บทที่ 2
ปริทรรศน์วรรณกรรม

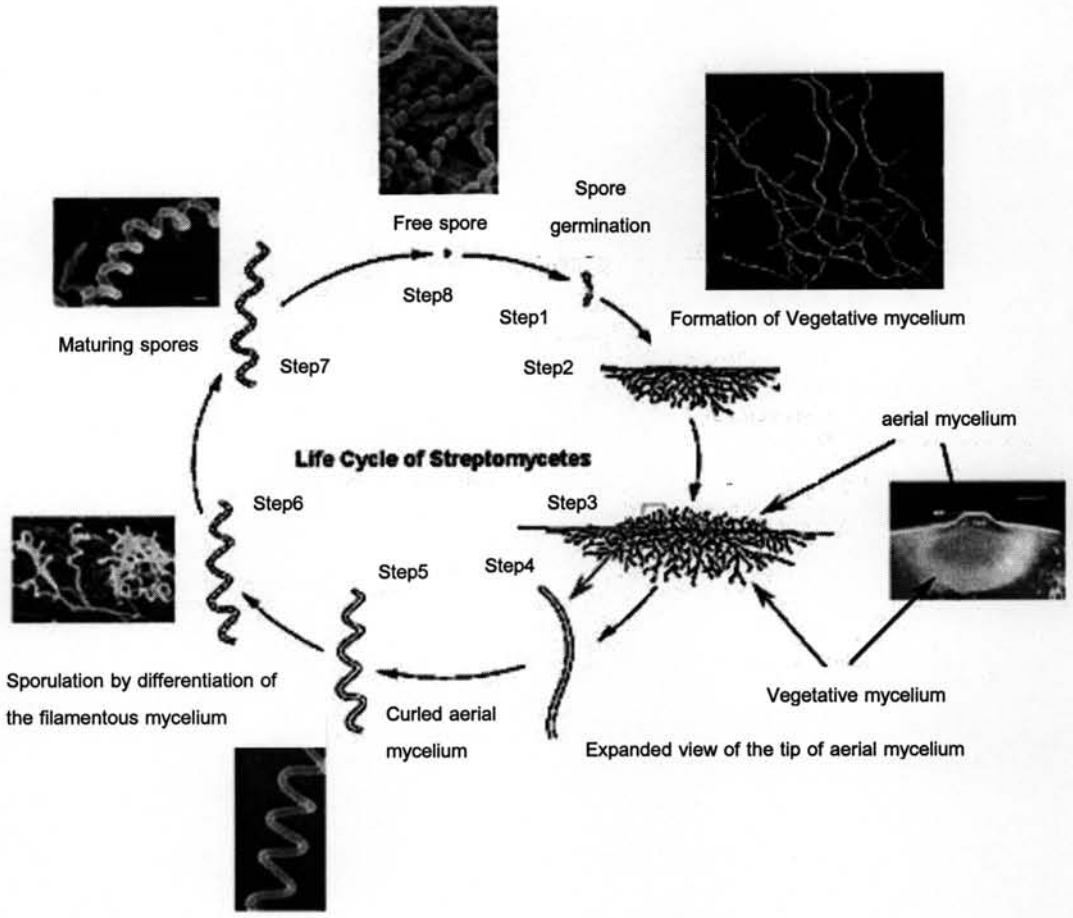
2.1 *Streptomyces* spp.

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไป

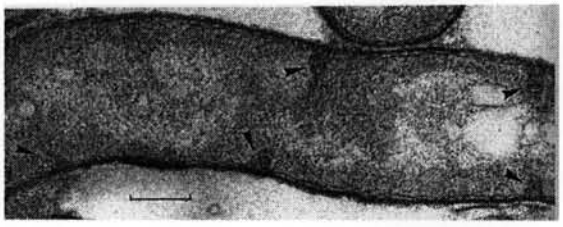
streptomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต โคโลนีมีผิวขอบเรียบ ลักษณะเป็นปุยคล้ายผงแป้ง มีการเจริญเป็นกิ่งก้านของสายใย ผนังเซลล์เป็นเปปทิโดไกลเคน และมีกรดแอลไดอะมิโนไพมิลิก (L-diaminopimelic acid) เป็นองค์ประกอบซึ่งแตกต่างจาก actinomycetes อื่นๆ *Streptomyces* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและสร้างพลังงานได้หลากหลายรวมถึงสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น เซลลูโลส ลิกนิน และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ และ *Streptomyces* ส่วนมากย่อยอะดีนีน (adenine) เอสคูลิน (esculin) เคซีอีน (casein) เจลาติน (gelatin) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) แป้ง (starch) และ แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)

Streptomyces มีปริมาณ G+C ประมาณ 69-78 เปอร์เซนต์โมล เมื่อใช้วิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ในการวิเคราะห์ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *S. coelicolor S. lividans S. griseus* และ *S. ambofaciens* มีขนาด 7.8-8.0 Mb โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง เนื่องจากมีความยาวมากจึงทำให้มีโอกาสเกิดการหายไปหรือเพิ่มจำนวนของเบสได้เอง 0.1-1% ในกระบวนการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่ *Streptomyces* ไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะและยีนต้านทานสารปฏิชีวนะบนพลาสมิด (Kieser และคณะ 2000)

การเจริญของสายใย *Streptomyces* มี 2 แบบ คือสายใยอาหาร (substrate หรือ vegetative mycelium) ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารและฝังอยู่ในอาหารมีหน้าที่ในการดูดซึมอาหารและยึดเกาะพื้นผิว ส่วนสายใยอากาศ (aerial mycelium) เจริญเหนือผิวหน้าอาหาร มีหน้าที่ในสร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ (รูปที่ 2.1 และ 2.2) ทั้งสายใยอาหารและสายใยอากาศสามารถสร้างรงควัตถุได้หลากหลาย และสร้างรงควัตถุแทรกซึมในอาหารได้ เส้นผ่านศูนย์กลางของสายใยมีขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร (Noel และคณะ 1983) ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ *Streptomyces* จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) ที่มีการเรียงตัวของสายสปอร์และการแตกกิ่งที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.3) การสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* เกิดจากการสร้างผนังกั้นช่องว่างภายในผนังเซลล์ของสายใยอากาศออกเป็นหลายๆเซลล์ เรียกว่า เซพตัม (septum) แล้วจึงแบ่งออกไปเป็นเซลล์แต่ละเซลล์เพื่อกลายเป็นสปอร์ต่อไป

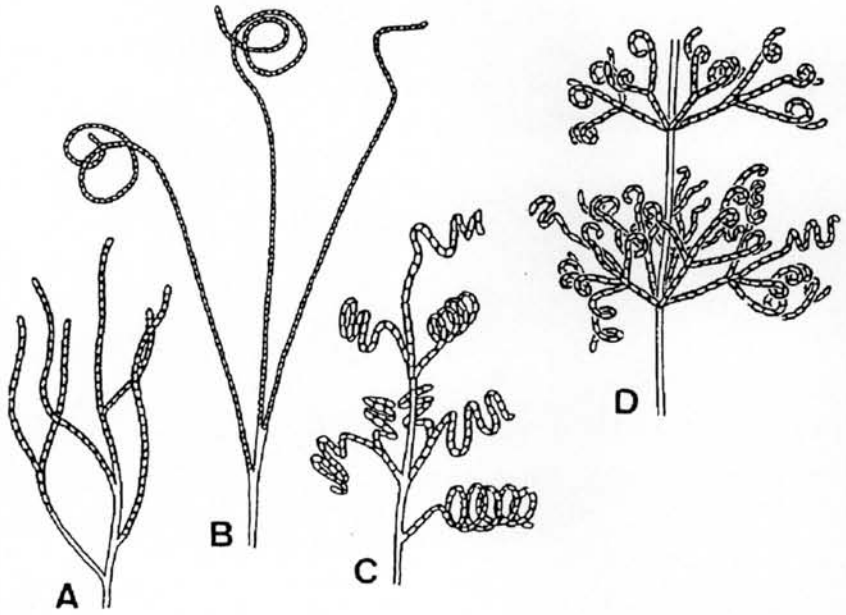


รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของ *Streptomyces* เริ่มจากสปอร์งอกบนอาหารแข็ง (step 1) แล้วสร้างสายใยอาหาร (substrate หรือ vegetative mycelium) แพร่กระจายไปบนผิวหน้าอาหาร (step 2) แล้วจึงพัฒนาสร้างเป็นสายใยอากาศ (aerial mycelium) ที่เป็น sporophores ยื่นออกจากผิวหน้าอาหาร (step 3 และ 4) สายใยอากาศเริ่มขดเป็นเกลียว (step 5) แล้วผนังกั้นถูกแบ่งออกเป็นหลายๆเซลล์ (step 6) เพื่อสร้างเป็นสายสปอร์ (step 7) แล้วหลุดออกเป็นสปอร์เดี่ยวๆ (step 8) จากนั้นเข้าสู่วงจรชีวิตอีกครั้ง
ที่มา: http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html (24/08/2007)



รูปที่ 2.2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงการแบ่งสายใยอากาศของ *Streptomyces coelicolor* A3 ที่มีการสร้างผนังกั้นภายในสายใยทำให้เกิดช่องว่างเดี่ยวๆขนาดเล็กที่เรียกว่าเซฟตา (septa) (ลูกศรชี้) เพื่อเริ่มการสร้างเป็นสปอร์ (Miyadoh, 1997)

สายสปอร์ที่กลายเป็นสายใยอากาศอาจมีความยาวมากถึง 50 สปอร์หรืออาจจะสั้นน้อยกว่า 10 สปอร์ และอาจมีพื้นผิวของสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์และการแตกกิ่งของสายสปอร์ที่แตกต่างกันออกไป ลักษณะดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้ในการระบุและจัดจำแนก *Streptomyces*



รูปที่ 2.3 รูปแบบการเรียงตัวของสปอร์และการแตกกิ่งก้านของสายสปอร์ที่แตกต่างกันของ *Streptomyces* spp.

(A) Retiflexibile
(B) Retinaculiaperti
(C) Spira
(D) Verticillati

ที่มา: Miyadoh (1997)

2.1.2 ระบบนิเวศ

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นใน ปุ๋ย ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย มนุษย์ (Nikolakopoulou, 2005) ตะกอนดินจากทะเล (Macherla และคณะ, 2005) เมล็ดข้าวสาลี (Coombs และ Franco, 2003) หญ้าแห้ง (Dalphin และคณะ, 1991) ซากสิ่งมีชีวิต หรือแม้กระทั่งภายในอาคารที่พักอาศัย แต่มักพบมากที่สุดในดิน โดยเฉพาะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารและมีความชุ่มชื้นที่พอเหมาะ สปอร์ของ *Streptomyces* สามารถมีชีวิตรอดในดินได้นาน และทนทานต่อสภาวะที่ขาดแคลนอาหารได้ดี และเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมอีกครั้ง สปอร์จะงอกเพื่อเจริญเป็นสายใยต่อไป (Rintila, 2003) ดังนั้น ดินจึงเป็นแหล่งทรัพยากรที่นิยมนำมาคัดกรองหาแบคทีเรียกลุ่มนี้ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบสายพันธุ์ใหม่ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ได้ ดังมีตัวอย่างรายงานดังนี้

Xu และคณะ (2005) ได้คัดกรอง actinomycetes จากดินในเมืองดาลี มณฑลยูนนาน ประเทศจีน เมื่อศึกษาเชิงสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิง Phylogenetic พบว่าสายพันธุ์ YIM 31724^{T} ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้ เป็นสมาชิกในจีนัส *Streptomyces* และตั้งชื่อว่า *Streptomyces roseoalbus* sp. nov.

Kim และคณะ(2006) ได้คัดกรอง actinomycetes จากดินในเมือง Cheonan สาธารณรัฐเกาหลี พบว่าสายพันธุ์ VC-46^{T} สามารถสร้างสารต้านรา และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* พบว่ามีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ไม่มีในฐานข้อมูลที่บันทึกไว้ จึงระบุได้ว่าเป็น *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่ และตั้งชื่อว่า *Streptomyces cheonanensis* sp. nov.

นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งสามารถย่อยสลายซากสัตว์ รา และพอลิเมอร์ของพืชที่ตายแล้ว ทำให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศและบทบาทอื่นๆ เช่น

Sahin (2004) ได้คัดกรอง *Streptomyces* จากดินบริเวณพื้นที่ป่า และดินบริเวณรอบรากพืช พบว่าสามารถย่อยสลาย Na-,K-, Ca- และ NH4-oxalate ซึ่งหลั่งออกมาจากรากพืชและสารอินทรย์บางชนิด เช่น malonate และ citrate เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน พร้อมๆกับทำหน้าที่ย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิตในดิน ให้กลายเป็นแร่ธาตุเพื่อให้พืชใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

Cao (2004) และคณะ ได้ศึกษา endophytic *Streptomyces* ที่อาศัยอยู่ในรากมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และทดสอบสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น ซึ่ง endophytic *Streptomyces* มีความสำคัญต่อการเจริญของพืช และยังช่วยในการดูดซึมอาหารของพืช จึงเป็นการอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis

นับได้ว่าดินเป็นแหล่งทรัพยากรที่ถูกนำมาคัดกรองหา *Streptomyces* มากที่สุด และมีค้นคว้าอย่างต่อเนื่อง

2.1.4 ความสำคัญ

Streptomyces และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตได้ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์ มีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ดังมีการรายงานโดย Ezra และคณะ (2004) ค้นพบ Coronamycin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างจาก *Streptomyces* sp. (MSU-2110) มีความสามารถต้านการเจริญของ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นราก่อโรคในมนุษย์ และมีฤทธิ์ในการทำลายปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย จึงสามารถผลิตเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคได้อย่างเฉพาะมากขึ้น Taechowisan และคณะ (2007) พบว่า *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 สามารถสร้างสารต้านการอักเสบ 4-Arylcoumarins ต่อเซลล์มาคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ นอกจากสารปฏิชีวนะแล้ว เอนไซม์หลายชนิดที่ *Streptomyces* สร้างขึ้นและมีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น *Streptomyces chromofuscus* PISC-2002 สร้าง protease PISC-2002 นำไปประยุกต์ใช้เป็นยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A/Rostock/34 (H7N7) (Angelova และคณะ, 2006)

ด้านการเกษตร *Streptomyces* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีฤทธิ์ในการต่อต้านการเจริญของศัตรูพืชดังการศึกษาของ Schwartz และคณะ (2004) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคาระห์ phosphinothricin tripeptide ที่มีคุณสมบัติในการทำลายวัชพืช ของ *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 และ ในปี ค.ศ.2005 Sahin และคณะ พบว่า *Streptomyces* 3 สายพันธุ์ คือ *S. rochei, S. lydicus* และ *S. antibioticus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างคล้าย penicillins และมีผลยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas tolaasii* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Bacterial blotch ในฟาร์มเห็ด

ด้านปศุสัตว์ Pfaller (2006) ได้ประยุกต์ใช้ Bambermycin (flavophospholipol) ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Staphylococcus* spp. และ *Enterococcus faecalis* โดยใช้เติมลงไปในอาหารสัตว์เช่น วัว หมู ไก่ และไก่งวง เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต

ด้านอุตสาหกรรม Tanabe และคณะ (2003) พบว่า *Streptomyces griseus* HUT 6037 สามารถผลิตเอนไซม์ chitosanases ซึ่งมีประโยชน์ในการเตรียม chitooligosaccharides ในอุตสาหกรรมและในปี 2003 Hiraki และคณะ ระบุว่า ε-Polylysine เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ได้จากการหมักของ *Streptomyces albulus* สามารถนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารได้อย่างปลอดภัยไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆที่สร้างได้แล้ว *Streptomyces* เองยังสามารถนำมาเป็นเชื้อผสมในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีคุณภาพ (Effective Microorganisms; EM) มีการใช้แพร่หลายในกสิกรรมและการบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีการรายงานว่า *Streptomyces* บางสปีชีส์สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และพืช *Streptomyces* ที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Streptomyces somaliensis* ทำให้เกิดโรค

Actinomycetoma ในมนุษย์ (Martin และคณะ, 2004) ส่วน *Streptomyces* ที่ก่อโรคในพืชและเป็นที่รู้จักคือ *Streptomyces scabies* ทำให้เกิดโรค Common scab ในหัวมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) รวมไปถึงรากพืช เช่น แครอท หัวผักกาด มันหวาน ทำให้ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ (Labeda และ Lyons, 1992;

2.1.5 สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* spp.

Streptomyces สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารปฏิชีวนะและมีเป้าหมายของการออกฤทธิ์ต่อจุลชีพ (ตารางที่ 2.1) ในปี ค.ศ. 1943 Waksman และคณะ ได้ค้นพบสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* เป็นครั้งแรก คือ streptothricin และอีกสองปีต่อมาได้ค้นพบ streptomycin หลังจากนั้นจึงมีการตื่นตัวในการคิดค้นวิธีการคัดกรองหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆจากจีนัส *Streptomyces* อย่างต่อเนื่อง ระหว่างปี ค.ศ. 1955 – 1962 มีการบันทึกว่าสารปฏิชีวนะ 66 เปอร์เซนต์สร้างมาจาก actinomycetes และเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Streptomyces* มากถึง 80 เปอร์เซนต์ (Kieser และคณะ, 2000)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Streptomyces* สปีชีส์ต่างๆและเป้าหมายของการออกฤทธิ์

สารปฏิชีวนะ	เป้าหมายของการออกฤทธิ์	สปีชีส์	อ้างอิง
Chloramphenicol	แบคทีเรีย	*S. venezuelae*	Bewick และคณะ (1976)
Naphtocyclinone	แบคทีเรีย	*S. arenae*	Shomura (1987)
Hygromycin	จุลินทรีย์	*S. hygroscopicus*	Omura และคณะ (1987)
Lincomycin	แบคทีเรีย	*S. lincolnensis*	Peschke และคณะ(1995)
Rapamycin	รา	*S. hygroscopicus*	Vezina และคณะ (1975)
Rapamycin	รา	*S. hygroscopicus*	Vezina และคณะ (1975)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Streptomyces* สปีชีส์ต่าง ๆและเป้าหมายของการออกฤทธิ์ (ต่อ)

สารปฏิชีวนะ	เป้าหมายของการออกฤทธิ์	สปีชีส์	อ้างอิง
Virantmycin	ไวรัส	*S. nitrosporeus*	Pearce (1990)
Streptomycin	จุลินทรีย์	*S. griseus*	Egan และคณะ (1998)
Tetracyclines	จุลินทรีย์	*S. aureofaciens* *S. rimosus*	Saleh และคณะ (1985) Hansen และคณะ (2001)
Pyrrolomycin	จุลินทรีย์	*S. fumanas*	Charan และคณะ (2005)
Resormycin	รา	*S. platensis*	Igarashi และคณะ (1997)

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Rintala (2003)

ในปัจจุบันโรคที่ติดเชื้อจากจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นปัญหาหลักต่อสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากการเพิ่มช่วงความสามารถในการก่อโรค หรือการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค จึงทำให้มีความต้องการสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำไปผลิตเป็นยารักษาการติดเชื้อก่อโรคที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายแนวโน้มการค้นพบสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *Streotomycess* ของ Watve และคณะ (2001) ระบุว่ายังคงมีสารปฏิชีวนะใหม่ ๆ ที่รอการค้นพบจากทรัพยากรที่มีอยู่ในปัจจุบัน และต้องการวิธีที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารประกอบเหล่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของ Streptomyces spp. รวมถึงพัฒนาวิธีการในการคัดกรองและศึกษาสารประกอบเหล่านี้อย่างต่อเนื่อง

2.2 การจัดจำแนก *Streptomyces* spp.

จีนัส *Streptomyces* ถูกค้นพบโดย Waksman และ Henrici ต่อมาในปี ค.ศ. 1943 จึงถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Streptomyceteceae* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์ที่เป็นกรดแอลไดอะมิโนพิมีลิกและไกลซีน (Glycine) ทำให้ถูกแยกออกมาจาก actinomycetes กลุ่มอื่นๆ จากการค้นพบความสามารถการผลิตสารปฏิชีวนะใน *Streptomyces* แบคทีเรียกลุ่มนี้จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่งผลทำให้มีสปีชีส์ที่เข้าเป็นสมาชิกในจีนัส *Streptomyces* มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น แต่มีบางสปีชีส์หรือบางสายพันธุ์ที่ซ้ำซ้อนกัน ในปี คศ.1964 จึงมีโครงการ International Streptomyces Project (ISP) เพื่อกำหนดมาตราฐานในการจัดจำแนก *Streptomyces* อย่างเป็นระบบมากขึ้น เพื่อให้มีบรรทัดฐานเดียวกัน และมุ่งหวังที่จะลดจำนวนของสปีชีส์ที่ซ้ำซ้อนกันอยู่ ผลจากโครงการดังกล่าวทำให้ *Streptomyces* มากกว่า 450 สายพันธุ์ถูกบันทึกไว้เป็น culture collection แต่อย่างไรก็ตามยังเกิดความสับสนเนื่องจากยังมีหลายสายพันธุ์ที่คัดกรองได้ไม่ตรงกับสายพันธุ์อ้างอิงที่กำหนดไว้ (Anderson และ Wellington, 2001) จึงได้มีการคิดค้นวิธีที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์กันในจีนัสนี้

2.2.1 การจัดจำแนกด้วยลักษณะฟีโนไทป์

การจัดอนุกรมวิธานของ *Streptomyces* ในยุคเริ่มแรกได้อ้างอิงถึงลักษณะทางฟีโนไทป์ และทำการจัดกลุ่มจากข้อมูลที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันเรียกวิธีการนี้ว่า numerical taxonomy ลักษณะฟีโนไทป์ที่นำมาใช้จัดจำแนกและศึกษาในขั้นต้นได้แก่

2.2.1.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

เนื่องจาก *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสายใยและสร้างสปอร์ได้ จึงทำให้มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ISP จึงได้กำหนดบรรทัดฐานในการจัดจำแนก *Streptomyces* โดยการศึกษาลักษณะด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา เช่น การเรียงตัวของสายสปอร์ พื้นผิวของสปอร์ รงควัตถุของสปอร์ รงควัตถุของสายใยอาหารและที่แทรกซึมในอาหาร ความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

2.2.1.2 ลักษณะทางชีวเคมี

การจัดจำแนก *Streptomyces* ด้วยวิธีทางชีวเคมีเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความจำเพาะมากขึ้นยกตัวอย่าง เช่น

(ก) การหาองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของ *Streptomyces* มีองค์ประกอบของกรดแอลไดอะมิโนไพมิลิก และไกลซีน โมเลกุล muramyl ที่อยู่ในส่วนของ peptidoglycans เป็น acetyl ลักษณะดังกล่าวทำให้ streptomycetes แยกออกมาจาก actinomycetes (Lechevalier และ Lechevalier, 1970)

(ข) การศึกษาความจำเพาะต่อชนิดของฟาจ

ไวรัส actinophage มีความจำเพาะต่อเจ้าบ้านสูงมาก จึงสามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกในระดับจีนัสและสปีชีส์ได้ แต่ก็อาจผิดพลาดเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างจีนัสและอาจเกิดการปนเบื้อนไปยังอุตสาหกรรมการหมักหากไม่มีการควบคุมอย่างเข้มงวด (Wellington และ Williams,1981)

(ค) การทดสอบทางอิมมูโนวิทยา

ทดสอบโดยใช้แอนตีซีรัมที่จำเพาะต่อ *Streptomyces* โดยใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay วิธีนี้มีความจำเพาะในระดับจีนัส ข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการใช้แอนติบอดี คือ ไม่สามารถนำไปใช้จัดจำแนก streptomycetes จากดินเนื่องจากสภาวะแวดล้อมและสารอาหารในดินเป็นอุปสรรคต่อการรับรู้แอนติเจน (Kirby และ Rybicki, 1986)

(ง) การวิเคราะห์โครงสร้างกรดไขมัน (fatty acid)

Streptomyces มีโครงสร้างของกรดไขมันเป็นเส้นตรง มีการแตกกิ่งแบบ iso และ anteiso ด้วยสายคาร์บอน 14-18 อะตอม Saddler และคณะ(1987) ได้ศึกษาโครงสร้างของ fatty acid methyl ester (FAME) ด้วยวิธี gas chromatography พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับจีนัส แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องการสภาวะการเจริญและวิธีการที่เป็นมาตราฐานเดียวกัน

(จ) การวิเคราะห์ whole-cell

Sanglier และคณะ (1992) ได้วิเคราะห์ pyrolysate ที่ถูกย่อยมาจาก whole-cell ด้วย mass spectrometry เรียกวิธีการนี้ว่า pyrolysis mass spectrometry (PyMS) ซึ่งพบว่าข้อมูลที่ได้มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แต่วิธีการนี้ต้องการมาตรฐานที่เข้มงวด การเปลี่ยนอาหารหรือระยะเวลาในการเลี้ยงมีผลต่อ pyrogram ของ pyrolysis

(ฉ) การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนไรโบโซม

โปรตีนไรโบโซมมีโครงสร้างและหน้าที่ที่แน่นอน และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการต่ำมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ Ochi (1995) จึงได้ใช้เทคนิค two-dimensional (2D) protein electrophoresis มาประยุกต์ใช้เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนไรโบโซม ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วในการระบุและจัดจำแนก streptomycetes

2.2.2 การจัดจำแนกด้วยลักษณะจีโนไทป์

ในยุคต่อมาวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล ถูกนำมาใช้ในการศึกษาจีโนมและระบุ หรือจัดจำแนก *Streptomyces* ในระดับจีนัส สปีชีส์และสายพันธุ์ ซึ่งมีความรวดเร็วและสะดวก และมีความจำเพาะมากกว่าการจัดจำแนกด้วยลักษณะฟีโนไทป์เพียงอย่างเดียว สามารถจัดจำแนกได้ (Park และคณะ, 2006) เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนก *Streptomyces* ยกตัวอย่างเช่น

2.2.2.1 DNA-DNA hybridization

เทคนิค DNA-DNA hybridization ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ถูกนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์ของ *Streptomyces* เป็นเทคนิคที่ใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอโดยแสดงเป็น % homology จากความสามารถเข้าคู่กันได้ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันในสภาวะต่างๆที่ถูกทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ เป็นเทคนิคที่สามารถจัดจำแนก *Streptomyces* ได้ในระดับจีนัส แต่เทคนิคนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์หากเป็นการศึกษาเพียงสายพันธุ์เดียว (Redenbach และคณะ, 1993)

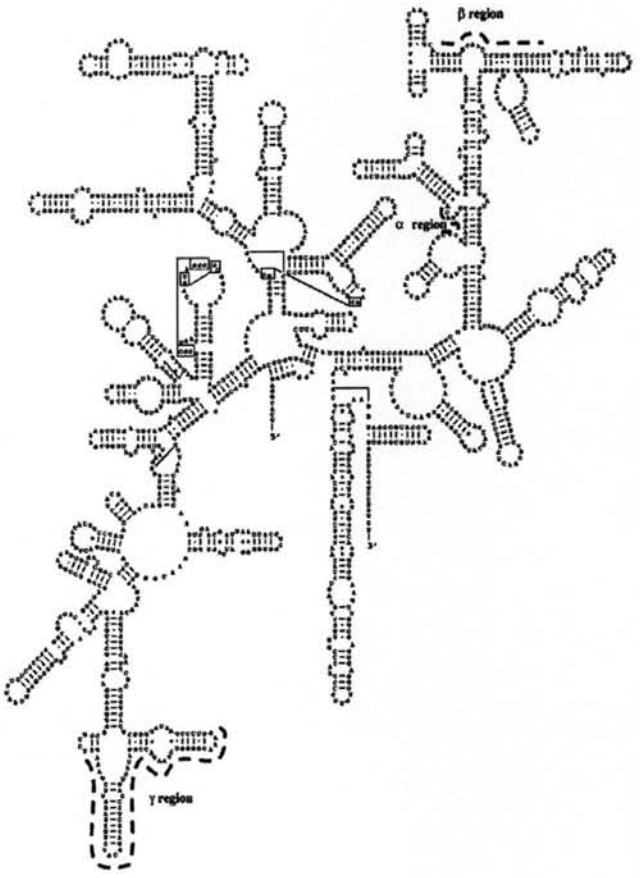
2.2.2.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมาก และสามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ บริเวณยีนเป้าหมายที่นิยมนำมาใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่

(ก) 16S rRNA (16S ribosomal RNA)

ยีน 16S *rRNA* มีบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved regions) จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธุ์ในระดับจีนัส หรือสปีชีส์ ดังนั้นในการระบุสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปจึงอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rRNA* เป็นข้อมูลสำคัญ เห็นได้จากมีข้อมูลของยีน 16S *rRNA* มากถึง 90,000 ชิ้นที่ได้มีการเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูล GenBank

เพื่อใช้เป็นแหล่งเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการระบุ (Clarridge และคณะ 2004) นอกจากมีบริเวณที่อนุรักษ์ไว้แล้วยีน 16S *rRNA* ยังมีบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (variable regions) 3 บริเวณ คือ α β และ γ (Anderson และ Wellington, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

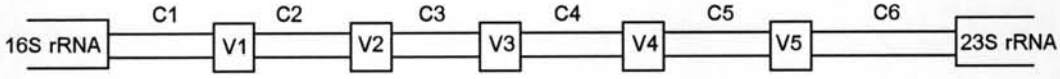


รูปที่ 2.4 โครงสร้างทุติยภูมิของ 16S *rRNA* จาก *Streptomyces coelicolor* ประกอบด้วยบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ α และ β เป็นบริเวณมีความจำเพาะในระดับจีนัส ส่วนบริเวณ γ เป็นบริเวณมีความจำเพาะในระดับสปีชีส์

Kataoka และคณะ (1997) ได้ศึกษาบริเวณ α โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้ ซึ่งมีความยาวประมาณ 120 คู่เบส ของ *Streptomyces* จำนวน 89 สายพันธุ์ พบว่าที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 172-202 มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงมาก และเมื่อสร้าง Phylogenetic Tree จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ได้ลักษณะแผนผังของ Phylogenetic Tree ที่แสดงความสัมพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ละเอียดขึ้นกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ทั้งหมด จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งมีใช้ระบุ *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว

(ข) 16S-23S intergenic spacer region

16S-23S intergenic spacer region เป็นบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16S *rRNA* และ 23S *rRNA* ซึ่งมีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น Internal transcribed spacer regions (ITS) หรือ Ribosomal intergenic spacer regions (RIS) เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการค่อนข้างสูง และเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่ายีน 16S *rRNA* ทั้งความยาวและจำนวนของ variable regions ของบริเวณนี้แตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ Hain และคณะ (1997) ได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดของบริเวณ16S-23S ITS ของ *Streptomyces albidoflavus* 4 สายพันธุ์ พบว่ามี variable regions 5 บริเวณ และ conserved regions 6 บริเวณ ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ไดอะแกรมของ 16S-23S ITS ของ *S. albidoflavus* ประกอบด้วย variable regions 5 บริเวณ (V1-V5) และ conserved regions 6 บริเวณ (C1-C6)

เช่นเดียวกับ Wenner และคณะ (2002) ซึ่งได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ของ *Streptomyces ambofaciens* พบว่ามี variable regions 4 บริเวณ และ conserved regions 5 บริเวณ ความหลากหลายของบริเวณ ITS นี้เกิดจากการแทนที่ของเบสหรือการปรากฏบล็อกของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ซึ่งความหลากหลายในแต่ละสปีชีส์นี้จึงเป็นประโยชน์ที่นำมาใช้ในการจัดจำแนก *Streptomyces* ในระดับสปีชีส์

ค.ศ. 2006 Park และ Kilbane เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบน denaturing gradient gel electrophoresis ของบริเวณ RIS และยีน 16S *rRNA* จาก *Streptomyces* 13 สายพันธุ์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากบริเวณ RIS มีจำนวนมากกว่า และมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของจีนัส *Streptomyces* ในสิ่งแวดล้อมได้

2.2.2.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เทคนิค RFLP เป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เพื่อพิจารณาและเปรียบเทียบลักษณะโมเลกุลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจะมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะเองจะตัดอย่างจำเพาะต่อตำแหน่งนี้เท่านั้น และจะตัดทุกๆตำแหน่งของตำแหน่งจำเพาะนี้ ซึ่งระยะห่างระหว่างการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีความแตกต่างกันเนื่องจากการสอดใส่ การขาดหาย หรือการสับเปลี่ยนของนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ได้ความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้มาแยกบนเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส การปรากฏหรือไม่ปรากฏของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จึงทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้เกิดความแตกต่างของภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของแต่ละสิ่งมีชีวิต และยังแสดงถึงความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ได้ RFLP จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการศึกษา ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกัน จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏในยีน *16S rRNA* และ ITS นั้นจึงเป็นประโยชน์ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค RFLP เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธุ์ของสิ่งมีชิวิต ดังการรายงานต่อไปนี้

ค.ศ. 2003 Cook และ Meyers ได้จำแนก filamentous actinomycetes โดยใช้เทคนิค RFLP ของยีน 16S *rRNA* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดคือ *Sau*3AI *Asn*I *Kpn*I และ *Sph*I พบว่า RFLP ที่ได้จาก *Streptomyces* แตกต่างจาก Actionycetes อื่น

ค.ศ. 2004 Huang และคณะ ได้คัดแยก *Streptomyces* FXJ14^{T} โดยอาศัยลักษณะทางสันฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี ร่วมกับวิธี BOX-PCR และ RFLP ของบริเวณ 16S rDNA-ITS มีความแตกต่างจาก *Streptomyces* 450 สายพันธุ์ที่ได้รับการบันทึกไว้ แล้วสร้าง Phylogenetic Tree จากบริเวณ γ ของ 16S rDNA ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 120 คู่เบส พบว่ามี phyletic line ที่แยกออกมาชัดเจน

ค.ศ. 2005 Lanoot และคณะ ได้จัดกลุ่ม *Streptomyces* และ *Kitasatospora* 463 สายพันธุ์ ด้วยลายพิมพ์ RFLP ของบริเวณ 16S-ITS ซึ่งเป็นบริเวณที่ครอบคลุม 16S *rRNA* ไปจนถึง ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI และ *Hae*III พบว่าการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rRNA*

แต่อย่างไรก็ตามการจำแนก *Streptomyces* นั้นต้องอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา องค์ประกอบทางเคมี และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลประกอบกันในการระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ดังการรายงานดังต่อไปนี้

ศึกษาด้วยวิธี DNA-DNA hybridization กับสายพันธ์อ้างอิง ทำให้ทราบว่าสายพันธ์ A25^{T} เป็นสายพันธุ์ใหม่ จึงจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* สปีชีส์ *Streptomyces scopiformis*

ค.ศ. 2002 Rhee ได้ศึกษา actinomycete สายพันธุ์ KH-614 ที่สามารถสร้าง vancomycin-resistant enterococci (VRE) ซึ่งยับยั้งการเจริญของ enterococci และพบว่ามีโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์เป็น diaminopimelic acid (DAP) ประกอบกับการศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา โดยใช้เครื่องscanning electron microscopy (SEM) พบว่า actinomycete KH-614 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Streptomyces* sp. KH-614 พบว่าเป็น *Streptomyces lydicus*.

ค.ศ. 2003 Hatano และคณะ ได้จัดกลุ่ม whorl-forming *Streptomyces* 64 สายพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะของฟีโนไทป์ ประกอบกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *gyr*B ซึ่งเป็นยีนที่แปลระหัสเป็น B subunit ของเอนไซม์ DNA gyrase จากการศึกษานี้ทำให้สามารถจัดกลุ่ม *Streptomyces* ได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ ด้วย 97% similarity และ 7 กลุ่มย่อยด้วย มากกว่า 70% similarity ของยีน *gyr*B