บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม actinomycetes ที่เป็นสมาชิกในวงศ์ *Streptomycetaceae* *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใยคล้ายรา พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป สายใยและสปอร์สามารถสร้างรงควัตถุหลากสี บางสายพันธุ์สร้างรงควัตถุที่ละลายลงไปในอาหารได้ (soluble pigment) ผนังเซลล์ประกอบไปด้วยกรดแอลไดอะมิโนไพมิลิก (L-diaminopimelic acid) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้มากมาย รวมถึงสารประกอบอนินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน มีเปอร์เซ็นต์ของเบส guanine และ cytosine (% G+C) ในจีโนมิคดีเอ็นเออยู่ในช่วง 69-78% (Rintala, 2003) ได้มีการรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีประโยชน์มากมายถึง 61% ของจุลินทรีย์ทั้งหมดและคิดเป็น 80% ของแบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes (Kieser และคณะ, 2000)

เนื่องจาก *Streptomyces* สามารถสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่หลากหลาย โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประเภทแกรมบวก แบคทีเรียประเภทแกรมลบ ยีสต์และรา เช่น streptomycin neomycin chloramphenicol และ tetracyclines (Reese และคณะ, 2000) สารปฏิชีวนะเหล่านี้จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร การปศุสัตว์อย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่างๆ เช่น Glucose isomerase จาก *Streptomyces violaceoniger* เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโตสเข้มข้น (Kaneko และคณะ, 2000) และ *Streptomyces griseus* สามารถผลิตเอนไซม์ chitosanases ซึ่งมีประโยชน์ในการเตรียม chitooligosaccharides (Tanabe และคณะ, 2003) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *Streptomyces* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์มากมายหลายด้านจึงทำให้การศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อคัดกรองหาสายพันธุ์ใหม่หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่จะมีศักยภาพในการนำไปประยุต์ใช้ จึงเป็นไปอย่างกว้างขวางและต่อเนื่อง

Streptomyces พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ อากาศ แต่จะพบมากที่สุดในดิน (Rintala, 2003) เนื่องจาก *Streptomyces* มีหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) ในห่วงโซ่อาหาร ดินจึงเป็นแหล่งที่นิยมนำมาคัดกรองหาแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจากมีความหลากหลายทั้งด้านสายพันธุ์และสารเมแทบอไลท์ที่สร้าง การคัดกรองหา *Streptomyces* จากบริเวณและชนิดของดินที่ต่างๆ เช่น ดินบริเวณรอบรากต้นกล้วยพบ *Streptomyces* ที่สร้าง alginate lyase (Cao และคณะ 2007) *Streptomyces tritolerans* sp. nov เป็น *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ที่คัดกรองได้จากบริเวณดินแห้ง ในจังหวัด Karnataka ประเทศอินเดีย (Syed และคณะ, 2007) และ จากการแยกเชื้อดินบริเวณโอเอซีสของประเทศตูนิเซียพบ *Streptomyces* US80 มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Streptomyces roseoflavus* สร้างสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างเป็น aminoglycoside คือ flavomycin (Fourati-Ben Fguira และคณะ, 2005)

การจัดจำแนก *Streptomyces* นั้น แต่เดิมอาศัยวิธีทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและลักษณะสมบัติทางชีวเคมี เช่น ลักษณะของสายใยอากาศ การแตกแขนงของสายใย (mycelium) การจัดเรียงและรูปร่างของสปอร์ สีสปอร์ การสร้างรงควัตถุของสายใยอาหารและรงควัตถุที่แทรกซึมในอาหาร การสร้างรงควัตถุเมลานิน รวมถึงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกด้วยวิธีดังกล่าวอาจยังไม่แม่นยำ ในปี คศ.1964 จึงมีโครงการ International Streptomyces Project (ISP) เพื่อกำหนดมาตราฐานในการจัดจำแนก *Streptomyces* spp. ซึ่งมุ่งหวังที่จะลดจำนวนของสปีชีส์ที่ซ้ำซ้อนกันอยู่ จึงได้มีการเพิ่มเติมการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางเคมี และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ ความจำเพาะต่อชนิดของฟาจ การทำ DNA-DNA hybridization การทดสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของไรโบโซม และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และ 23S rDNA สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA นั้นมักถูกนำมาเป็นข้อมูลเพื่อพิจารณาจัดจำแนกจุลินทรีย์หลายชนิด รวมถึง *Streptomyces* เนื่องจากมีบริเวณที่ได้อนุรักษ์ไว้ (conserved region) และมีบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (variable region) 3 บริเวณ คือ α β และ γ ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ 16S rDNA จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดกลุ่ม *Streptomyces* และสามารถหาความสัมพันธ์ในระดับจีนัส สปีชีส์ และสายพันธุ์ได้ (Anderson และ Wellington, 2001) บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลาย α (variable α region) ของ 16S rDNA มีนิวคลีโอไทด์อยู่ประมาณ 120 คู่เบสที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงมาก จึงมีประโยชน์ในการระบุสปีชีส์ของ *Streptomyces* (Kataoka และคณะ, 1997) นอกจาก 16S rDNA แล้วบริเวณ 16S-23S intraspecific transcribed sequence (ITS) มี variable region อยู่มากเช่นกัน (Wenner และคณะ, 2002) แต่อย่างไรก็ตามบริเวณ 16S-23S ITS ของ *Streptomyces* ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรค potato scab lesions จากประเทศเกาหลีไม่เหมาะที่จะนำมาเป็นข้อมูลเพื่อสร้าง Phylogenetic Tree ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจากมีความยาวแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และมีบริเวณที่หลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอยู่ 35-100% แม้ว่าเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน (Song และคณะ, 2004) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการจัดจำแนก *Streptomyces* เช่น การวิเคราะห์โดยวิธี Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายของประชากรในกลุ่ม actinomycetes บริเวณรากพืช ทำให้สามารถแยกแบคทีเรียออกได้ในระดับจีนัส (Conn และ Franco, 2004) การศึกษารูปแบบของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในการระบุจีนัส ของแบคทีเรียในกลุ่ม actionomycetes ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำได้โดยใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อนในห้องปฏิบัติการ (Cook และ Meyer, 2003) และ Lanoot และคณะ (2005) ได้รายงานว่าเมื่อนำ 16S rDNA-ITS มาวิเคราะห์ Restriction

Fragment Length Polymorphism (RFLP) เรียกวิธีการนี้ว่า 16S-ITS RFLP fingerprinting ซึ่งเป็นการดูลักษณะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อทำการจัดกลุ่ม *Streptomyces* และ *Kitasatospora* ทั้งหมด 463 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วย 16S-ITS RFLP กับการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic Tree จาก 16S rDNA พบว่ามีความสอดคล้องกัน ดังนั้นในการจัดจำแนก *Streptomyces* spp. จึงต้องอาศัยข้อมูลทางจีโนไทป์ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล ควบคู่กับการศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ลักษณะสมบัติทางชีวเคมี เพื่อให้เกิดความเป็นมาตรฐานและแม่นยำมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าดินนั้นอุดมไปด้วยสารอาหารของจุลินทรีย์ที่จะสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ทำให้ดินเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์ และมีความหลากหลายสูง รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* ด้วย โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาความหลากหลายของ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน เนื่องจากจังหวัดน่านถือเป็นจังหวัดที่กำลังมีความต้องการการพัฒนา และจัดการทางทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน และที่สำคัญยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในพื้นที่แห่งนี้มาก่อน ซึ่งการศึกษานี้คาดว่าจะได้องค์ความรู้ใหม่ๆเกี่ยวกับ *Streptomyces* ที่แยกได้ซึ่งจะถูกนำมาจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ลักษณะสมบัติทางชีวเคมี และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree และเก็บรวบรวมไว้เพื่อจะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังจะทำการศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจมีประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา สมบัติทางชีวเคมีของ *Streptomyces* spp. จากดินใน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และจัดกลุ่มเบื้องต้น
2. ศึกษา *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้ด้วยวิธีชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้เทคนิค Restriction Fingerprint Length Polymorphism (RFLP) ของบริเวณ 16S-ITS ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Bst*UI เพื่อจัดกลุ่ม
3. สร้าง Phylogenetic Tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากตัวแทน *Streptomyces* spp. ที่จัดกลุ่มด้วยเทคนิค RFLP
4. ทดสอบความสามารถสร้างสารต้านจุลชีพจาก *Streptomyces* spp. ที่แยกได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

รู้ถึงความหลากหลายของแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินใน ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ซึ่งคาดว่าจะคัดกรองได้ *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่สร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิใหม่ๆ หรือคัดกรองได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อขยายผลต่อไปได้