และอาจมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ (sporangium)

แอกติโนมัยซีทีสพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ โคลน มูลสัตว์ และสามารถพบแอกติโนมัยซีทีส อาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช โดยในดินพบแอกติโนมัยซีทีสเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Sykes และ Skinner, 1973) เช่น ตัวอย่างดินประเทศตูนีเซีย สามารถแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ US80 ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และราได้ (Fourati-Ben Fguira และคณะ, 2004) และจากดินแหล่งเดียวกันนี้ยังพบ *Streptomyces caelestis* ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบได้ (Melloui และคณะ, 2003) เคยมีรายงานปริมาณแอกติโนมัยซีทีสในอากาศ ภายในอาคาร ในกรุงริโอเดอร์จานิโร ประเทศบราซิล มีปริมาณเฉลี่ย 11 CFU/ m^3 โดยบริเวณที่มีมากที่สุด พบปริมาณแอกติโนมัยซีทีส 127 CFU/m^3 (Grigorevski-Lima และคณะ, 2006) แอกติโนมัยซีทีสบางชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycete) Lixiang Cao และคณะ (2005) สามารถแยก endophytic streptomycete ได้จากรากกล้วย โดยเชื้อส่วนใหญ่จัดอยู่ใน genus *Streptomyces* แอกติโนมัยซีทีสสามารถแยกจากสัตว์ทะเล โดย Fedrica Sponga และคณะ (1999) ได้สำรวจจุลินทรีย์ในทะเล โดยเก็บตัวอย่างจากฟองน้ำ และโคลนใต้ทะเล พบว่า ประมาณครึ่งหนึ่งของจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแอกติโนมัยซีทีส และอยู่ในสกุล *Streptomyces* โดยที่พบในฟองน้ำ 31% และพบในโคลนใต้ทะเล 50% นอกจากนี้ยังสามารถพบแอกติโนมัยซีทีสจากไลเคนส์ทั้งในเขตอบอุ่น และเขตหนาว (Ignacio และคณะ, 2005)

2.3 วงชีวิตของแอกติโนมัยซีทีส



รูปที่ 2.1 แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีทีส *Streptomyces coelicolor* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

วงชีวิตของแอกติโนมัยซีทีสเริ่มจากสปอร์งอกกลายเป็นเส้นใย เส้นใยเริ่มแรกเป็นเส้นใยอาหาร โดยแทรกตัวเข้าไปในพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นมีการสร้างเส้นใยอากาศ และพัฒนาเส้นใยอากาศเพื่อสร้างสปอร์ต่อไป Chater (1993) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) ซึ่งเป็นแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จัก และมีข้อมูลการศึกษาการทำงานในระดับพันธุศาสตร์มากในระดับหนึ่ง ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะต่างๆ การศึกษาพบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม germ tube งอกออกมาจากสปอร์ เจริญโดยการยืดยาวและแตกแขนงบริเวณปลายเส้นใย ได้เส้นใยอาหารจำนวนมาก หลังจากนั้น 2-3 วัน เส้นใยจะเจริญแทงขึ้นมาจากในอาหารออกสู่อากาศกลายเป็นเส้นใยอากาศ ซึ่งถูกควบคุมโดย ยีน *bld* จากนั้นเจริญโดยการยืดยาวบริเวณปลายเส้นใย เมื่อเส้นใยอากาศเจริญเต็มที่ ยีน *whiG* และ *whiJ* ควบคุมให้ปลายเส้นใยม้วนเป็นเกลียว หลังจากนั้น ยีน

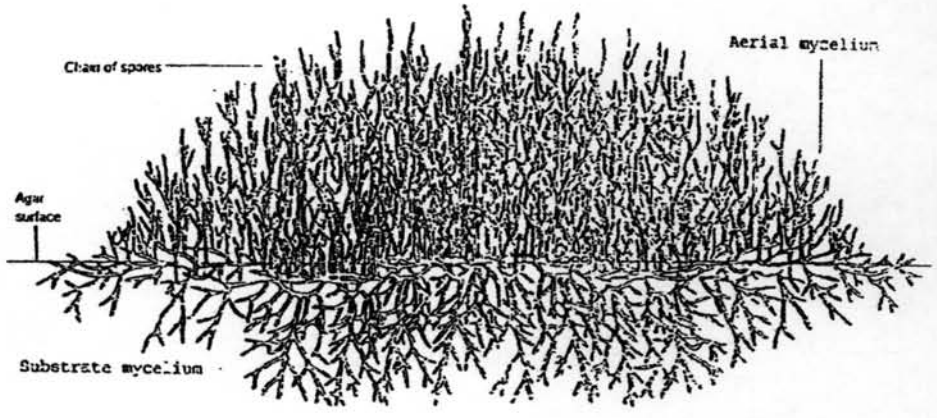
whiA whiB whiH และ *whiI* ควบคุมให้มีการแบ่งเซลล์ที่ปลายเส้นใยโดยการสร้างผนังกั้นแบ่งเส้นใยออกเป็นส่วน ๆ ยีน *whiD* และ *sigF* ควบคุมให้ผนังเซลล์หนาขึ้นกลายเป็นผนังสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนต่อความแห้งแล้ง และ ยีน *whiE* ควบคุมให้สปอ์มีสีเข้มขึ้น เมื่อสปอร์ที่แก่เต็มที่หลุดออกจากสายสปอร์ และไปตกในบริเวณที่เหมาะสม สปอร์ก็จะงอกเป็นเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส เป็นการเริ่มต้นวงชีวิตต่อไป

การเจริญเติบโตในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) และยีนบางส่วนที่เกี่ยวข้อง แสดงดังรูปที่ 2.1

2.4 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส

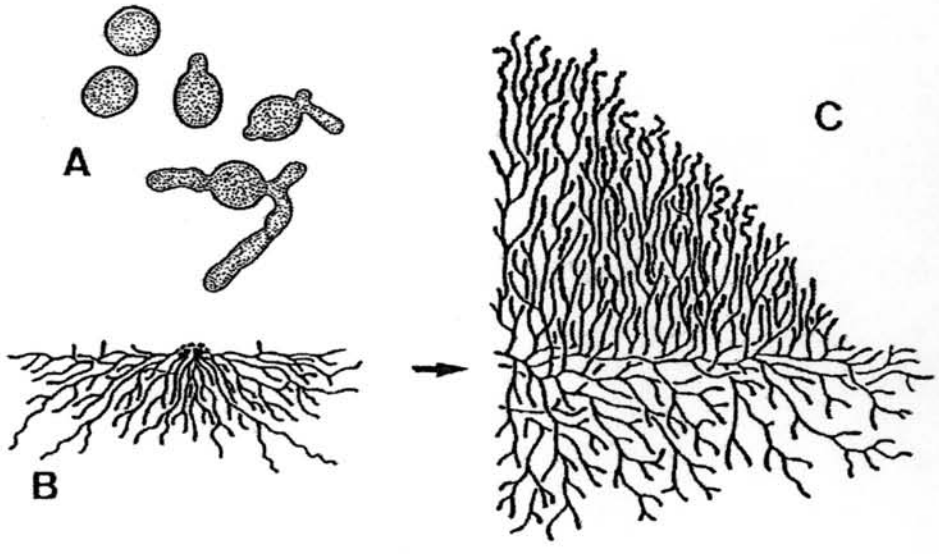
2.4.1 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส

การเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะเกิดจากการสร้างเส้นใยจำนวนมาก จนเกิดการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งความหมายของโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสจะต่างจากโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส (Brock และคณะ, 1984)

การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 2.3 เริ่มจากหัวเชื้ออาจมาจากสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่แตกหัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม รูป 2.3 (A) เมื่อหัวเชื้อตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร รูป 2.3 (B) เมื่อเส้นใยอาหารเจริญเต็มที่แล้วจะแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง รูป 2.3 (C) จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น สร้างสปอร์โดยการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการสร้างผนังกั้นภายในเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกั้นชั้นเดียวเพื่อความคงตัวและสร้างเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutskii และ Agre, 1976) โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสมีหลายลักษณะแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่น นูน (raised), เรียบแบน (flat) บางครั้งมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง (leather) มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่มเหนียวจนถึงแข็ง สีของโคโลนีมีสี ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้า เขียว น้ำตาลและดำ ผิวของโคโลนีมีลักษณะเรียบ (smooth) สันนูน (ridged) ขรุขระ (rough) เป็นรอยย่น (wrinkled) เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับ สปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Miyadoh และคณะ, 1997)



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2.4.2 โครงสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส

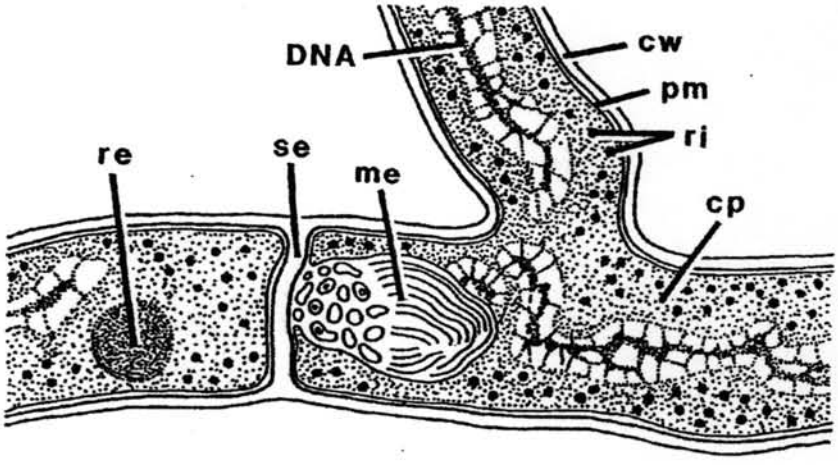
โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสจะมีการสร้างเส้นใย 2 แบบ คือ เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยเส้นใยทั้ง 2 แบบ จะแสดงลักษณะและหน้าที่ทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน

<u>เส้นใยอาหาร</u> คือ เส้นใยที่สร้างในช่วงระยะ vegetative cell การเจริญของเส้นใยชนิดนี้จะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน โดยจะเจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วงแรกสีของเส้นใยจะเป็นสีขาวหรือครีม แต่เมื่อเจริญเต็มที่จะกลายเป็นสีเหลือง แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือ น้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะมีการสร้าง germ tube หนึ่ง tube หรือหลาย tube ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นเส้นใยยาวและพัฒนาเป็นเส้นใยที่มีความซับซ้อนยิ่งขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยพบได้ตั้งแต่ 0.2-0.8 ไมโครเมตร บางชนิดมีลักษณะตรงและยาวถึง 600 ไมโครเมตรหรือมากกว่านั้น บางชนิดพบเส้นใยมีลักษณะโค้งและมีการแตกแขนง มีความยาวประมาณ 50-100 ไมโครเมตร (Kalakoutskii และ Agre, 1976) โครงสร้างของเส้นใยจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เชื้อเจริญโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิและสารเคมีที่มีผลต่อการเจริญ เมื่อเชื้อมีอายุมากเส้นใยชนิดนี้จะมีการแตกหักเป็นชิ้นส่วนสั้น ๆ บางชนิดอาจมีการแตกหักอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงหรือเจริญอยู่ในภาวะที่เป็นของเหลว (Sykes และ Skinner, 1973)

<u>เส้นใยอากาศ</u> คือ เส้นใยที่สร้างขึ้นด้านบนของเส้นใยอาหาร ลักษณะของเส้นใยอากาศจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีส ส่วนประกอบของอาหาร และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอากาศส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-1.4 ไมโครเมตร โดยปกติเส้นใยชนิดนี้จะมีลักษณะสั้น ตรง หรือโค้ง และมีการแตกแขนงจำนวนมาก เส้นใยอากาศจะเจริญปกคลุมทั้งโคโลนี เมื่อสังเกตดูจะมีลักษณะคล้ายปมด้าย หรือ ฝุ่นซอล์กอยู่บนเส้นใยอาหาร (Kalakoutskii และ Agre, 1976) การเจริญของเส้นใยอากาศจะเริ่มเจริญมาจากเส้นใยอาหาร โดยเกิดการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยกลายเป็นเซลล์เริ่มต้น (initial cell) ซึ่งส่วนใหญ่เริ่มเจริญจากจุดกึ่งกลางของโคโลนี แล้วแผ่ออกไปทุกทิศทางโดยอาศัยกระบวนการแตกหน่อ (sprout) หรือแตกแขนง (branching) และเกิดการแบ่งตัว (subdivision) เพื่อเจริญต่อไปเป็นเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มสร้างเส้นใยอากาศที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนเมื่อมองจากด้านบนของโคโลนี โดยลักษณะดังกล่าวเกิดจากความแตกต่างของเส้นใยที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปรากฏการณ์นี้คือ การแพร่ของสารเคมีบางชนิด ความเข้มแสง อุณหภูมิและความชื้น (Waksman, 1950)

โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทีสจะมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ เช่น ในสกุล *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ แต่บางชนิดสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร เช่น ในสกุล *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่จะสร้างสปอร์และ อับสปอร์ (sporerangium) โดยตรงจากเส้นใยอาหาร โดยปกติจะไม่พบผนังกั้นเซลล์ภายในเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส แต่อาจพบได้ในช่วงของกระบวนการแตกหักเป็นชิ้นเล็กๆ ของเส้นใย

โครงสร้างภายในเส้นใยประกอบด้วย ผนังเซลล์ซึ่งหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร ภายในมีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ห่อหุ้มไซโตพลาสซึม ซึ่งภายในมีสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่าง ๆ ที่สะสมในเซลล์ ได้แก่ พอลิฟอสเฟต ไขมัน และ พอลิแซกคาร์ไรด์ เยื่อหุ้มเซลล์บางแห่งจะพัฒนาไปเป็น mesosomes ตรงบริเวณติดกับผนังเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบภายในเส้นใยอาหารของแอกติโนมัยซีทีส: (cp) ไซโตพลาสซึม , (pm) เยื่อหุ้มเซลล์, (cw) ผนังเซลล์, (me) มีโซโซม, (se) ผนังกั้นเซลล์, (ri) ไรโบโซม, (DNA) สายดีเอ็นเอ และ (re) แอ่งสะสมสารภายในเซลล์ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

<u>สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีส</u> สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสมีหน้าที่ในการสืบพันธุ์ เกิดจากการแบ่งออกเป็นส่วนของเส้นใย (Fragmentation) การสร้างและรูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลุ่มและชนิดได้ สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสมีหลายรูปร่างหลายลักษณะ เช่น กลม (globose) รูปไข่ (ovoid) รูปแท่ง (rod-shaped) และมีผิวสปอร์หลายรูปแบบ เช่น เรียบ (smooth) ขรุขระ (irregular rugose) สันนูนเป็นร่องขนาน (parallel rugose) ปุ่ม (warty) ตุ่มยาว (tuberculate) หนาม (spiny) และ เป็นขน (hairy)

การสร้างสปอร์แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอก คือ สปอร์เดียว (single spore) สายสปอร์ (spores formed in chains) และสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ (spore formed within sporangia)

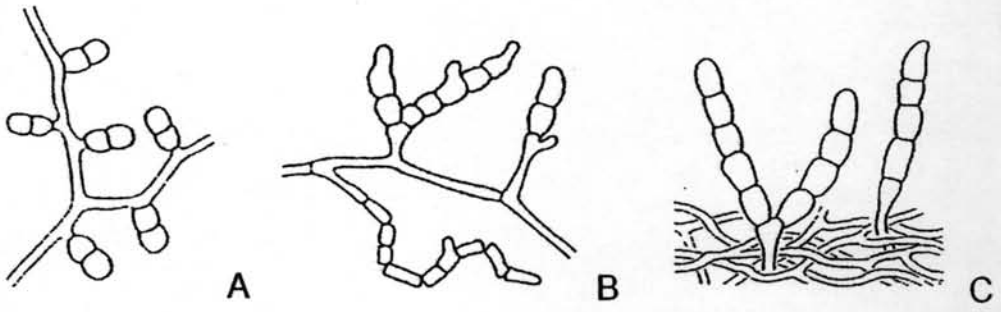
1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) พบในหลายสกุล การสร้างสปอร์เริ่มจากส่วนปลายสุดของเส้นใยมีการพองตัวออก จากนั้นมีการสร้างผนังกั้นระหว่างก้านชูสปอร์และส่วนที่พองออกเป็นสปอร์ และสร้างผนังสปอร์หนาขึ้น (Kawamoto, 1989) เช่น ในสกุล *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophores) เกิดขึ้นบนเส้นใยอาหาร มีการสร้างสปอร์ติดอยู่กับก้านชูสปอร์สั้น ๆ และแยกออกมาเดี่ยว ๆ ปลายสุดของก้านชูสปอร์อาจมีการแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง เช่น ในสกุล *Thermomonospora* มีการแตกแขนงของปลายก้านชูสปอร์ ส่วนในสกุล *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ มีก้านชูสปอร์สั้นและไม่แตกแขนง อาจเรียกสปอร์เดี่ยวของทั้ง 3 สกุลข้างต้นว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยมีการโป่งออก (Cross, 1970 อ้างถึงโดย McCarthy, 1989) ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* แสดงดังรูปที่ 2.5

รูปที่ 2.5 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทีสใน (A) *Micromonospora*, (B) *Themomonospora*, และ (C) *Saccharomonospora* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2. กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสาย ในแอกติโนมัยซีทีสมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก การสร้างสปอร์เป็นสายเกิดจากการที่เส้นใยมีการแบ่งตัวเป็น segments ตามขวาง แต่ละ segments สามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้โดยพิจารณาถึงความยาวของสายสปอร์หรือจำนวนสปอร์ คือ สปอร์คู่ (bisporous) สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

สปอร์คู่ ประกอบด้วย คู่ของสปอร์เรียงต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก มีลักษณะเป็นสปอร์คู่ทรงรีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรง หรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้น ๆ ลักษณะสปอร์ของ *Microbispora* แสดงดังรูป 2.5 (A) การสร้างสปอร์ของ *Microbispora* เริ่มจากเส้นใยอากาศแตกหน่อออกทางด้านข้างเป็นกิ่งสั้น ๆ จากนั้นส่วนที่เป็นกิ่งมีการพองออกและสร้างผนังกั้นตรงกลาง แอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสปอร์แบบ bisporous ไม่ได้พบเฉพาะในสกุล *Microbispora* เท่านั้นซึ่งลักษณะสปอร์ 2 สปอร์ ที่เรียงต่อกันตามแนวยาวยังพบใน *Actinomadura echinospora*, *Actinomadura rugatobispora* (Kroppenstedt และคณะ, 1990 อ้างอิงโดย Miyadoh และคณะ, 1990) และจีนัส *Actinobispora* (Jiang และคณะ, 1991)

สปอร์สายสั้น ส่วนมากพบ 7-20 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* สร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ โดยมีจำนวนสปอร์ 2-7 สปอร์อยู่บนก้านชูสปอร์ สายสปอร์อาจมีการแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยอาหารแสดงดังรูป 2.6 (B) *Saccharopolyspora rectivirgula* สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายมีจำนวนสปอร์น้อยกว่า 5 สปอร์บนก้านชูสปอร์ที่อยู่บริเวณด้านข้างและปลายของเส้นใย (Korn-Wendisch และคณะ, 1989) ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสายสปอร์สั้น ๆ บนเส้นใยอากาศ จำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ จนถึง 20 สปอร์ สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง (straight) เป็นขอ (hooked) เป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อนกัน 1-4 ชั้น เช่น *Actinomadura pusilla* สร้างสายสปอร์เป็นเกลียวพันซ้อนกันแน่น *Streptoverticillum* มีลักษณะเฉพาะคือ สร้างก้านชูสปอร์เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์สั้นอาจมีลักษณะบิดเป็นเกลียวซ้อนติดกัน หรือโค้งงอ และเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะมีการบิดตัว (Locci และ Schofield, 1989) แสดงดังรูปที่ 2.7 (D) สกุล *Macrospora*, *Microcelobosporia* และ *Elytrosporangium* สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ในสายสปอร์สั้น ๆ อยู่บนเส้นใยอาหาร *Sporichthya polymorpha* สร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่งจนถึงรูปกลม *Catellatospora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ มีจำนวนสปอร์ 5-30 สปอร์ อยู่บนปลายก้านชูสปอร์ที่แทงขึ้นมาจากอาหาร ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นและอาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง (Asano และ Kawamoto, 1986) ดังแสดงในรูป 2.6 (C)

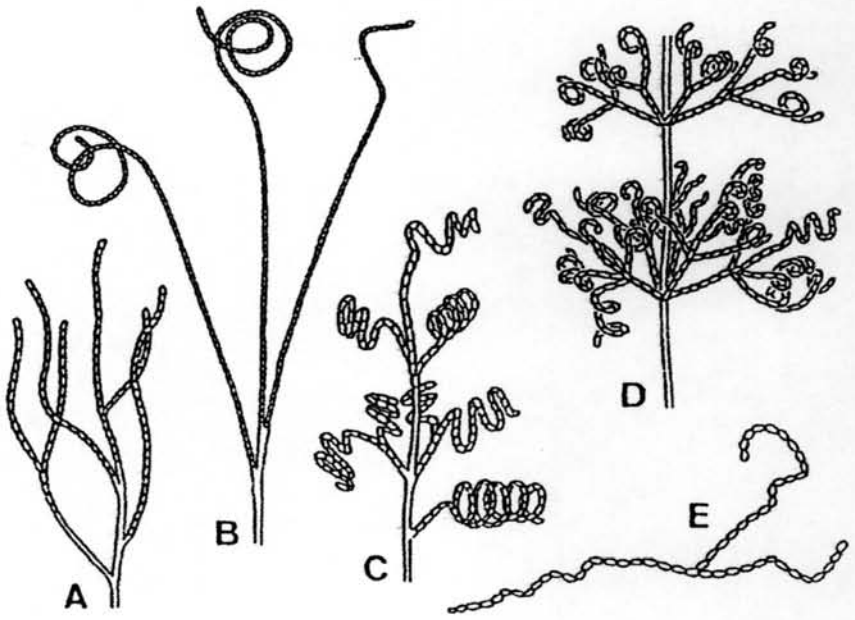


รูปที่ 2.6 แสดงแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น A. การสร้างสปอร์แบบ disporous ของ *Microbispora*, B. และ C. การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

สปอร์สายยาว แอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสปอร์สายยาวที่สำคัญ คือ สกุล *Streptomyces* มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนมัยซีทีสชนิดอื่นที่มีสปอร์สายยาว มักเรียกว่า arthospores คือมีการสร้างสปอร์เป็นสายโดยเกิดการแตกหักของเส้นใยที่เกิดจากการแบ่งเป็นส่วน ๆ ของเส้นใยเดิม บริเวณที่เกิดการแตกหักเกิดจากการกระตุ้นโดยยีนแบบสุ่ม ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ (Ettlinger และคณะ,1958 อ้างถึงโดย Pridham และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย kom-Wendisch และ kutzner, 1992) การสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศของ *Streptomyces* แสดงดังรูปที่ 2.7 (A B C และ D) ซึ่งมีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

- Rectiflexbilles ลักษณะของสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ
- Retinaculiaperti ปลายสายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
- Spira สายสปอร์ม้วนเป็นเกลียว แยกออกได้เป็น 2 แบบ คือ เป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่น และเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาวยืดไม่ติดกันแน่น
- Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายก้นหอย และแตกแขนงออกเป็นช่อ

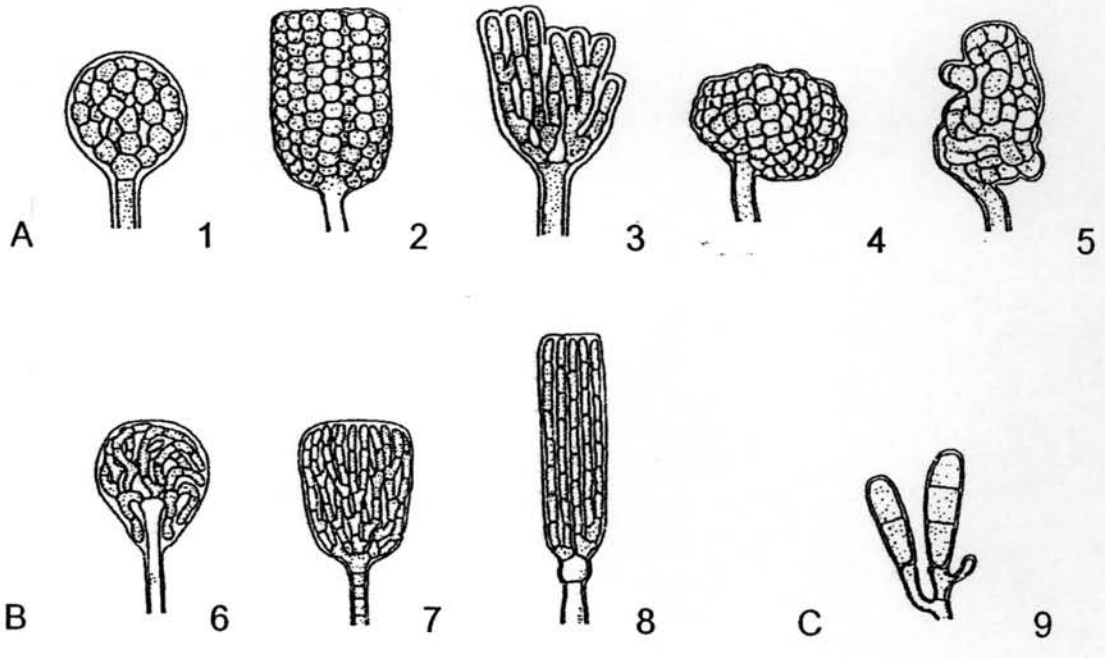
ในบางกรณีสายสปอร์ขดเป็นเกลียวแน่นและมีสปอร์จำนวนมาก ทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ pycnidia เช่นในสกุล *Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ส่วนในสกุล *Pseudonocardia* สร้างสายสปอร์บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะซิกแซก (zigzag shaped) สกุล *Nocardiopsis* สามารถสร้างสายสปอร์บนเส้นใยอากาศได้จำนวนมาก สปอร์อาจเป็นสายตรง งอ หรือซิกแซก (Meyer, 1989 อ้างถึงโดย Miyadoh และคณะ, 1997) แสดงดังรูปที่ 2.7 (E)



รูปที่ 2.7 แสดงการสร้างสปอร์สายยาวของแอกติโนมัยซีทีสใน สกุล *Streptomyces* : (A) Rectiflexibiles, (B) Retinaculiaperti, (C) Spira, (D) Verticillati ในเส้นใยอากาศของสกุล *Streptoverticillum* และ *Streptomyces* และ (E) fragmenting branched ในเส้นใยอากาศของสกุล *Nocardiopsis* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

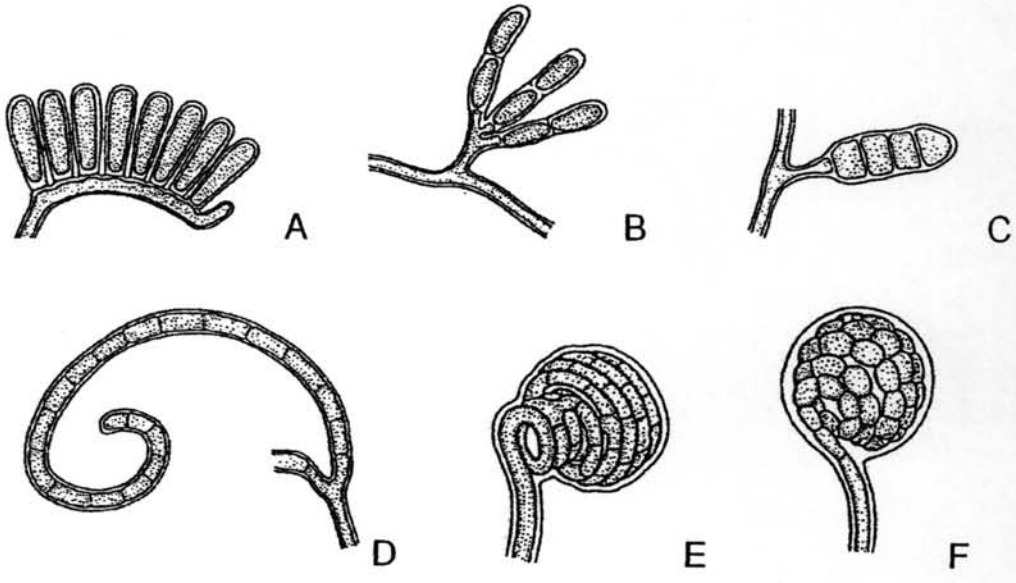
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างอับสปอร์ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลม หรือเกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตร อับสปอร์สร้างขึ้นบนเส้นใยอาหารโดยตรง โดยมีก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) ยื่นขึ้นมาจากเส้นใยอาหาร และที่ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์มีการแตกแขนงออกเป็นสายสปอร์หลายสายขดม้วนเป็นก้อนภายในผนังห่อหุ้ม หรือบางสปีชีส์ในสกุล *Actinoplans* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ทรงขวด ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 15 ไมโครเมตร ภายในอับสปอร์มีสปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย (Couch, 1963 อ้างถึงโดย Vobis, 1987) ลักษณะของอับสปอร์ในสกุล *Actinoplans* แสดงดังรูปที่ 2.8 (A) สกุล *Pilimelia* สร้างอับสปอร์บนผิวของอาหาร อับสปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หรือทรงกลม ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งเรียงตัวปันแถวขนานกัน หรือวกวนไม่เป็นระเบียบ ลักษณะของอับสปอร์ในสกุล *Pilimelia* แสดงดังรูปที่ 2.8 (B) สกุล *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ oligosporous คือ มีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ แสดงดังรูปที่ 2.8 (C) (Vobis และ Kothe, 1985)



รูปที่ 2.8 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอาหาร (A) *Actinoplanes* : 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู 4. กึ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง ; (B) *Pilimelia* : 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก ; (C) *Dactylosporangium* : 9. รูปทรงกระบอง [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศแสดงดังรูปที่ 2.9 ประกอบด้วย สกุล *Planomonospora* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในมีเพียงหนึ่งสปอร์ สกุล *Planobispora* สร้างสปอร์คู่เรียงต่อกันตามยาวอยู่ภายในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* สร้างอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ เรียงต่อกันเป็นหนึ่งแถว (Runmao และคณะ, 1993) สกุล *Planopolyspora* เมื่อเจริญเต็มที่อับสปอร์จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมหาศาลเรียงต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายในอับสปอร์ (Petrolini และคณะ, 1993) สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกั้นเส้นใยพัฒนาเป็นสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาวขดม้วนอยู่ภายในอับสปอร์ สกุล *Spirillospora* สร้างอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-24 ไมโครเมตร สปอร์เรียงตัวกันเป็นสายและขดเป็นวง ภายในวงของสายสปอร์มีการแตกแขนงของสายสปอร์ สปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง และโค้งงอ (Williams และ Sharples, 1976 อ้างถึงโดย Petrolini และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.9 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอากาศ A) *Planomonospora* : สร้าง monosporous รูปกระบอง, B) *Planobispora* : สร้าง disporous รูปทรงกระบอก, C) *Planotetraspora* : สร้าง tetrasporous รูปทรงกระบอก, D) *Planopolyspora* : สร้าง polysporous รูปทรงคล้ายท่อ, E) *Spirillospora* : สร้าง polysporous รูปทรงกลม และ F) *Streptosporangium* : สร้าง polysporous รูปทรงกลม [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2.5 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส

โดยทั่วไปข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่างและสีของเส้นใยอากาศ, เส้นใยอาหาร, พื้นผิวของสปอร์, รูปแบบของสายสปอร์และอับสปอร์, หรือการสร้างรงควัตถุ (diffusible pigment) และการสร้างรงควัตถุเมลานิน นอกจากนี้ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ องค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย dibasic amino acid สามารถแบ่งผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทีสออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่I- IV โดยแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 3 ของสายเตตระเปปไทด์ (tetrapeptide) และไกลซีนในอินเตอร์เปปไทด์บริด (interpeptide bridges) และยังรวมถึงการวิเคราะห์รูปแบบน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ คือ อะราบิโนส (arabinose) ฟรุคโตส (fuctose) กาแลคโทส (galactose) เมดูโรส (madurose) และ ไซโลส (xylose) โดยอ้างอิงวิธีการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams และคณะ,1989) แต่ในระยะหลังวิธีทางอณูพันธุศาสตร์โดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียถึงระดับสกุลเข้ามามีบทบาทมากขึ้น ทำให้การจัดจำแนกแบคทีเรียเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพกว่าวิธีดั้งเดิม Rintala และคณะ (2001) ได้พัฒนา primer 3 ตัว ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ บริเวณตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงกับยีนประมวลรหัส 16S rRNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบ *Streptomyces* ต่อมา Lanoot และคณะ (2005) สามารถตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอภายในกลุ่ม streptomycetes และจัดเป็นกลุ่มต่างๆ 59 กลุ่ม จากเชื้อทั้งหมด 463 ตัว โดยใช้เทคนิค RFLP ซึ่งจำแนกความแตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง 16S-ITS (16S-ITS RFLP finger printing) ทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างของ streptomycetes ชนิดต่างๆได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ร่วมด้วย ทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดกันในทางพันธุกรรมมากขึ้น และเป็นเหตุผลนำมาซึ่งการแก้ไขการจัดกลุ่มโดยย้ายบางสกุล (Genus) ในวงศ์ (Order) เดิมไปอยู่ในวงศ์ใหม่แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะแตกต่างกันก็ตาม

จากเกณฑ์ข้างต้น เมื่อรวบรวมข้อมูลที่บ่งบอกถึงลักษณะเฉพาะต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มสามารถจำแนกแอกติโนมัยซีทีสออกได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

1. **นอคาร์ดิโอฟอร์มแอกติโนมัยซีทีส** (Nocardioform actinomycetes)

แอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลาย ส่วนใหญ่จะสร้างเส้นใยที่เป็นสายท่อนสั้นๆ บางกลุ่มมีการสร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เป็นสาย การจัดจำแนกสกุล ของนอคาร์ดิโอฟอร์มแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้ จำแนกตามองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ การมีกรดไมโคลิก (mycolic acid) และลักษณะอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่

1.1 แบคทีเรียที่มีกรดไมโคลิก (Mycolic acid-containing bacteria)

1.2 สกุลซูโดร์นอคาร์เดีย (*Pseudonocardia*) และสกุลใกล้เคียง

1.3 สกุลนอคาร์ดิโอดิส (*Nocardiodes*) และเทอราแบคเตอร์ (Terrabacter)

1.4 สกุลโปรไมโครโมโนสปอรา (*Promicromonospora*) และสกุลใกล้เคียง

2. **สกุลที่มีมัลติโลคูลาร์สปอร์แรงเกีย** (Genera with multilocular sporangia)

เป็นกลุ่มที่มีการสร้างเส้นใยซึ่งแบ่งโดยมีผนังกั้นตามยาว (Longitudinal septa) และตามขวาง (Transverse septa) สร้างสปอร์เม็ดกลม สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่กลุ่มเดอร์มาโตฟิลลัส (*Dermatophilus*) และ จีโอเดอร์มาโตฟิลลัส (*Geodermatophilus*) ส่วนกลุ่มแฟรงเกลีย (*Frankia*) สปอร์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

3. **แอกติโนแพลนิทิส** (Actinoplanetes)

เป็นกลุ่มที่มีเส้นใยอากาศน้อย หรืออาจไม่มีเลย มี *meso*-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบอาราบิโนส และไซโลสภายในเซลล์ แบ่งออกเป็นกลุ่มที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ภายในอับสปอร์ ได้แก่ แอกติโนแพลนิส (*Actinoplanes*) แอมพูลาเลลา (*Ampullariella*) แดกทิลโลสปอร์แรงเจียม (*Dactylosporangium*) และฟิลิมิเลีย (*Pilimelia*) กลุ่มที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ ไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยว และแคเทลลาโทสปอรา (*Catellatospora*) สร้างสปอร์เป็นสาย

4. **สเตรปโตมัยซิส** (Streptomycetes) **และสกุลใกล้เคียง** (related genera)

แอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลาย โดยทั้งหมดมี L-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แบ่งออกเป็น กลุ่มที่สร้างเส้นใยอากาศ และสายสปอร์ยาว ได้แก่ สเตรปโตมัยซิส (*Streptomyces*) และ สเตรปโตเวอร์ติซิลลัม (*Streptoverticillum*) สำหรับ

กลุ่มอื่นๆ ซึ่งสร้างเส้นใยอากาศน้อย หรือไม่สร้าง จะมีรูปแบบการสร้างสปอร์ที่หลากหลาย ได้แก่ อินทราสปอแรงเจียม (*Intrasporangium*) ไคนิโอสปอเรีย (*Kineosporia*) และสปอริสยา (*Sporichthya*)

5. **กลุ่มแมดูโลมัยซิส** (Maduromycetes)

กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP มีน้ำตาล madurose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ สมาชิกในวงค์นี้มีความหลากหลาย ใช้จำนวนสปอร์ การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ และการสร้างสายสปอร์บนก้านชูสปอร์เป็นเกณฑ์ในการแบ่งสกุล สมาชิกในวงค์นี้ส่วนใหญ่สร้างสายสปอร์หรืออับสปอร์บนเส้นใยอากาศ สกุลที่สร้างสปอร์สายสั้น ๆ และสปอร์ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *Microbispora* (2 สปอร์) และ *Microtetraspora* (4 สปอร์) สกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์และสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora* (สองสปอร์เรียงต่อกันตามยาวในอับสปอร์รูปกระบอง) และ *Planomonospora* (หนึ่งสปอร์อยู่ในอับสปอร์รูปทรงกระบอก) สกุล *Streptosporangium* สร้างสปอร์เป็นสายจำนวนมากเรียงต่อกันขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ทรงกลม สปอร์ไม่เคลื่อนที่

6. **เทอร์โมโมโนสปอรา** (Thermomonospora) **และสกุลใกล้เคียง** (related genera)

กลุ่มนี้สามารถสร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์ ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP แต่ไม่มีกรดอะมิโน หรือ น้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบในเซลล์ที่ถูกย่อย แบ่งออกเป็น กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว ได้แก่ เทอร์โมโมโนสปอรา (*Thermomonospora*) กลุ่มที่สร้างสายสปอร์ ได้แก่ แอกติโนซินนีมา (*Actinosynnema*) และ สเตรปโตออโลทิคัส (*Streptoalloteichus*)

7. **เทอร์โมแอกติโนมัยซีทีส** (Thermoactinomycetes)

กลุ่มนี้มีเพียงสกุลเดียว คือ เทอร์โมแอกติโนมัยซีทีส (*Thermoactinomyces*) สามารถสร้างเส้นใยอากาศได้ สร้างสปอร์เดี่ยวแบบเอนโดสปอร์ (endospores) ทั้งภายในเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ทุกชนิดเจริญในอุณหภูมิสูง ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*- DAP แต่ไม่พบกรดอะมิโนหรือน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบในเซลล์

8. **กลุ่มอื่น ๆ**

เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มอื่นๆได้ โดยทุกชนิด สามารถสร้างเส้นใยอากาศและสร้างสปอร์เป็นสายแบ่งออกเป็นสกุล *Kitasatosporia Glycomyces Kibdelosporangium* และ *Saccharothix*

2.6 ความต้องการสารอาหารของแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกันอย่างมาก บางกลุ่มสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน แต่บางกลุ่มเจริญได้เฉพาะอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มยังสามารถปรับตัวให้ใช้สารอาหารได้หลากหลายอีกด้วย ปริมาณการสร้างเซลล์และผลิตสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสจะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารอาหารที่เชื้อได้รับ ดังเคยมีรายงานไว้โดย Gesheva และคณะ (2004) ซึ่งได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม nonpolyenic macrolide ใน *Streptomyces hygroscopicus* 111-81 พบว่า การใช้แลกโทส หรือ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เติมแอมโมเนียมซัคซิเนต เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งเดิมคือกากถั่วเหลือง เติมแร่ธาตุที่จำเป็น คือแมงกานีส คอปเปอร์ และซัลเฟอร์ในปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า จากอาหารสูตรเดิม

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

แอกติโนมัยซีทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ทั้งสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและไม่ซับซ้อน โดยสารอินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส โปรตีน โพลีเปปไทด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มสามารถใช้สารประเภทอื่นได้ เช่น ไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารประกอบที่มีวงเบนซีน หรือสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกนิน แทนนิน และยาง เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยแอกติโนมัยซีทีสจะเลือกแหล่งอาหารที่ใช้ได้ง่ายมาใช้ในการเจริญก่อน โดยแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส เดกซ์ตริน แป้ง กลีเซอรอล กรดอินทรีย์ และโปรตีน รองลงมาได้แก่ ซูโครส และน้ำตาลประเภทอื่น ๆ นอกจากนี้ อการ์ ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในแอกติโนมัยซีทีสบางชนิด เช่น *Streptomyces coelicolor* (Cohn, 1943)

โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทีสมักใช้โปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน มากกว่าคาร์โบไฮเดรต ซึ่งทดสอบได้ด้วยการเติมโปรตีน หรืออนุพันธุ์ของโปรตีน เช่น เปปโตน และเติมกลูโคส หรือคาร์โบไฮเดรตประเภทอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่าแอกติโนมัยซีทีสจะใช้โปรตีนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนก่อน โดยจะขับของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนียจำนวนมาก (Waksman และ Lomaniz, 1925)

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังมีบทบาทเป็นสารบัฟเฟอร์อีกด้วย เนื่องจากถ้ามีเฉพาะโปรตีนหรืออนุพันธ์ของ

โปรตีนทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จะทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียอย่างรวดเร็วจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีภาวะเป็นด่างสูงเกินกว่าที่เชื้อจะเจริญได้ จากปัจจัยดังกล่าวทำให้กลูโคสเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส แม้ว่าในอาหารจะมีโปรตีนหรือเปปโตนอยู่แล้ว ก็ตาม เพราะการย่อยสลายกลูโคสจะก่อให้เกิดกรด ซึ่งสามารถใช้ในการปรับสมดุลกับแอมโมเนียที่ถูกสร้างขึ้นจากการย่อยสลายโปรตีนได้ (Waksman, 1950) กรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น กรดฟอร์มิค (formic acid) กรดออกซาลิค (oxalic acid) กรดทาร์ทาริค (tartaric acid) เป็นสารประกอบคาร์บอนที่ไม่ค่อยดีนักต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส ในขณะที่กลีเซอรอล แมนนิทอล และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีมากของการเจริญของเชื้อ (Lechevalier, 1967) จากการที่แอกติโนมัยซีทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายประเภท จึงสามารถใช้คุณสมบัติดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการจำแนกแอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มได้ โดยเฉพาะใน *Streptomyces* เกือบทุกชนิดสามารถใช้กลูโคส แมนโนส แป้ง เดกซ์ตริน และกลีเซอรอลได้ (Pridham และ Gottlieb ,1948)

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

แอกติโนมัยซีทีสส่วนใหญ่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้ ดังนั้น โปรตีน เปปโตน หรือกรดอะมิโน จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ รองลงมาคือ ไนเตรท และเกลือของแอมโมเนียม ตามลำดับ โดยไนเตรทถูกจัดให้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าเกลือของแอมโมเนียม เนื่องจากไนเตรททำให้เกิดประจุลบ แต่เกลือของแอมโมเนียมจะให้ประจุบวก ซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส นอกจากนี้ยังพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกใช้ได้ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ (Waksman และ Lomanitz, 1925) แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มสามารถย่อยสลายโปรตีนได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น บางกลุ่มสามารถย่อยสลายเจลาติน บางกลุ่มสามารถสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติค (proteolytic) ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนในนมได้ (Sykes และ Skinner, 1973)

2.6.3 แร่ธาตุ

แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มสามารถใช้แร่ธาตุ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปแทสเซียม และแมกนีเซียมได้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในขณะที่ความต้องการซัลเฟอร์ แคลเซียม และเหล็กนั้นยังไม่ได้รับการยืนยันที่แน่นอน แต่พบว่าแอกติโนมัยซีทีสบางชนิดสามารถเจริญได้ดีเมื่อเติมธาตุเหล็กลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีรายงานว่าสังกะสีมีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มด้วย แร่ธาตุเหล่านี้แม้จะต้องการในปริมาณน้อย แต่ก็เป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้สำหรับการเจริญของเชื้อ (Pridham และ Gottlieb, 1948)

2.7 การสร้างกลิ่นและการสร้างรงควัตถุของแอกติโนมัยซีทีส

2.7.1 การสร้างกลิ่น

การสร้างกลิ่นเฉพาะของแอกติโนมัยซีทีส สามารถนำมาให้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกแอกติโนมัยซีทีส ได้เช่นเดียวกัน โดยกลิ่นที่สร้างขึ้นอาจมีกลิ่นคล้ายกลิ่นอับ กลิ่นดิน หรือกลิ่นผลไม้ ในปี 1895 Rullmann อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ศึกษารายละเอียดของกลิ่นที่ถูกสร้างขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทีส พบว่าสารที่ทำให้เกิดกลิ่นที่สร้างจาก *Actinomyces ordorifer* สามารถละลายได้ในอีเธอร์ ต่อมาในปี 1947 Thaysen อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) อธิบายว่าสารดังกล่าวคือ สารจำพวกเอมีน

2.7.2 การสร้างรงควัตถุ

การสร้างรงควัตถุก็เป็นอีกเกณฑ์หนึ่งในการจำแนกแอกติโนมัยซีทีส รงควัตถุที่สร้างขึ้นจะมีความหลากหลายขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำแนกตามลักษณะของโทนสี เช่น สีน้ำเงิน ม่วง แดง ชมพู เหลือง เขียว น้ำตาล หรือ ดำ ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเก็บอยู่ในสายใย โดยรงควัตถุจะเกิดจากปฏิกริยาของไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งออกซิไดส์สารประกอบอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แอกติโนมัยซีทีส บางกลุ่มสามารถสร้างรงควัตถุได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น *Actinomyces violaceus-ruber* และ *Actinomyces tricolor* รงควัตถุโทนสีน้ำตาลจะเป็นรงควัตถุที่พบมากที่สุด โดยเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยสารอินทรีย์ (Tresner และ Backus 1963)

ความหลากหลายของรงควัตถุขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุของเชื้อ ปริมาณอากาศ และอุณหภูมิ นอกจากนี้กรดและด่างก็ยังมีผลต่อสีของรงควัตถุอีกด้วย โดยในปี 1908 Muller อ้างอิงถึงโดย Shirling และ Gottlieb (1966) รายงานว่าพีเอชมีผลต่อการสร้าง รงควัตถุของ *S. coelicolor* คือเมื่ออยู่ในภาวะเป็นกรด รงควัตถุจะเป็นสีแดง และจะกลายเป็นสีน้ำเงิน เมื่อมีภาวะเป็นด่าง

2.8 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน มักมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารในธรรมชาติ สามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน จึงเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรียอื่นๆ การคัดแยกแอกติโนมัยซีทีสจากธรรมชาติ จึงต้องมีวิธีการจำเพาะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อจากแหล่งที่ต่างกัน การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากธรรมชาติ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การทำ Pretreatment เพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ การอบหรือบ่มด้วยความร้อน การใช้สารเคมี หรือการใช้ไวรัสเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์บางชนิด (Kurtboke และคณะ, 1992) และการใช้อาหารที่จำเพาะต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสแต่ละชนิด (selective media) เช่น การเติมไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส (Grynder และคณะ, 2003) หรือการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การแยกแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มต่างๆมีวิธีการแยกที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแอกติโนมัยซีทีสที่ต้องการแยก และแหล่งที่มาของเชื้อ ดังตัวอย่างรายงานต่อไปนี้

Hayakawa และคณะ (1991) แยก *Streptosporangium*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora* และ *Microbispora* จากดิน โดยแต่ละสกุลทำ pretreatment แตกต่างกันคือ *Streptosporangium* ทำการแยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.01% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ leucomycin 1 mg/L สกุล *Dactylosporangium* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.03% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ tunicamycin 10 mg/L สกุล *Micromonospora* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาตากลมแล้วเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ tunicamycin 20 mg/L สกุล *Microbispora* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % และ chlorhexidine gluconate 0.03% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L

Hayakawa และคณะ (1995) แยก *Actinomadura viridis* จากดิน โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.0 % นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Humic acid-Vitamin Agar ที่ผสม kanamycin josamycin lysozyme และ nalidixic acid

Hayakawa และคณะ (1996) แยกแอกติโนมัยซีทีสสกุล *Microtetraspora* และสกุลใกล้เคียง โดยการนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำดินที่อบแล้วมาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ดูดสารละลายดินที่มีระดับการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (5 mmol/l, pH 7.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม bezethonium 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LSV-SE agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 20 mg/l norfloxacin 20 mg/l และ nalidixic acid 10 mg/l

Hallmann และคณะ (1997) แยกแอกติโนมัยซีทีสที่อาศัยอยู่ภายในพืช (endophytic actinomycete) โดยการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ จากนั้นล้างให้สะอาดและบดด้วยโกร่งที่ปราศจากเชื้อ นำส่วนที่ได้จากการบดมากรองผ่านสำลี แล้วเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ และเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ

Suzuki และคณะ (1999) แยกสกุล Sporichthya จากดิน สกุลนี้มีการสร้าง zoospore นำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อลดจำนวนของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีทีสจากนั้นเติมสารละลาย 0.1% นมพร่องไขมัน (skim milk) ใน 10 mM MOPs (morpholinepropanesulfonic acid) pH8 ในดินที่อบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที เจือจางสปอร์ใน 0.85% NaCl นำสารละลายสปอร์ เกลี่ยบนอาหาร Humic acid-Vitamin Agar (HVG)

Suzuki และคณะ (2000) แยกแอกติโนมัยซีทีสสกุล *Actinobispora* จากดิน โดยการอบดินที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียอื่นๆ จากนั้นละลาย และเจือจางดินตัวอย่างในสารละลาย 0.85% NaCl เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Humic acid-vitamin gellan gum (HGV) ที่เติมสารปฏิชีวนะ leucomycin 1 µg/ml nivobiocin 1 µg/ml tunicamycin 0.5 µg/ml cyclohexamide 50 µg/ml และ nystatin 50 µg/ml ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกสกุล *Actinobispora* ได้ 18 % ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

Suzuki และคณะ (2001) แยกสกุล *Planomonospora* จากดิน โดยใช้อาหาร Humic acid-trace salts gellan gum (pH9) เป็นอาหารที่ใช้คัดเลือก ซึ่ง *Planomonospora* จะสร้างอับสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถแยกสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้จากอับสปอร์โดยใช้ 0.1% skim milk 5 mM *N*-cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid (CHES) pH9 เป็นสารละลายในการล้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ออกมา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Planomonospora* ได้ 246 สายพันธุ์จากดินตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง

Boudjella และคณะ (2005) แยกสกุล *Streptosporangia* จากดินในทะเลทรายซาฮารา (Saharan) โดยการนำดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Citin-B Vitamins Agar ที่เติม kanamycin 25 *u*g/ml และ cycloheximide 50 *u*g/ml

Zitouni และคณะ (2005) แยกสกุล *Nocardiopsis* และ *Saccharothrix* จากดินในทะเลทรายซาฮารา (Saharan) โดยนำดินมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของ Humic-Vitamin-B- Agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin 10 *u*g/ml, หรือ erytromycin 10 *u*g/ml และ chloramphenicol 25 *u*g/ml

Hadjira และคณะ (2006) แยก *Stretosporangium* สายพันธุ์ Sg10 จากดินในประเทศแอลจีเรีย โดยนำดินตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางด้วยน้ำกลั่น นำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin-B vitamins medium ซึ่งประกอบด้วย ไคติน, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCO_3$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ และวุ้น ปรับ pH เป็น 7.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อ ในส่วนของวิตามินบี ซึ่งประกอบด้วย thiamine-HCl, riboflavin, niacin, pyrodoxin-HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid และ biotin เติมหลังจากที่นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแล้ว นอกจากนี้ยังเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin และ cycloheximide ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/ml ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

2.9 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทีส

ประโยชน์ที่สำคัญของแอกติโนมัยซีทีส ได้แก่การนำไปใช้ในทางการแพทย์ คือการผลิตสารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนายารักษาโรคชนิดใหม่ๆต่อไป นอกจากนี้ แอกติโนมัยซีทีสยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกหลากหลาย ครอบคลุมด้านอุตสาหกรรม การเกษตร และสิ่งแวดล้อม ดังตัวอย่างงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

Stamford และคณะ (2002) แยก *Streptosporangium* sp. ซึ่งเป็น endophytic actinomycete อาศัยในใบของต้นข้าวโพด โดยเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ glucoamylase ที่ทนร้อนได้ ซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่ต้องมีการย่อยแป้ง ให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส

Oliveira และคณะ (2005) ใช้ *Frankia* spp. ซึ่งเป็นแอกติโนไรซา (actinorhiza) จัดเป็นแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถอาศัยอยู่ในรากพืช และตรึงไนโตรเจนได้ นำมาติดเชื้อร่วมกับราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) *Glomus intraradices* ส่งผลทำให้พืช *Alnus glutinosa* ลดสภาวะความเครียดในดินที่มีความเป็นด่างสูง และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต โดยพืชที่มีการใส่เชื้อสองชนิดนี้ร่วมกันจะมีพื้นผิวใบมากขึ้น รากยาวขึ้น และมีมวลมากกว่าพืชที่ไม่มีการใส่เชื้อ หรือใส่เชื้อเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง งานวิจัยชิ้นนี้มีประโยชน์ในการช่วยฟื้นฟูสภาพพืชในดินที่เป็นด่างสูง

Goshev และคณะ (2005) แยกเอนไซม์ทนร้อน 2 ชนิด ที่มีสมบัติในการย่อยโปรตีนคอลลาเจนโดยได้จากแอกติโนมัยซีทีส 2 ชนิด คือ *Microbispora* และ *Thermoactinomyces* เมื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับ Clostidiopeptidase A พบว่า เป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้าย collagenase (collagenase-like enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องหนัง และขนสัตว์ เพราะจะทำให้ขน และหนังอ่อนนุ่มลง

Castillo และคณะ (2006) คัดแยก streptomycetes จากดินทั้งในพื้นที่เกษตรกรรม และไม่ใช่พื้นที่เกษตรกรรม เพื่อตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายสารปราบวัชพืช diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากไม่ละลายน้ำ พบว่า streptomycetes เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีการย่อยสลาย diuron ได้ดี เหมาะสำหรับการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อน diuron และ streptomycetes ที่แยกได้จากพื้นที่เกษตรกรรมมีความสามารถในการย่อยสลาย diuron ได้ดีกว่าจากที่ไม่ใช่พื้นที่เกษตรกรรม

El-tarabily และ Sivasithamparam (2006) ได้ศึกษา และรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับแอกติโนมัยซีทีสที่ไม่ใช่สกุล *Streptomyces* (Non-streptomycete actinomycetes) ที่มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อราที่ก่อโรคพืชในดิน เพื่อใช้เป็นการควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) อีกทั้งยังเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoter)

Benimeli และคณะ (2007) คัดแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ M7 จากโคลนในแหล่งน้ำเสีย ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย lindane (γ- hexachlorocyclohexane) ได้ lindane เป็นสารฆ่าแมลงที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมักตกค้าง และสะสมในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ พืช สัตว์ อาหาร รวมถึงในเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ งานวิจัยชิ้นนี้เป็นฉบับแรกที่รายงานการย่อยสลาย lindane ของจุลินทรีย์ โดยไม่ต้องสะสมไว้ในเซลล์ หรือต้องเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารอื่นก่อนการย่อยสลาย

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า แอกติโนมัยซีทีสเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการศึกษา และประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ อีกกลุ่มหนึ่ง

2.10 สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ โดยส่วนมากจะเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีมวลโมเลกุลต่ำ สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ที่ความเข้มข้นน้อย ๆ (Demain, 1999) โดยจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืช หรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ปัจจุบันสารปฏิชีวนะยังมีแบบที่เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้สารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากธรรมชาติเป็นต้นแบบ การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbistatic และฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbicidal ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbistatic ร่างกายจะกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ระบบการของร่างกายคือ phagocytosis การผลิตแอนติบอดี การผลิต interferon เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส และ กลไกการปฏิเสธของลำไส้ โดยการเกิดอาการท้องเสีย อาเจียน ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbicidal จะฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการทำให้เซลล์แตก แต่ร่างกายยังคงได้รับผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (Edward, 1980)

ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค จะต้องมีคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

1. สามารถทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด หรือเรียกว่ามีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum antibiotics)
2. ไม่ทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา หรือฆ่าเหล่า (mutation)
3. ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์กับผู้ป่วย เช่นไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือรบกวนระบบการทำงานในร่างกาย
4. ไม่ทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในร่างกายผู้ป่วย เพราะอาจจะทำให้เกิดการเสียสมดุลธรรมชาติ ทำให้เกิดการติดเชื้อจากจุลินทรีย์อื่นๆ

2.10.1 กลไกการทำงานของสารปฏิชีวนะ

การทำงานของสารปฏิชีวนะ มีทั้งแบบยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งการทำงานของสารปฏิชีวนะสามารถแบ่งกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

1. กลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ เพนิซิลลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ไซโคลเซอรีน (cycloserine) แวนโคไมซิน (vancomycin) และบาซิตราซิน (bacitracin)

2. กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymixin) แกรมิซิดิน (gramicidins) ไทโรซิดิน (tyrocidin) นิสเตติน (nystatin) และแอมโฟเทอริซิน (amphotericin)

3. กลุ่มที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ สเตรปโตไมซิน (streptomycin) กานาไมซิน (kanamycin) นีโอไมซิน (neomycin) เตตราไซคลิน (tetracycline) ออริโอไมซิน (aureomycin) เทอราไมซิน (terramycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) อิริโธรไมซิน (erythromycin)

4. กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของกรดนิวคลิอิก ได้แก่ ไรแฟมพิซิน (rifampicin) แอคติโนมัยซิน (actinomycin) ไมโตไมซิน (mitomycin) กรีสซิโอฟูลวิน (griseofluvin)

5. กลุ่มที่ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเพาะ ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์

2.10.2 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

ปัจจุบันสารปฏิชีวนะในตลาดยาจำนวน 38 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่สารตั้งต้นมาจากธรรมชาติ 4 เปอร์เซ็นต์ มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยให้มีโครงสร้างเหมือนกับสารจากธรรมชาติ 31 เปอร์เซ็นต์ มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี และ 26 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งในจำนวนนี้มีแอกติโนมัยซีทีสเป็นแหล่งที่สำคัญของสารปฏิชีวนะ โดย 65-75 เปอร์เซ็นต์ ของสารปฏิชีวนะที่ได้มาจากธรรมชาติและใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส รองลงมาคือราและแบคทีเรีย ตามลำดับ และในจำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส 80 เปอร์เซ็นต์ ผลิตจาก *Streptomyces* ดังตารางที่ 2.1 (Krsek และคณะ, 2000) และ (Kieserและคณะ, 2000) นอกจากนั้นผลิตจากแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก ดังตารางที่ 2.2 (El-Tarabily และ Sivasithamparam, 2005)

ตารางที่ 2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	การยับยั้ง
Actinomadura carminata	Carminomycin	เซลล์มะเร็ง
Saccharopolyspora erythraea	Erythromycin	แบคทีเรีย
Streptomyces albovinaceus	Rifamycin B	ไวรัส
Streptomyces albus	8-Azaguanine	ไวรัส
Streptomyces aureofaciens	Tetracycline	แบคทีเรีย
Streptomyces griseus	Candicidin	รา
Streptomyces griseus	Cycloheximide	รา
Streptomyces griseus	Streptomycin	แบคทีเรีย
Amycolatopsis mediterranei	Rifamicins	แบคทีเรีย
Streptomyces nodosus	Amphotericin B	รา
Streptomyces noursei	Nystatin	รา
Amycolatopsis orientalis	Vancomycin	แบคทีเรีย
Streptomyces peuccetius	Daunorubicin HCL	เซลล์มะเร็ง
Streptomyces rimosus	Oxytetracycline	แบคทีเรีย
Streptomyces venezuelae	Chloramphenicol	แบคทีเรีย, ไวรัส
Streptomyces verticillus	Bleomycin sulfate	เซลล์มะเร็ง
Streptomyces spp.	Actinomycin D	เซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	การยับยั้ง
Norcardia lactamdurans	Cephamycin C	แบคทีเรีย
Streptomyces orchidaceae	Cycloserine	แบคทีเรีย
Streptomyces roseosporus	Daptomycin	แบคทีเรีย
Micromonospora olivoasterospora	Fortimicin	แบคทีเรีย
Streptomyces spp.	Fosfomycin	แบคทีเรีย
Micromonospora spp.	Gentamicin	แบคทีเรีย
Streptomyces kanamyceticus	Kanamycin	แบคทีเรีย
Streptomyces lincolnensis	Lincomycin	แบคทีเรีย
Streptomyces argillaceus	Mithramycin	เซลล์มะเร็ง
Streptomyces verticillatus	MitomycinC	เซลล์มะเร็ง
Streptomyces nataensis	Natamycin	รา
Streptomyces fradiae	Neomycin	แบคทีเรีย
Streptomyces tendae	Nikkomycin	รา
Nocardia uniformis	Norcardicin	แบคทีเรีย
Streptomyces niveus	Novobiocin	แบคทีเรีย
Streptomyces antibioticus	Oleandomycin	แบคทีเรีย
Streptomyces verticillus	Phleomycin	เซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	การยับยั้ง
Streptomyces cacaoi var.*asoensis*	Polyoxins	รา
Streptomyces pristinaespiralis	Pristinamycin	แบคทีเรีย
Norcardia lurida	Ristocetin	แบคทีเรีย
Streptomyces spectabilis	Spectinomycin	แบคทีเรีย
Streptomyces amofaciens	Spiramycin	แบคทีเรีย
Streptomyces graminofaciens	Streptogramins	แบคทีเรีย
Actinoplanes teichomyceticus	Teichoplanin	แบคทีเรีย
Streptomyces cattleya	Thienamycin	แบคทีเรีย
Streptomyces tenebrarius	Tobramycin	แบคทีเรีย

ตารางที่ 2.2 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
Actinoplanes sp	Xanthone	Cooper และคณะ (1992)
Actinoplanes sp	Sch 54445	Min และคณะ (1997)
Actinoplanes brasiliensis	A/672	Palleroni (1989)
Actinoplanes caeruleus	Heptaene	Palleroni (1989)
Actinoplanes deccanensis	Lipiarmycin	Palleroni (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
Actinoplanes ianthinogenes	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
Actinoplanes ferrugineus	L-azetidine-2-carboxylic acid	Palleroni (1989)
Actinoplanes missouriensis	5-azacytidine	Palleroni (1989)
Actinoplanes philippinensis	Macrocyclic lactone	Palleroni (1989)
Actinoplanes teichomyceticus	Lipoglycopeptide	Carelli และคณะ (1995)
Actinoplanes utahensis	Echinocandin	Boeck และคณะ (1989)
Actinomadura madurae	Simaomicin	Maiese และคณะ (1990)
Actinomadura hibisca	Pradimicin FA-1	Sawada และคณะ (1990)
Microbispora sp.	SCH 31828	Patel และคณะ (1988)
Microbispora sp.	Glucosylquestiomycin	Igarashi และคณะ (1998)
Micromonospora sp.	Spartanamicins	Nair และคณะ (1992)
Micromonospora sp.	Rustmicin	Sigmund และ Hirsch (1998)
Micromonospora sp.	Micromonosporin	Thawai และคณะ (2004)
Micromonospora carbonacea	Everninomicin	Kawamoto (19890
Micromonospora coerulea	Glutarimide	BeomSeok และคณะ (1999)
Micromonospora echinospora	Gentamicin	Kawamoto (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
Micromonospora echinospora	Hazimicins	Marquez และคณะ (1983)
Micromonospora halophytica	Halomicin	Kawamoto (1989)
Micromonospora inositola	XK-41	Kawamoto (1989)
Micromonospora olivasterospora	Fortimicin	Kawamoto (1989)
Microtetraspora	SCH 42282	Hegde และคณะ (1998)
Saccharothrix sp.	Formamicin	Igarashi และคณะ (1997)
Spirillospora sp.	HM17	Hacene และคณะ (1994)
Spirillospora sp.	H107	Hacene และคณะ (2000)
Streptosporangium albidum	Aculeximycin	Ikemoto และคณะ (1983)
Streptosporangium roseum	AH7	Hacene และคณะ (1998)
Streptoverticillium album	Quinaldopeptin	Toda และคณะ (1990)
Streptoverticillium cinnamoneum	HA-94	Paradkar และคณะ (1998)

2.10.3 กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

Sneader (2005) ได้จัดจำแนกสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก แอกติโนมัยซีทีสเป็นกลุ่มต่างๆ ตามลักษณะโครงสร้างพื้นฐาน ดังนี้

1. **กลุ่ม Streptomycin และ Aminoglycoside กลุ่มอื่นๆ** ได้แก่ streptomycin neomycin kanamycin lincomycin gentamycin เป็นต้น สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino sugar ที่เชื่อมกันแบบ glycoside linkage ออกฤทธิ์แบบ bacteriocide โดยรบกวนการแปลรหัสของ mRNA ในไรโบโซมทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

2. **กลุ่ม Chloramphenicol** โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติก (I) ส่วนไฮโดรคาร์บอนที่มีการขยายได้ (II) และ หมู่ acyl (III) ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

3. **กลุ่ม Tetracycline** ได้แก่ aureomycin (chlortetracycline) oxytetracycline เป็นต้น โมเลกุลพื้นฐานมีวงอะโรมาติกต่อกัน 4 วง ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic กับ จุลินทรีย์ได้กว้าง เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ bacteriocide กลไกการทำงานของสารกลุ่มนี้จะยับยั้งโปรตีนโดยการไปจับกับไรโบโซม และ mRNA

4. **กลุ่ม Macrolide** ได้แก่ erythromycin และ lincomycin เป็นต้น ลักษณะ คือ เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 20 อะตอม มี macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบหลัก ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic โดยจับกับ 70S subunit ของไรโบโซม เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

5. **กลุ่ม Rifamycin** ได้แก่ Rifamycin B และ Rifamycin SV เป็นต้น สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ พบครั้งแรกจาก *Streptomyces* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และ *Mycobacterium tuberculosis* Rifamycin B เป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกในกลุ่มนี้ที่ใช้กับสัตว์ซึ่งมีฤทธิ์ไม่สูงมากนัก จึงมีการพัฒนา Rifamycin SV ที่ออกฤทธิ์เป็นวงกว้างออกมา สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ รวมถึง *Mycobacterium tuberculosis* และ *Mycobacterium lepae*

6. **กลุ่ม Polyene** ได้แก่ nystatin และ amphotericin B เป็นต้น โครงสร้างโมเลกุลมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วน hydrophobic และ hydrophilic ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา และยีสต์ (antifungal) โดยกลไกการทำงานมีผลต่อ selective permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์

7. **กลุ่ม Azomycin** พบครั้งแรกจาก *Streptomyces* ในปี 1953 และได้รับการพัฒนาจนสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ในปี 1965 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ trichomonicidal

มีความเป็นพิษสูงมาก จึงมีการพัฒนาสารอะนาล็อค (analogue) ได้เป็น metronidazole ใช้เป็นสารฆ่าโปรโตซัว และแบคทีเรีย

8. **กลุ่ม Vancomycin และ Teicoplanin** Vancomycin พบครั้งแรกจาก *Streptomyces orientalis* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งที่เป็นแอโรบิก และแอนแอโรบิก รวมถึงเชื้อ *Staphylococcus* ที่ดื้อยาด้วย โดยมีกลไกรบกวนการสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ vancomycin ที่บริสุทธิ์ใช้เป็นยารักษาโรคทางช่องปาก และทางเดินอาหาร สำหรับ vancimycin ที่ไม่บริสุทธิ์จะทำให้เกิดผลข้างเคียง (side effect) มาก Teicoplanin เป็นสารโมเลกุลเชิงซ้อน แยกได้จาก *Actinoplanes teichomtcetius* ออกฤทธิ์เหมือนกับ vancomycin แต่มีอายุการคงอยู่ในร่างกาย (half-life) ได้นานกว่า และมีการระคายเคืองน้อยกว่า vancomycin สามารถฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ หรือเส้นเลือดได้โดยตรง

9. **กลุ่ม Thienamycin** เป็นสารกลุ่ม Carbapenem ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces* กว่า 40 ชนิด ในปี 1990 มีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้สูง สารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในกลุ่มนี้ คือ Thienamycin ค้นพบได้ครั้งแรกจาก *Streptomyces cattleya* ในปี 1976 มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปปทิโดไกลแคน มีคุณสมบัติทนต่อเอนไซม์ β-lactamase สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

10. **กลุ่ม Clavulanic acid**_เนื่องจากเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ β-lactamase ได้ จะสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ cephalosporin ได้ จึงมีการค้นหายาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ β-lactamase ได้ โดย Clavulanic acid แม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่ำ แต่สามารถยับยั้งเอนไซม์ β-lactamase ได้ จึงได้มีการใช้ Clavulanic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะตัวอื่น เช่น amoxicillin ซึ่งการใช้ตัวยาร่วมกัน (combination) ของ Clavulanic acid กับยาชนิดอื่นนั้นได้รับการพัฒนาเป็นยาที่ขายในท้องตลาด และทางการแพทย์ได้แล้ว โดยใช้รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ และทางเดินปัสสาวะ

2.10.4 สารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Sneader (2005) อธิบายไว้ว่า การค้นหาสารต้านเซลล์มะเร็งจากธรรมชาติเริ่มต้นขึ้นเมื่อปลาย ค.ศ. 1950 เริ่มค้นพบสารกลุ่ม actinomycin หรือ dactinomycin ใน ค.ศ. 1953 ผลิตโดย *Streptomyces parvullus* มีฤทธิ์ยับยั้ง muscle tumours, soft tissue sarcomas tumours และ kidney tumour ค้นพบ daunorubicin ในปี ค.ศ. 1962 ผลิตโดย *Streptomyces peuetius* เป็นสารต้านเซลล์มะเร็งอยู่ในกลุ่ม anthracyclin ยับยั้ง solid tumors และ leukemias ได้ชงัด มีกลไกการยับยั้งโดยไปจับกับ DNA ทำให้เซลล์ไม่มี template สำหรับ

การสังเคราะห์ DNA พบ doxorubicin (14-hydroxy-analogue of daunorubicin) ในปี ค.ศ. 1967 ผลิตโดย *S. peuetius* ออกฤทธิ์ชงัดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น leukaemias, lymphomas และ solid tumours doxorubicin ถูกนำมาใช้เป็นหลักในการรักษาผู้ป่วยมามากกว่า 25 ปี โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเอ็นไซม์ topoisomerase II ส่งผลให้สาย DNA แตกหัก aclarubicin ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1974 ผลิตโดย *S. galilaeus* ซึ่งเป็นสารกลุ่ม *anthracyclin aclarubicin* A มีหลายกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ topoisomerase II ต่อ DNA (Strohl และคณะ,1997) bleomycin เป็นสารกลุ่ม glycopeptides ถูกค้นพบในปีค.ศ.1962 ผลิตโดย *S verticillus.* ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางกับ squamous cell carcinoma, testis tumors prostatic cancer, head และ neck tumour bleomycin เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่งในน้อยชนิดที่ไม่ส่งผลกดการสร้างเม็ดเลือดขาวในไขกระดูกของผู้ป่วย และยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทางเคมีของสารต้านเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด

กลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์มะเร็งแบ่งตามโครงสร้าง (Georgopapadakou, 1995)

1. **Alkylating Agent** สารกลุ่มนี้ปล่อยประจุบวกเข้ารบกวน DNA ทำให้โครงรูป (conformation) ของ DNA เปลี่ยนไป (DNA adducts) ทำให้ DNA ของเซลล์มะเร็งทำงานผิดปกติ เช่น melphalan ใช้รักษา myeloma และ solid tumour และ cyclophosphamide ใช้รักษา breast cancer และมะเร็งชนิดอื่น

2. **Platinum Complexes** สารกลุ่มนี้จะจับกับเบสในสาย DNA และ RNA ด้วยพันธะโควาเลนท์ ทำให้เกิด platinum-DNA adducts ทำให้โครงรูปของสาย DNA เปลี่ยนไป เช่น cisplatin และ carboplatin ใช้รักษา testicular lung bladder head และ neck cancer

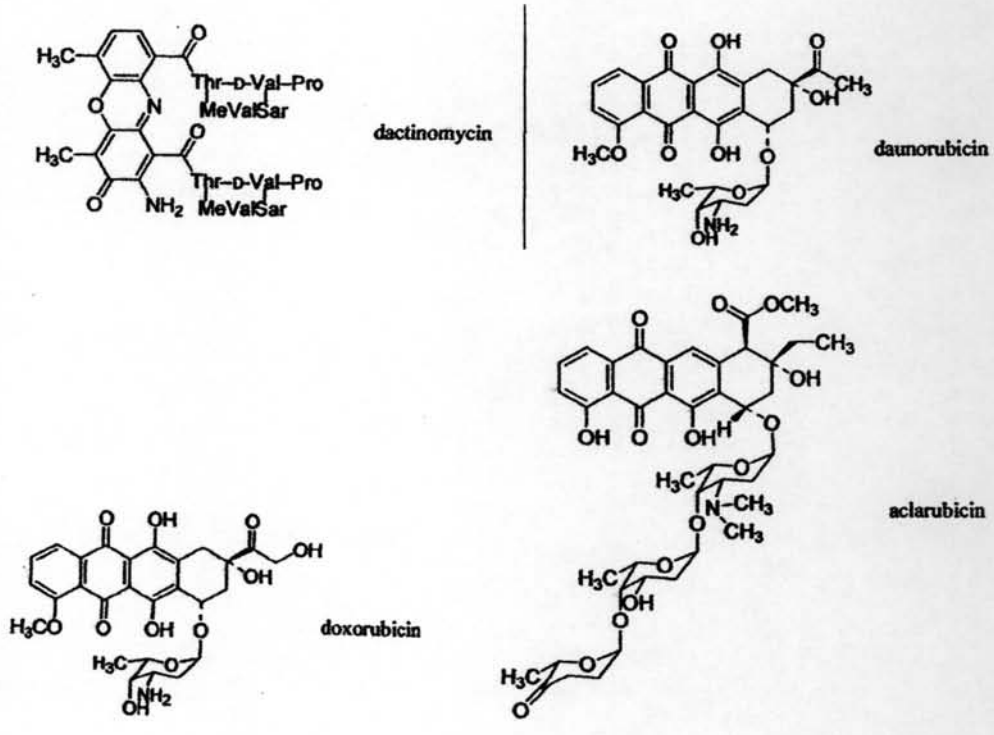
3. **Antimetabolites** สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึง (structural analog) กับสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ DNA และ RNA เช่น methotrexate จับกับเอนไซม์ dihydrofolate reductase ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เบส purine และมีผลยับยั้งต่อการสังเคราะห์ DNA

4. **Vinca Alkaloids and Taxol** สารกลุ่มนี้ยับยั้งการรวมตัวกันของไมโครทิวบูล (microtubule) ในการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis) ในยูคารีโอต เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการรวมตัวกันของไมโครทิวบูล ในการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง

5. Dactinomycin และ Anthracyclin สารสองกลุ่มนี้ผลิตจาก *Streptomyes* เช่น dactinomycin หรือ actinomycin D ใช้รักษามะเร็งที่พบได้ยาก เช่น nephroblastoma (Wilms' tumour) และ Ewing's sarcoma ซึ่งมีกลไกโดยแทรกเข้าไปจับตรงตำแหน่งเฉพาะภายในเกลียวของ DNA สายคู่ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA สารปฏิชีวนะกลุ่ม anthracyclin มีกลไกโดยแทรกเข้าไปตรงระหว่างคู่เบสในสาย DNA และจับกับเอนไซม์ topoisomerase II เป็นผลให้สาย DNA แตกหักออก ส่งผลให้เซลล์ตาย

6. Epipodophyllotoxins และ Amsacrine รบกวนการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II ในปฏิกิริยา DNA-resealing และ แทรกเข้าไปจับในสาย DNA ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA ออกเป็นสายคู่ หรือสายเดี่ยว

ตัวอย่างโครงสร้างสารต้านเซลล์มะเร็งแสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Sneader, 2005)

2.10.5 รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใหม่จากแอกติโนมัยซีทีส

แม้ว่าจะมีการค้นพบสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อ ใช้ทำเป็นยารักษาโรคมาเป็นเวลานานแล้ว และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเรื่อยมา ไม่ว่าจะเป็นการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ดัดแปลงโมเลกุลสาร หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะ แต่การค้นหาแหล่งของสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติก็ยังมีความสำคัญ และมีงานวิจัยเกี่ยวกับการหาแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มาโดยตลอด เนื่องจากปัจจัยต่างๆ หลายประการ เช่นการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ การแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งหนึ่งสู่อีกแหล่งที่ไม่เคยมีเชื้อโรคนั้นระบาดมาก่อน หรือแม้แต่การหาแหล่งใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณ (Yield) ที่สูงขึ้น (Pettit และคณะ, 1999) ซึ่งแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สำคัญที่สุดก็คือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแอกติโนมัยซีทีส ซึ่งมีรายงานว่า เป็นทั้งแหล่งของสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ดังรายงานต่อไปนี้

Zheng และคณะ (2000) แยกแอกติโนมัยซีทีสจากสิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งพืช และสัตว์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 1:320 เท่า ทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) และเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ KB เซลล์HLF และเซลล์CNE ด้วยวิธี MTT พบว่ามีเชื้อ 74 และ67 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์ P388 และ KB ได้ จากเชื้อทั้งหมด 360 สายพันธุ์ คิดเป็น 20.6% และ 18.6% ตามลำดับ

Schumacher และคณะ (2001) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม nucleosides คือ kahakamides A และ B ที่ผลิตจาก *Nocardiopsis dassonvillei* สารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

Hoppmann และคณะ (2002) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่คือ Vancoresmycin ที่ผลิตโดย *Amycolatopsis* sp. ST101170 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา Vancomycin แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและรา

Wink และคณะ (2002) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม glycopeptide ที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีตที่พบได้ยาก จีนัส *Amycolatopsis* สารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้ง Staphylococci ที่ดื้อยา methicillin

Mellouli และคณะ (2003) พบแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่ คือ *Streptomyces* sp. US24 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียง (98%) กับ *Streptomyces caelestis* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ niddamycin และ celesticetin แต่จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* sp. US24 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ niddamycin และ celesticetin สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

Singh และคณะ (2003) พบ Mannopeptimycins เป็นสารปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์แบบวง ที่ผลิตโดย *Streptomyces hygroscopicus* ออกฤทธิ์ยับยั้ง Staphylococci ที่ดื้อยา methicillin และ Enterococci ที่ดื้อยา vancomycin

Sujatha และคณะ (2004) ค้นพบ สารปฏิชีวนะกลุ่ม polyketide ที่ผลิตโดย *Streptomyces psammoticus* BT-408 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin

Fguira และคณะ (2004) พบแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่ คือ *Streptomyces* sp. US80 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียง (98 เปอร์เซ็นต์) กับ *Streptomyces reseoflavus* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ กลุ่ม aminoglycoside คือ flavomycin แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* sp. US80 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ flavomycin ซึ่ง *Streptomyces* sp. US80 สร้างสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิด และจัดอยู่ในกลุ่ม macrolide สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและรา

Boudjella และคณะ (2005) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม glycopeptide ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่คือ *Streptosporangia* Sg10 โดยปกติสกุล *Streptosporangia* ผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม glycopeptide คือ sibiromycin และ sinefungins แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptosporangia* Sg10 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ sibiromycin และ sinefungins สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่มีฤทธิ์น้อยกับแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา

Zitouni และคณะ (2005) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม nucleosides ที่ผลิตจาก *Saccharothrix* มีฤทธิ์ยับยั้งรา จากที่เคยมีรายงานสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Saccharothrix* ออกฤทธิ์ยับยั้งวัชพืชเท่านั้น

Gorajana และคณะ (2006) ได้มีการค้นพบสาร resistoflavine จาก *Streptomyces chibaensis* AUBN$_1$/7 ที่แยกได้จากโคลนใต้ทะเลในบริเวณอ่างเบงกอลประเทศอินเดีย มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งตับ อีกทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เล็กน้อย ทั้งแกรมบวก และลบ

Igarashi (2007) พบสารกลุ่ม anthraquinone ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ lupinacidin A และ lupinacidin B จาก Micromonospora lupine สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเป็น endophytic actinomycete สารทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู (26-L5 carcinoma cell) โดยไม่ได้มีการยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์