

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แบคทีเรียสเตรปโตไมซีท (Streptomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มของแอคติโนไมซีท (Actinomycetes) ได้รับการเสนอชื่อครั้งแรกโดย Waksman & Henrici (1943) ปัจจุบันมีสมาชิกเกือบ 749 สปีชีส์ (<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/streptomyces.html>, May 12, 2011) เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีลักษณะพิเศษกว่ากลุ่มอื่นเนื่องจากการสร้างเส้นใยทั้ง substrate mycelium และ aerial mycelium ซึ่งจะพัฒนาเป็นเส้นสายของสปอร์คล้ายรา (Flardh, 2003) มี LL-diaminopimelic acid แต่ไม่มีรูปแบบของน้ำตาลที่แน่นอนมีผนังเซลล์เป็นแบบชนิดที่หนึ่ง (cell wall type I) (Lechevalier and Lechevalier, 1970) เป็นแบคทีเรียที่มี G+C content สูงมาก คือ 69-73 mol% (Williams *et al.*, 1989; Mánfio *et al.*, 1995) แบคทีเรียกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในดินและจะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของดินทำให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Hodgson, 2000; Karoonuthaisiri *et al.*, 2005) แบคทีเรียจีนัส *Streptomyces* มีอยู่ 50% ของแอคติโนไมซีทในดิน แบคทีเรียกลุ่มนี้น่าสนใจเพราะมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนและเป็นจีนัสที่ผลิต antibiotic มากที่สุดในโลก คิดเป็น 75 – 80% ที่ผลิตเป็นการค้า (Kelemen and Buttner, 1999; Chater, 2001; Bentley *et al.*, 2002; Mellouli *et al.*, 2003; Willey *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2007) สมาชิกใหม่ ๆ ของสเตรปโตไมซีทจึงมีความสำคัญในการพาณิชย์เพราะเป็นแหล่งของ bioactive compound (Berdy, 1995; Dieter *et al.*, 2003)

Saintpierre-Bonaccio *et al.* (2004) แยกเชื้อ Actinomycete (SFOp68T) จาก ultramafic soil ซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนของโลหะหนักใน New Caledonia พบว่า ไอโซเลท SFOp68T สามารถผลิต bioactive compound ชนิดใหม่ เมื่อทำการศึกษาโดยใช้วิธี polyphasic ซึ่งอาศัยผลการศึกษาทางเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Streptomyces* และเมื่อศึกษาส่วนของ 16S rRNA gene ของไอโซเลท SFOp68T พบว่าเป็นเชื้อใหม่คือ *Streptomyces ferralitis* sp. nov.

จากการศึกษาของ Thakur *et al.* (2007) พบแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทในดิน จากพื้นที่ป่าอนุรักษ์ของรัฐ Assam และ Tripura ในอินเดีย ทั้งหมด 110 ไอโซเลท ซึ่ง 65 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial activity คิดเป็น 59.09% และอีก 47 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็น antifungal activity คิดเป็น 42.72% ซึ่งผลจากการศึกษาบ่งชี้ได้ว่าดินที่อยู่ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์เป็นแหล่งของแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antibacterial และ antifungal bioactive substance

จากการศึกษาของ Manfio *et al.* (2003) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากดิน โดยนำเชื้อที่ทำการศึกษามาจาก Atalan *et al.* (2000) จำนวน 46 ไอโซเลท ซึ่งได้แบ่งไว้เป็น 3 กลุ่ม คือ A, B และ C เมื่อทำการวิเคราะห์โดยนำส่วน 16S rDNA sequence มาเปรียบเทียบกับให้บ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทกลุ่ม A, B และ C คือ *Streptomyces sanglieri* sp. nov., *S. aureus* sp. nov. และ *S. laceyi* sp. nov ตามลำดับ

Suihko *et al.* (2007) ได้ศึกษาเพื่อแยกหาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้อากาศและราที่อยู่บนพื้นผิวของอนุสาวรีย์ historic Scottish พบแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีท 79 ไอโซเลท จาก 17 ตัวอย่าง/5 อนุสาวรีย์ ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ 16S rRNA gene พบว่าเป็น *Streptomyces microflavus* และ *Streptomyces vulgaris*

Thenmozhi and Kannabiran (2010) แยกเชื้อ marine actinomycetes จำนวน 8 สายพันธุ์ จากตะกอนดินของน้ำทะเลเลขของชายฝั่งทะเล Puducherry ประเทศอินเดีย เพื่อคัดเลือกรักษา antifungal activity ของ crude extract ที่ได้จากเชื้อ 8 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ คือ *Streptomyces* sp. VITSTK7 ที่สามารถยับยั้ง *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* และ *A. flavus*

เพชรรัตน์ และ อนันต์ (2547) ศึกษาคุณสมบัติของสาร secondary metabolites จากเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด คือ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ซึ่งทำให้เกิดโรคผลเน่าแบคทีเรีย (bacterial fruit blotch) และ *Ralstonia solanacearum* (Rals) ซึ่งทำให้เกิดโรคโรครดเหี่ยวของพริกและสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทจากทุกไอโซเลทผลิตขึ้นอาจมีหลายชนิดในกลุ่มของ aminoglycoside และ polyenes

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ได้โดยใช้เทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลควบคู่กับทางเคมี เช่น ทำการดัดแปลงโครงสร้างทางโมเลกุลของสารที่มีอยู่เดิมให้แตกต่างกันออกไปเพื่อให้ทันต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของเชื้อก่อโรคที่สามารถพัฒนาตัวเองให้ต้านต่อยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ (Donadio *et al.*, 2002) แต่ก็ปฏิเสธไม่ได้ว่าเรายังคงต้องค้นหาสารชนิดใหม่จากธรรมชาติเพื่อให้ได้สารที่มีโครงสร้างทาง

โมเลกุลแบบใหม่ที่มีคุณสมบัติใหม่ที่แตกต่างออกไปจากเดิม และจุลินทรีย์เป็นแหล่งหนึ่ง
ได้รับความสนใจเป็นอย่างสูงต่อการค้นหาสารชนิดใหม่เพื่อการพัฒนาทางเทคโนโลยี
ชีวภาพของการผลิตสารที่มีคุณค่าต่อมวลมนุษยชาติต่อไป

การศึกษาครั้งนี้ตั้งใจที่จะศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโต-
มัยซีทจากดินบริเวณหมู่เกาะตะรุเตาซึ่งตั้งอยู่ในทะเลอันดามัน จังหวัดสตูล เป็นอุทยาน
แห่งชาติทางทะเลแห่งแรกของประเทศไทย นับว่าเป็นบริเวณที่น่าสนใจมาก เนื่องจากมี
สภาพเป็นเกาะที่ยังคงความเป็นธรรมชาติสูงประกอบด้วยหมู่เกาะหลายเกาะ ที่มีป่าดงดิบ
ที่มีสภาพสมบูรณ์ ป่าชายเลน หาดทราย หิน และถ้ำ ดังนั้นจึงมีโอกาสูงที่จะได้ข้อมูลที่
น่าสนใจ รวมทั้งโอกาสพบเชื้อสเตรปโตมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ที่อาจจะผลิตสารชนิดใหม่ที่มี
ประโยชน์ต่อไป

บทตรวจเอกสาร

อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะตะรุเตา

ลักษณะภูมิประเทศ

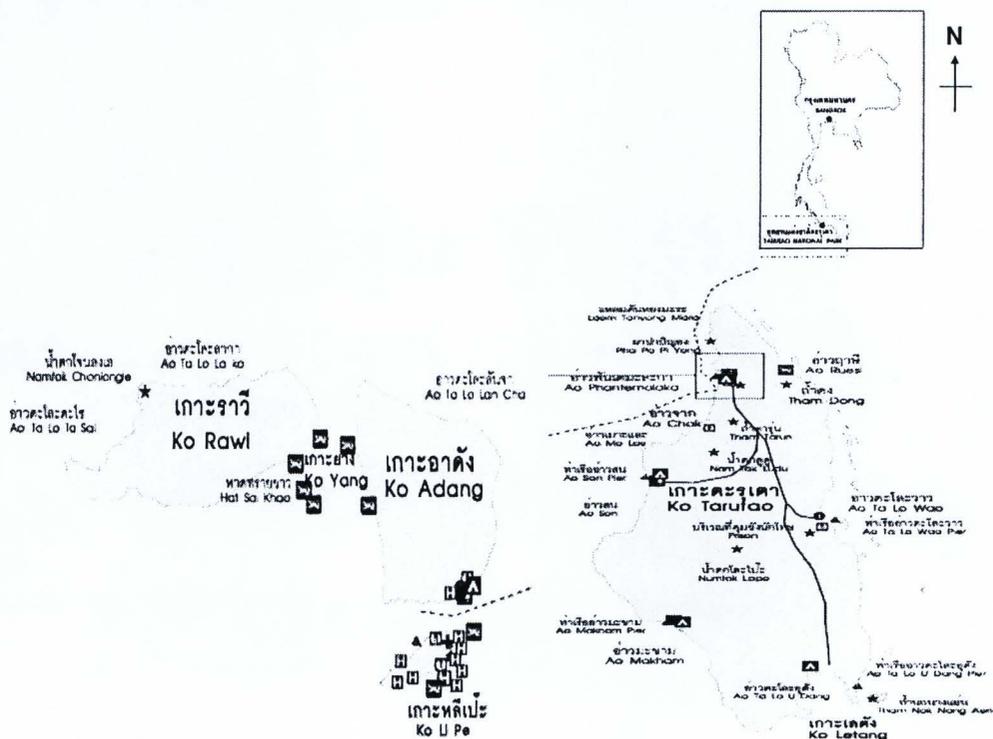
ลักษณะทางภูมิศาสตร์ทั่วไป อุทยานแห่งชาติตะรุเตา ประกอบด้วยเกาะใหญ่น้อย
51 เกาะ รวมเนื้อที่ประมาณ 1,490 ตารางกิโลเมตร มีเกาะที่มีขนาดใหญ่ 7 เกาะด้วยกัน
คือ เกาะตะรุเตา เกาะอาดัง เกาะราวี เกาะหลีเป๊ะ เกาะกลาง เกาะบาตวง และเกาะบิสสี
โดยจัดแบ่งออกเป็นหมู่เกาะใหญ่ๆ ได้ 2 หมู่เกาะ คือ หมู่เกาะ ตะรุเตา และหมู่เกาะอาดัง-
ราวี

เกาะตะรุเตา เป็นเกาะที่ใหญ่ที่สุด มีเนื้อที่ 152.01 ตารางกิโลเมตร สภาพพื้นที่
ส่วนใหญ่เป็นภูเขาที่มีความลาดชันสูง ยอดเขาที่สูงที่สุด สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 708
เมตร ส่วนชายฝั่งทางด้านตะวันตกของเกาะส่วนมากจะเป็นหน้าผาสูงชันสลับกับอ่าวและ
หาดทรายโคลนทางด้านตะวันตกจะมีหน้าผาแต่เฉพาะทางด้านเหนือบริเวณแหลมตันหยง
มะระ (ด้านหัวเกาะ) มีที่ราบอยู่เป็นหย่อมๆ ทางเทือกเขาหลังอ่าว อ่าวที่สำคัญได้แก่ อ่าว
พันเตมะละกา อ่าวสน อ่าวมะขาม อ่าวตะโลละอูดัง และอ่าวตะโลละวาว เป็นต้น อ่าวต่างๆ
เหล่านี้มีคลองและลำธารไหลผ่านออกสู่ทะเล เกาะตะรุเตาประกอบด้วยหินยุค Lower
Paleozoic Rocks ทางด้านฝั่งตะวันตกและใต้ของตัวเกาะ จะเป็นหินทรายสีน้ำตาลแดง มี
ชั้นของหินดินดานแทรกสลับ ในชุดหิน Tarutao Group มีอายุประมาณมหายุค Cambrian
ส่วนทางด้านตะวันออกและเหนือของตัวเกาะจะเป็นหน้าผาสูงชันของพวกหินปูนสีเทา-ดำ
มีลักษณะเป็นชั้นๆ ในหินชุด Thung Song Group มีอายุประมาณยุค Ordovician
เกาะอาดัง-ราวี อยู่ห่างจากเกาะตะรุเตาไปทางทิศตะวันตกประมาณ 40 กิโลเมตร ดังใน
ภาพที่ 1 เกาะอาดัง เกาะราวี เกาะบาตวง และเกาะหลีเป๊ะ เทือกเขาส่วนใหญ่เป็น

หินแกรนิต และมีหินควอร์ตไซต์และหินดินดานประกอบอยู่ประปราย เกิดในยุค Cretaceous โดยเกาะอาดังมีเนื้อที่ 29.78 ตารางกิโลเมตร สภาพพื้นที่เป็นเทือกเขาสูง ครอบคลุมเนื้อที่เกือบทั้งหมดของเกาะ ยอดเขาสูงสุดมีความสูงจากระดับน้ำทะเล 703 เมตร บริเวณโดยรอบริมเกาะเป็นหน้าผาสูงชัน มีที่ราบเฉพะบริเวณเหนือชายหาดต่างๆ เพียงเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับเกาะราวีมีเนื้อที่ 28.44 ตารางกิโลเมตร สภาพพื้นที่เป็นเทือกเขาสลับซับซ้อน มีความสูงเฉลี่ยจากระดับน้ำทะเลประมาณ 460 เมตร พื้นที่มีความลาดชันสูง มีที่ราบน้อย

คุณสมบัติของดินในเขตอุทยานแห่งชาติตะรุเตาสามารถจำแนกออกได้เป็น

1. ในบริเวณเกาะตะรุเตา คุณสมบัติของดินเป็น ดินชุดระยอง ดินชุดรีอเซาะ ดินชุดท่าจีน ดินชุดระนอง ดินสัมพัทธ์ชุดคองหงส์กับชุดระนอง และดินบริเวณที่ลาดชัน (Slope Complex Soils) ซึ่งมีวัตถุต้นกำเนิดดินเป็นหินปูนและหินทราย ลักษณะของเนื้อดินส่วนใหญ่จะเป็นดินทราย โดยเฉพาะในตอนกลางของเกาะตะรุเตา ส่วนในตอนเหนือและตะวันออกของเกาะจะเป็นดินร่วน ซึ่งมีวัตถุต้นกำเนิดดินเป็นหินปูน ดินส่วนใหญ่มีการระบายน้ำดี ยกเว้นบริเวณคลองพันเตมะละกาซึ่งดินจะมีการระบายน้ำเลวเนื่องจากบริเวณนี้ชุดดินเป็นดินชุดท่าจีนซึ่งเป็นดินเค็มที่เกิดจากวัตถุต้นกำเนิดดินถูกพัดพามาโดยน้ำเค็ม



รูปที่ 1 แผนที่เกาะตะรุเตา เกาะอาดัง และเกาะราวี

(ที่มา: <http://www.thailandholidayclub.com/index.php?topic=306.0>)

2. ในบริเวณเกาะอาดังคุณสมบัติของดินเป็น ดินซุตระนอง และดินบริเวณที่ลาดชันซึ่งมี วัตถุประสงค์กำเนิดดินเป็นหินควอร์ตไซต์ และวัตถุประสงค์กำเนิดดินเป็นหินแกรนิต ลักษณะเนื้อ ดินเป็นดินร่วน มีดินทรายทางด้านตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณแหลมตันหยงบากู และ บริเวณชายหาดต่างๆ โดยดินมีคุณสมบัติในการระบายน้ำดีถึงดีมาก
3. ในบริเวณเกาะราวี คุณสมบัติของดินเป็นดินซุตระยอง และดินบริเวณที่ลาดชันซึ่งมีวัตถุประสงค์กำเนิดดินเป็นหินควอร์ตไซต์ และวัตถุประสงค์กำเนิดดินเป็นหินแกรนิต โดยมีคุณสมบัติ ของดินโดยทั่วไปเช่นเดียวกับเกาะอาดัง

ลักษณะภูมิอากาศ

ข้อมูลภูมิอากาศของอุทยานแห่งชาติตะรุเตาในรอบปีที่ผ่านมา (มกราคม - ธันวาคม 2544) พบว่า ฝนจะตกมากที่สุดในเดือนกันยายน 594 มิลลิเมตร รองลงมาในเดือนตุลาคม 478 มิลลิเมตร และตกน้อยที่สุดในเดือนกุมภาพันธ์ 15 มิลลิเมตร ปริมาณน้ำฝนรายปี 2,908 มิลลิเมตร อุณหภูมิเฉลี่ยสูงสุด 39°C อุณหภูมิเฉลี่ยต่ำสุด 19°C โดยอุณหภูมิสูงสุดในเดือนเมษายนและต่ำสุดในเดือนมิถุนายน ในฤดูฝนเป็นช่วงที่ได้รับอิทธิพลของลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ นอกจากจะทำให้ฝนตกหนักแล้ว ท้องทะเลยังมีคลื่นลมแรง ทำให้การเดินทางไปท่องเที่ยวที่อุทยานแห่งชาติตะรุเตาในช่วงนี้ไม่ปลอดภัย สำหรับนักท่องเที่ยวจึงกำหนดการปิด-เปิดฤดูกาลท่องเที่ยวประจำปีเฉพาะบริเวณหมู่เกาะอาดัง - ราวี ดังนี้ ปิดฤดูกาลท่องเที่ยว ตั้งแต่วันที่ 16 พฤษภาคม - 15 พฤศจิกายนของทุกปีเปิดฤดูกาลท่องเที่ยวตั้งแต่วันที่ 16 พฤศจิกายน - 15 พฤษภาคมของทุกปี

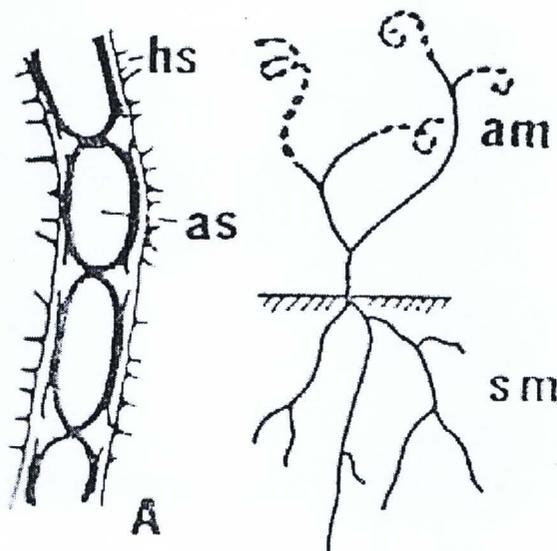
พืชพรรณ

ป่าไม้บนเกาะในอุทยานแห่งชาติตะรุเตายังคงมีอุดมสมบูรณ์อยู่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่เกาะรวมกัน สภาพป่าบนเกาะตะรุเตาและเกาะอาดัง เกาะราวีส่วนใหญ่จะเป็นป่าดิบชื้น ส่วนที่เกาะหลีเป๊ะจะเป็นป่าดิบชื้นผสมกับป่าแคระบริเวณตอนกลางของเกาะ สภาพป่าโดยรวมของอุทยานฯ สามารถจำแนกออกได้เป็น

1. ป่าดงดิบ เช่น หงอกค่าง ยางปาย หลุมพอ หมากอาดัง เคี่ยมคะนอง กระแตไต่ไม้
2. ป่าผสมผลัดใบ หรือป่าเขาหินปูน เช่น รักขาว จี๊วป่า รั้ง ตะแบกนา สลัดไต่ป่า บุกหิน
3. ป่าชายหาด เช่น เสม็ดชุน เสม็ดขาว จิกเล กระทิง หูกวาง สนทะเล ปอทะเล ลำเจียก
4. ป่าพรุ เช่น จิกนา ดินเป็ดเล็ก กระจูด หญ้าสามคม
5. ป่าชายเลน เช่น ฝาดดอกแดง ตะบูนขาว โปรงแดง โกงกางใบเล็ก ลำพู แสมทะเล
6. ไม้แคระ หรือไม้พุ่ม เช่น ประงเขา ส้านใหญ่ เอ็นอ้าน้อย หญ้าหางนกยูง เนียมนกเขา
7. ป่ารุ่มสอง เช่น กระทุ่ม หัวเขา เพกา พลับพลา หญ้ายายเภา สาบเสือ

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน ปุ๋ยหมัก นอกจากนี้ยังพบได้ในน้ำ ละอองฝุ่นในอากาศ รวมถึงในน้ำทะเล สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (aerial mycelium) และที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) ลักษณะเส้นใยของเชื้อเป็นแบบไม่มีผนังกัน (coenocytic hyphae) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ aerial mycelium จะเปลี่ยนเป็นสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (non motile spores) เรียงตัวเป็นสายลูกโซ่มีจำนวนตั้งแต่ 3-50 สปอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2 เส้นผ่าศูนย์กลางของสปอร์เท่ากับเส้นใย คือ 0.5-2.0 ไมครอน เป็นแบคทีเรียพวก aerobes ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบแต่เมื่ออายุมากขึ้น aerial mycelium จะพัฒนาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายฝุ่นผง ขนแกะ หรือผ้ากำมะหยี่ สร้างรงควัตถุได้หลายชนิด ส่วนใหญ่สร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย ไวรัส และสัตว์เซลล์เดียวได้ มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากกว่าหนึ่งชนิด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ อยู่ในช่วง 25-35°C มีบางชนิด (species) เป็นพวก psychrophilic และ thermophilic ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 6.5-8.0 ผนังเซลล์มีองค์ประกอบหลัก คือ LL-diaminopimelic acid (LL-DAP) และ glycine (Williams *et al.*, 1989)



รูปที่ 2 ลักษณะการสร้างเส้นใยของ *Streptomyces* sp. มีการสร้าง arthrospore (as) ที่มี hydrophobic sheath (hs) หุ้ม ลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่บน aerial mycelium (am) ซึ่งไม่พบใน substrate mycelium (sm) ที่มา: William *et al.*, 1989

ความสำคัญของเชื้อสเตรปโตมัยซีท

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาก เนื่องจากสามารถสร้างสาร secondary metabolites หรือ bioactive compound ได้หลายชนิด (Hu et al., 2000) ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ทั้งในลักษณะ fungicide และ bacteriocides ที่นำมาใช้ทางด้านต่างๆ ได้แก่

1. ด้านการแพทย์

ยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคในคนและสัตว์กว่า 70% ผลิตจากเชื้อสกุล *Streptomyces* (Namwat, 2001) โดยสารปฏิชีวนะที่เชื้อผลิตมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากสเตรปโตมัยซีทสปีชีส์ต่างๆ (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

สารปฏิชีวนะ	สปีชีส์	จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง
Amphotericin B	<i>S. nodosus</i>	เชื้อรา
Chloramphenicol	<i>S. venezuelae</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ริกเกตเซีย และไวรัส
Erythromycin	<i>S. erythraeus</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
Kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โปรโตซัว
Neomycin	<i>S. fradiae</i>	แบคทีเรียแกรมลบ
Oleandomycin	<i>S. antibioticus</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
Streptomycin	<i>S. griseus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Tetracycline	<i>S. viridifaciens</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Vancomycin	<i>S. orientalis</i>	แบคทีเรียแกรมบวก

Banlangnak et al. (2008) แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 71 ไอโซเลท โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ที่ดื้อยา พบว่าเชื้อ 11 ไอโซเลทสามารถยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบในวิธี streak plate แต่มีแค่ 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่ยับยั้งเชื้อดื้อยาทั้ง 4 สายพันธุ์ และคัดเลือกเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ F29, G7, H6 และ M11 นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้มีการผลิตสารปฏิชีวนะ แล้วทำการสกัดหยาบโดยใช้ ethyl acetate

แล้วทดสอบโดยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท F29 ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.125, 32 และ 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. ด้านอุตสาหกรรม

มีการนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ เช่น chitinase, cellulase, amylase, protease, xylanases, lipases และ glucoisomerase

Lumyong *et al.* (1996) ได้แยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท นำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่ามี 54 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร chitin agar จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลวที่ ball-milled chitin 1% ซึ่ง chitinase activity ตรวจวัดจากปริมาณ N-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากการใช้ swollen chitin 1% เป็นสับสเตรทบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจพบ chitinase activity จำนวน 12 ไอโซเลท โดยที่ไอโซเลท CS10 ให้ chitinase activity สูงที่สุด เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็น *Streptomyces sp.* CS10

Nascimento *et al.* (2003) แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 162 ไอโซเลท จากดินประเทศบราซิลเพื่อคัดเลือกหา xylanase activity โดยพบว่าเชื้อไอโซเลท AMT-3 ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces malaysiensis* เป็นเชื้อที่ให้ clear zone ในอาหาร xylan ได้กว้างที่สุด

3. ด้านการเกษตร

Yuan and Crawford (1995) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพด พบว่า *S. lydicus* WYEC108 มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยสร้างสาร extracellular antifungal metabolite ซึ่งสามารถยับยั้งการงอกของ oospore ของเชื้อรา *Pythium ultimum* และทำลายผนังเซลล์ของเส้นใยได้

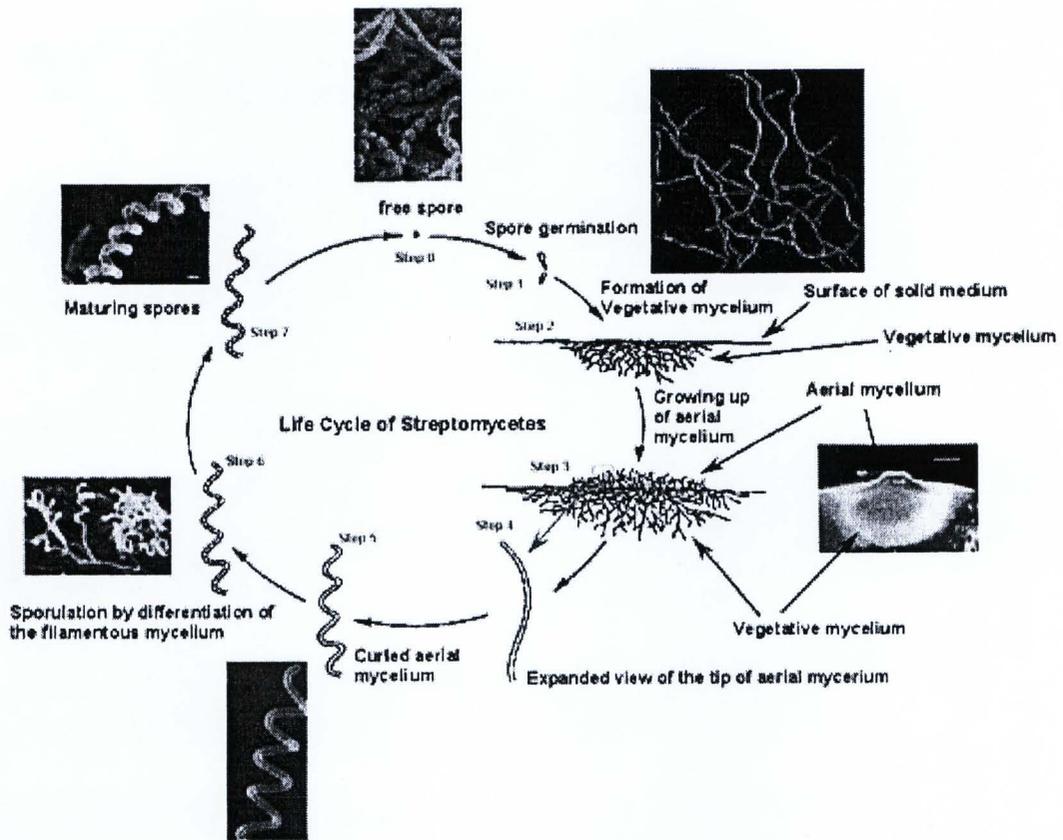
Abd-Allah (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของ *S. plicatus* ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยแยกเชื้อจากดินได้ 372 ไอโซเลท ทำการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่าเชื้อ *S. plicatus* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารไคติน ซูโครส และแคลเซียม เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ การยืดตัวของ germ tube และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria alternate*

และ *Verticillium alboatum* เชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว stem canker และโรคเหี่ยว *Verticillium* ของมะเขือเทศได้

นิเวศวิทยาของ Streptomyces

Streptomyces เป็นแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่มีการแพร่กระจายทั่วไปทั้งในแหล่งที่อยู่บนบกและในน้ำ ส่วนมากแล้วเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ (Saprophytes) แต่บางชนิดก็เป็นพาราไซต์ในพืชและสัตว์ วงจรชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* เริ่มจากสปอร์เจริญเป็นเส้นใยแทรกลงไปใ้อาหารแข็ง เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (vegetative mycelium) จากนั้นมีการเจริญของเส้นใยในแนวตั้งขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และกลายมาเป็นเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) เส้นใยเหนือผิวอาหารเริ่มขดเป็นเกลียวและมีการสร้างผนังกันจนได้เป็นเส้นสายของสปอร์ ดังรูปที่ 3 สปอร์ของ *Streptomyces* สามารถทนทานอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเส้นใย เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่หนากว่า และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มากกว่า เนื่องจากมีเยื่อหุ้มชั้นนอกของผนังสปอร์อีกชั้นหนึ่ง นอกจากนี้ผิวสปอร์ของ *Streptomyces* โดยมากแล้วมีประจุเป็นลบ ยกเว้นเมื่ออยู่ในที่มี pH ที่ค่อนข้างต่ำ และโดยทั่วไปแล้วสปอร์ก็จะทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่าเส้นใย

แม้ว่า *Streptomyces* จะถูกพิจารณาให้เป็นพวก strict aerobes แต่มันสามารถเจริญได้ในดินที่ปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำๆ ได้ แต่ต้องมีปริมาณ CO_2 ไม่เกิน 10% ในดินที่แห้งจะมี *Streptomyces* น้อยและปริมาณจะลดลงเห็นได้ชัดเมื่อแรงดึงผิวของความชื้นในดิน มีค่าสูงกว่า pF 4.0 และเนื่องจาก *Streptomyces* ส่วนมากแล้วเป็นพวก mesophiles ดังนั้นในดินเขตอบอุ่นจึงไม่น่าจะเป็นสภาวะที่เจริญได้อย่างเหมาะสม mesophilic *Streptomyces* นั้นมีหลายระดับที่แตกต่างกันขึ้นกับระยะของการเจริญและชนิดอาหารที่จะย่อยสลายด้วย แต่สายพันธุ์ที่เป็น obligate หรือ facultative thermophile สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C ขึ้นไป ในขณะที่ *Streptomyces albus* ซึ่งเป็น mesophilic สามารถเจริญได้ที่ 45°C



รูปที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* โดยสปอร์เริ่มเจริญเป็นเส้นใยแทรก ลงไปในอาหารแข็ง เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (vegetative mycelium; step 0-2) จากนั้น มีการเจริญของเส้นใยในแนวตั้งขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และกลายมาเป็นเส้นใยเหนือผิว อาหาร (aerial mycelium; step 3-4) เส้นใยเหนือผิวอาหารเริ่มขดเป็นเกลียว (step 5) และมีการสร้างผนังกัน (step 6) จนได้เป็นเส้นสายของสปอร์ (step 7) (ที่มา: http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html)

แม้ว่า *Streptomyces* เจริญได้ในอาหารส่วนมาก แต่ถ้าต้องการให้มีการสร้าง สปอร์ด้วยนั้น ต้องเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนค่อนข้างสูง (Kutzner, 1981) อาหารที่นิยมใช้ ได้แก่ glucose yeast extract-malt extract, oatmeal, inorganic salt-starch และ glycerol-asparagine agar ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในโครงการ ศึกษา *Streptomyces* นานาชาติ (The International Streptomyces Project, ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966) ส่วนมาก *Streptomyces* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ ระหว่าง 10-37°C ดังนั้นจึงเป็นพวก mesophiles อย่างไรก็ตามหลายชนิดสามารถ เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37°C แม้ว่าส่วนใหญ่ *Streptomyces* เป็นพวกที่ทนอุณหภูมิ

สูง (thermotolerant) มากกว่าที่จะเป็นพวกชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic) และมีน้อยชนิดมากที่เป็น thermophilic และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 34°C คือ *Streptomyces thermoflavus*, *S. thermonitrificans* และ *S. thermovulgaris* และที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง $45-55^{\circ}\text{C}$ (Kutzner, 1981) ก็มีจำนวนมาก และพบน้อยมากที่เจริญได้ช้าๆ ที่ 4°C (Williams *et al.*, 1983)

แอกติโนมัยซีทในกลุ่ม Streptomyces โดยทั่วไปแล้วต้องการน้ำสำหรับการเจริญ และไม่สามารถเจริญในที่ที่มีค่าความดันออสโมซิสสูงๆ ได้ ดังนั้นการเจริญในดินจึงค่อนข้างมีความจำกัดอย่างมาก เมื่อแรงดึงผิวของน้ำ (water tensions) มีค่าสูงกว่า pF 4.0 และในการเลี้ยงบนจานอาหารจะไม่สามารถเจริญได้ถ้าความชื้นน้อยเกินไป ดังนั้นการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เจริญที่ค่า a_w ต่ำกว่า 0.92 (Fermor and Eggins, 1980) บางไอโซเลทที่ได้จากดินสามารถเจริญในอาหารที่มีค่าความดันออสโมซิสที่สูงได้ (Wong and Griffin, 1974) และเชื้อส่วนน้อยที่เจริญใน NaCl 13 % (w/v) (Tresner *et al.*, 1968) Streptomyces หลายชนิดสามารถดำรงชีวิตในภาวะที่แห้งมากๆ ได้โดยการสร้างอาร์โทรสปอร์ที่ทนทานต่อสภาพที่แห้งและขาดน้ำได้ ซึ่งตามปกติความทนทานของอาร์โทรสปอร์จะมีมากกว่า vegetative mycelium (Williams *et al.*, 1972) ในเรื่องนี้ และโดยทั่วไปแล้ว Streptomyces เป็นพวก obligate aerobes ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจึงต้องเลี้ยงในที่ที่มีอากาศเสมอ และ Streptomyces มักชอบเจริญในอาหารที่มีค่าของ pH ที่เป็นกลาง แต่ก็สามารถเจริญได้ระหว่างค่า pH 5.0-9.0 โดยที่มีช่วง pH ที่เหมาะสมใกล้เคียงกับ pH 7.0 จะมีบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่ pH เป็นกรด เช่น pH 4.3 (Williams *et al.*, 1983) ซึ่ง Streptomyces เหล่านี้มักแยกได้จากดินที่เป็นกรด (Williams *et al.*, 1971; Khan and Williams, 1975; Hagedorn, 1976) ถ้าเป็นพวกที่ชอบความเป็นกรดก็จะสามารถเจริญได้ตีระหว่าง pH 3.5-6.5 โดยมี pH ช่วงที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 Streptomyces พวกที่ชอบความเป็นด่างมีเป็นส่วนน้อย แต่ก็มี การรายงานพบว่าพบบ้างประมาณ 20 สายพันธุ์ที่ชอบเจริญที่ค่า pH อยู่ระหว่าง 9.0-9.5 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่นโดย Mikami *et al.* ในปี 1982

ในห้องทดลอง Streptomyces สามารถสร้างเอนไซม์ได้ดี และในธรรมชาติก็มีบทบาทสำคัญสามารถย่อยสลายซากพืชและซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ดี มันสามารถย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) Streptomyces หลายชนิดสามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของหญ้า ไม้เนื้ออ่อน และไม้เนื้อแข็ง รวมทั้งสามารถย่อยสลายไคติน เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เคอราติน เพกติน รวมทั้งผนังเซลล์ของรา ยาฆ่าวัชพืช พลาสติก สารพวกโพลีฟีนอลิก แทนนิน

และกรดฮิวมิก นอกจากนี้ Streptomyces ยังสามารถสร้างเมลานินซึ่งเป็นรงควัตถุคล้ายๆ กรดฮิวมิก ซึ่งอาจช่วยให้มีการสร้างฮิวมัสในดินด้วย

ด้วยคุณสมบัติที่สามารถสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อราได้ Streptomyces ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ รากพืชจึงสามารถปกป้องรากให้ปลอดภัยจากการทำลายของเชื้อราได้ แต่ก็ยังมีความเห็นที่ตรงข้ามว่า Streptomyces นั้นไม่สร้างสารแอนติไบโอติกเมื่ออยู่ในดินตามธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามมีหลักฐานว่า Streptomyces มีส่วนช่วยควบคุมโรคเชื้อราได้เมื่อนำเมล็ดพืชหรือต้นอ่อนมาเติมด้วยเชื้อ Streptomyces ลงไปก่อนที่จะนำไปปลูก (Sing and Mehrotra, 1980; Rothrock and Gottlieb, 1981)

ใน Streptomyces พบว่ามีการสร้างสาร geosmin (*tran*-1, 10-dimethyl-*trans*-9decalol) และ methylisoborneol) ซึ่งเป็นสารสร้างกลิ่นคล้ายดินอับชื้นหรือกลิ่นดินและสารประกอบเหล่านี้จะไม่ถูกสร้างขึ้นในสปอร์ของ Streptomyces แต่จะเป็นสารเมตาบอไลต์อันดับสองที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อเส้นใยมีการเจริญแล้ว ดังนั้นหลังจากฝนตกใหม่ๆ เราจึงมักจะได้กลิ่นอับชื้นที่ Streptomyces เหล่านี้ที่อยู่ในดินสร้างขึ้น

อาหารสำหรับการเจริญของ *Streptomyces*

Streptomyces เป็น chemoorganotrophic, non – fastidious ที่ต้องการเพียงแหล่งคาร์บอน สารอนินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจน และเกลือเพื่อใช้ในการเจริญ (Kutzner, 1981) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ต้องการพวกวิตามินหรือปัจจัยสำหรับการเจริญ (growth factors) ดังนั้นเชื้อสามารถเจริญบน simple media หรือ defined media ใดๆก็ตามรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนถูกใช้ในการจัดจำแนก (Shirling and Gottlieb, 1966; Pridham and Tresner, 1974; Williams *et al.*, 1983) แหล่งคาร์บอน ได้แก่ cellobiose, glucose, glycerol, D – mannose และ trehalose แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ammonium, L – arginine, L – asparagine และ nitrate บางเชื้อใช้ organic acid, inulin, xylitol, L – methionine หรือ nitrite ซึ่งส่วนใหญ่สามารถย่อย esculin, casein, gelatin และ hypoxanthine

อย่างไรก็ตามเนื่องจาก *Streptomyces* มีหลายชนิดจึงมีความหลากหลายในความต้องการสารอาหาร ดังนั้นจึงเป็นการยากเหมือนกันที่จะสรุปว่าอาหารที่เหมาะสมในการแยกเชื้อต่างๆ ไปสำหรับ Streptomyces ควรจะมีอะไรเป็นองค์ประกอบอยู่บ้าง จึงทำให้ยากที่จะสร้างเป็นสูตรอาหารที่มีความจำเพาะสำหรับ Streptomyces และพวกแบคทีเรีย หรือเชื้อราอื่นๆ จะไม่เจริญขึ้นมาด้วย เนื่องจากทั้งรา และแบคทีเรียเหล่านี้เจริญเร็วกว่า Streptomyces ดังนั้นในการเตรียมอาหารสำหรับการแยกเชื้อ ส่วนมากก็



จะเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นลงไปพร้อมกับอาหารช่วยให้ Streptomyces มีการเจริญ

นอกจากนี้ก็ยังต้องมีวิธีการแยกเชื้อที่ช่วยกำจัดแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ต้องการออกไปด้วย เช่น นำน้ำตัวอย่างดินมาทำพรีทรีทเมนต์ (pre-treatment) ก่อน เช่น นำมาเจือจางในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วเขย่า หรือนำดินมาอบด้วยความร้อน หรืออาจต้องใช้เครื่องอัลตราโซนิกช่วยด้วย

อย่างไรก็ตามในองค์ประกอบของอาหารสำหรับการแยกเชื้อ มักจะต้องเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราลงไป เช่น การเติมสาร nystatin หรือ cycloheximide ในปริมาณ 50-100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีผลต่อการยับยั้ง Streptomyces และควรปรับ pH ของอาหารให้เป็นกลาง เนื่องจาก Streptomyces เป็นพวกที่ชอบ pH เป็นกลาง นอกจากนี้ต้องการคัดเลือกหาพวกที่ชอบความเป็นกรด ก็จะปรับ pH ให้อยู่ประมาณ 4.5

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อมักใช้ที่ 25-30°C โดยบ่มเชื้อไว้ประมาณ 14 วัน ถ้าต้องการแยกเชื้อหา Streptomyces ที่ทนอุณหภูมิสูงก็จะบ่มเชื้อไว้ที่ 40°C และถ้าต้องการคัดเลือกเฉพาะที่ชอบอุณหภูมิสูง ก็บ่มเชื้อไว้ที่ 45-55°C เป็นเวลา 5 วัน การแยกความแตกต่างระหว่าง Streptomyces กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และเชื้อราทำได้โดยส่งด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบเส้นใยซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของเชื้อรา และรงควัตถุที่สร้างขึ้นจะทำให้โคโลนีของ Streptomyces มีลักษณะด้าน มีสีต่างๆ และทึบแสงต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียทั่วไป

คุณลักษณะเฉพาะของเชื้อ Streptomyces

การศึกษาลักษณะเด่นของ Streptomyces โดยใช้ลักษณะที่สามารถมองเห็นได้ เช่น การผลิตเม็ดสีของสปอร์ การสร้าง substrate mycelium และการผลิต diffusible exopigments รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของ aerial mycelium ซึ่งการสร้างเม็ดสีถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่นำมาใช้ในการพิจารณามีความแปรปรวนมากสำหรับใช้ในการจัดจำแนก Spore mass color ใช้ในการศึกษากันมากในการจัดอนุกรมวิธานของ Streptomyces เชื้อถูกตั้งขึ้นเป็นหมวดหมู่ (sections), ชุด (series) และกลุ่มสปีชีส์ (species groups) บนพื้นฐานของสีสปอร์ (Burkholder *et al.*, 1954; Flaig and Kutzner, 1954, 1960; Hesseltine *et al.*, 1954; Gauze *et al.*, 1957; Ettliger *et al.*, 1958; Pridham *et al.*, 1958; Krasil'nikov, 1960) ซึ่ง Streptomyces species แบ่งออกเป็นชุด (series) ได้ 7 สี คือ ฟ้ำ เทา เขียว แดง ม่วง ขาว และเหลือง แต่เนื่องจาก spore mass color ถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์ใน

การพิจารณาแต่ในการวัดผลอาจเกิดปัญหาได้ (Kutzner, 1981) ซึ่งสีสามารถได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น อาหาร สภาพการเจริญ และอายุของเชื้อ บางครั้งสีที่ได้ก็ไม่ตรงตามประเภทที่ตั้งขึ้น หลายการทดลองทำมาตรฐานเพื่อจัดกลุ่มเม็ดสีโดยใช้ selected chips จาก color manuals (Flaig and Kutzner, 1954, 1960; Tresner and Backus, 1963; Prauser, 1964)

สีของ substrate mycelium และ soluble pigment เหมาะที่จะใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกโดยสีที่ผลิต ได้แก่ สีฟ้า สีเขียวเข้ม สีแดง และสีม่วง ซึ่ง substrate mycelium color ถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการแบ่งกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย streptomycetes ในขั้นต้น (Baldacci *et al.*, 1954; Baldacci, 1958, 1961; Krasil'nikov *et al.*, 1961) แต่การผลิตเม็ดสีบ่อยครั้งที่ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของอาหาร อุณหภูมิ พีเอช และอายุของเชื้อ

Diffusible pigment และ pH sensitivity ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนก (Waksman and Curtis, 1916; Jensen, 1930; Shirling and Gottlieb, 1970) แต่สีที่ได้จะคล้ายกัน (Krasil'nikov, 1970; Kutzner, 1981) เชื้อแบคทีเรีย streptomycetes ผลิต anthracyclinglycoside, diazaindophenol, naphthoquinone, phenoxazinone และ prodigiosin pigment (Kutzner, 1981)

ถึงอย่างไรก็ยังยากในการวัดสีของ aerial spore mass, substrate mycelium และ diffusible pigments ที่ใช้ในการอธิบาย *Streptomyces* species ใน ISP (Shirling and Gottlieb, 1966) ในการวัดสีต้องใช้อาหารและวิธีการทดสอบที่มีมาตรฐาน แต่บางครั้ง aerial spore color วัดโดยใช้ Tresner and Backus (1963) color chart ในบางกรณี aerial spore mass color แตกต่างกันบน different media (Szabo and Marton, 1976) ซึ่ง diagnostic value ของ spore color มีข้อจำกัดเพราะเชื้อที่ทดสอบเกินครึ่งที่อยู่ใน gray series จึงได้มีการวัด pH sensitivity ของ diffusible pigments แต่ไม่ได้อธิบายไว้ใน substrate mycelium color (Shirling and Gottlieb, 1970) ซึ่งเป็นไปได้ที่จะวิเคราะห์ทางเคมีของ spore, mycelial และ diffusible pigments นำไปสู่ความเข้าใจของการผลิตเม็ดสี

การจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* spp.

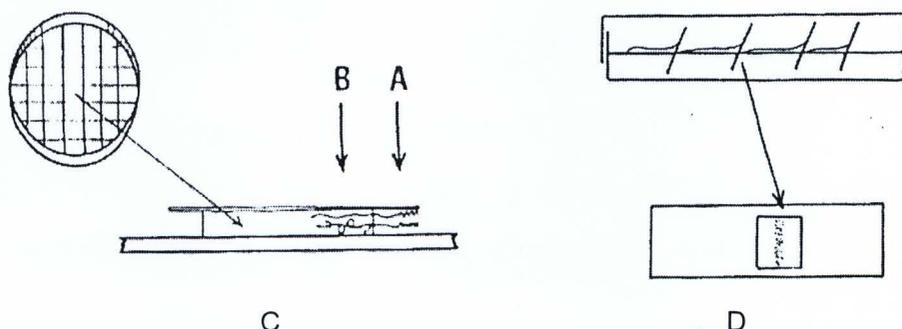
เชื้อ *Streptomyces* spp. จัดระเบียบอนุกรมวิธาน (William *et al.*, 1989) ได้ดังนี้

Superkingdom :	Bacteria
Kingdom :	Eubacteria
Phylum :	Firmicutes
Class :	Actinobacteria
Subclass :	Actinobacteridae
Order :	Actinomycetales
Suborder :	Streptomycineae
Family :	Streptomycetaceae
Genus :	<i>Streptomyces</i>

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. ซึ่งอาศัยคุณสมบัติที่มีการศึกษา ได้แก่

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นการตรวจสอบลักษณะของโคโลนี และสายสปอร์ ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ถึงระดับสกุล เช่น สีของกลุ่มสปอร์ (aerial mycelium) เมื่อเจริญเต็มที่ที่สามารถแบ่งออกได้ 7 สี ได้แก่ สีขาว สีเทา สีเหลือง สีแดง สีน้ำเงิน สีเขียว และ สีม่วง รวมถึงสีของ substrate mycelium และการไม่แตกหักของเส้นใย ลักษณะของสายสปอร์ แบ่งได้เป็นแบบ rectus flexibilis สายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ และ spiral สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว วงกลมปลายเปิด รูปขอ หรือขดซ้อน โดยการศึกษาลักษณะของสายสปอร์ ทำโดยวิธี Slide culture ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การทำ Slide culture โดยวิธี thin agar block (C) เมื่อเลี้ยงเชื้อจะเกิด substrate mycelium (B) ในอาหาร และเห็น aerial mycelium (A) ติดบนสไลด์; วิธี Inclined coverslips (D) ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแล้ววาง coverslips ที่ฆ่าเชื้อลงไป

2. คุณสมบัติด้านสรีรวิทยา

เป็นการศึกษากระบวนการ metabolism ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียได้ ได้แก่ การเจริญบนแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ การใช้แหล่งไนโตรเจน การย่อยแป้ง การรีดิวซ์ไนเตรท และการสร้างเอนไซม์ chitinase เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์ที่ใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ *Streptomyces*

Characters	Characters states
1. Spore chain morphology	Rectiflexibiles, retinaculiaperti and spirales.
2. Spore surface ornamentation	Smooth, warty, spiny, hairy and rugose.
3. Other morphological features	Fragmentation of substrate mycelium. Sclerotia formation. Sporulation on substrate mycelium.
4. Color of spore mass	Blue, gray, green, red, violet, white and yellow.
5. Pigmentation of substrate mycelium (colony reverse)	Yellow-brown (no distinctive pigment), blue, Green, red-orange and violet. (pH sensitivity of pigments)
6. Diffusible pigments	Yellow-brown, blue, green, red-orange and violet. (pH sensitivity of pigments)
7. Melanin pigment production	On peptone-yeast extract-iron agar and tyrosine agar
8. Antimicrobial activity	Activity against <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Saccharomyces murinus</i> , <i>Streptomyces murinus</i>
9. Enzyme activity	Lecithinase, lipolysis, proteolysis (on egg-yolk medium) Hydrolysis of chitin, hippurate and pectin Nitrate reduction, Hydrogensulfide production β -Lactamase and β -Lactamase inhibitor production
10. Degradation activity	Adenine, allantoin, arbutin, casein, DNA, elastin, esculin, gelatin, guanine, hypoxanthine and xylan.
11. Resistance to antibiotics (μg / ml)	Cephaloridine (100), neomycin (50), oleandomycin (100),

	penicillin G (10 i.u.), rifampicin (50), streptomycin (100), tobramycin (50), vancomycin (50)
12. Growth temperature and pH	4, 10, 37, 45° C and 4.3 , 7
13. Growth in the presence of inhibitory compounds (% w/v)	Crystal violet (0.0001), Phenol (0.1), Phenylethanol (0.1 , 0.3), Potassium tellurite (0.001 , 0.01), Sodium azide (0.01 , 0.02), Sodium chloride (4 , 7 , 10 , 13), Thallous acetate (0.001 , 0.01)
14. Use of nitrogen sources (0.1% w/v)	DL- α -amino-n-butyric acid, L-arginine, L-cysteine, L-histidine, L-hydroxyproline, L- methionine, L-phenylalanine, L-serine, L-threonine and L-valine.
15. Use of carbon sources (1.0% w/v)	Adonitol, L-arabinose, cellobiose, dextran, D-fructose, D-galactose, meso-inositol, inulin, D-lactose, mannitol, D-mannose, D-melezitose, D-melibiose, raffinose, L-rhamnose, salicin, sucrose, trehalose, xylitol and D-xylose.

ที่มา: Williams *et al.*, 1989

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์

นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท์ยังประกอบด้วย มิวโคเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วย n-acetyl muramic acid และ diaminopimelic acid, glutamic acid, glycine และ alanine (Davis, 1973) ซึ่ง Cell wall และ whole sugar pattern จัดจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างกันของส่วนประกอบทางเคมีในเซลล์ โดยทำให้เซลล์แตกแล้วตรวจวิเคราะห์โดยวิธี thin layer chromatography ซึ่งสามารถจำแนกได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบบแผนกรดอะมิโน และน้ำตาลของเชื้อแอกติโนมัยซีท (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

องค์ประกอบของเปปติโดไกลแคน	แบบแผนกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์			
	I	II	III	IV*
- ออพติคัลไอโซเมอร์ของกรดอะมิโนพิมี ลิก - มีไกลซีนเชื่อมระหว่างเตตราเปปไทด์	LL +	meso +	meso -	meso -
น้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด	แบบแผนน้ำตาล			
	A	B	C	D
อะราบิโนส	+	-	-	+
กาแล็กโทส	+	-	-	-
ไซโลส	-	-	-	+
มาดูโรส	-	+	-	-

* Type IV ต่างจาก Type III โดยมีน้ำตาลอะราบิโนส และกาแล็กโทสที่ผนังเซลล์ของ Type IV

4. คุณสมบัติทางด้านชีวโมเลกุล

การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไป อาศัยคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาเป็นหลัก ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลได้มีความก้าวหน้า และเข้ามามีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relatedness) ดังนั้นการจำแนกแบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ มีเทคนิคทางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องหลายเทคนิค ซึ่งมีความเหมาะสมกับการจำแนกในระดับต่างๆ ตั้งแต่วงศ์ (family) จนถึงสายพันธุ์ (strains) ได้แตกต่างกัน เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมทั้งหมด สามารถจำแนกได้ถึงระดับสายพันธุ์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน 16S rRNA gene สามารถจำแนกได้ถึงระดับ subspecies เท่านั้น

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวโมเลกุล ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของยีน (gene) ซึ่งช่วยสนับสนุนลักษณะที่แสดงออกทางภายนอก (phenotype) ของเชื้อ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การจัดจำแนกเชื้อในวงศ์ (family) Streptomycetaceae โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วน Ribosomal RNA gene เช่น ส่วน 16S rRNA gene ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน และส่วนที่ไม่ใช่รหัสซึ่ง internal transcribed spaces อยู่ระหว่างยีน เช่น 16-23S rDNA ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนดังกล่าวโดยไพรเมอร์ 2 คู่ ดังตารางที่ 4 สามารถบ่งบอกได้ตั้งแต่ระดับวงศ์จนถึงสายพันธุ์ (Huddleston *et al.*, 1997) จากการรายงานของ Chun *et al.* (1997) ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA สามารถแยกเชื้อในสกุล *Kitasatosporia* และ *Streptoverticillium* ออกจากสกุล *Streptomyces* และแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อ *Streptomyces* ได้ ทำนองเดียวกับรายงานของ Song *et al.* (2004) ได้ศึกษาเชื้อ *Streptomyces* ที่แยกได้จากแผลสะเก็ดที่เกิดจากโรค potato scab ในประเทศเกาหลี พบว่าจากการวิเคราะห์การใช้ 16S rRNA gene สามารถจำแนกได้เป็น *S. scabiei* และ *S. acidiscabieies* แต่ไอโซเลท KJ061 มีความคล้ายระหว่าง *S. reticuliscabiei* และ *S. turgidiscabies* อย่างไรก็ตามการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16-23S rDNA ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ *Streptomyces* ได้ ทำนองเดียวกับ Rintala (2003) รายงานว่าการนำลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA มาสนับสนุนลักษณะทาง phenotype ทำให้การจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* spp. มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในขณะที่การหาลำดับเบสทั้งโครโมโซม สามารถระบุชนิดของเชื้อ *S. lividans* และ *S. avermitilis* ได้ นอกจากนี้ยังสามารถบ่งบอกตำแหน่งของยีนที่ผลิตสารปฏิชีวนะ avermectin หรือยีนที่ควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ *S. coelicolor* A3(2) ส่วนการจัดจำแนกเชื้อกลุ่ม acidophilic actinomycetes ที่แยกได้จากดินโดย Kim *et al.* (2004) ซึ่งอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene พบว่าเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ JL164 มีความใกล้เคียงกับ *S. mirabilis* และสายพันธุ์ CN723^T ระบุได้เป็น *S. yeovhonensis* และยังมีรายงานของ Sembiring *et al.* (2000) ทำการจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* ที่แยกได้จากบริเวณรากของต้น Albiza (*Paraserianthes falcataria*) โดยใช้ส่วน 16S rRNA gene ร่วมกับคุณลักษณะอื่นๆ สามารถระบุชนิดได้เป็น *S. violaceusniger* และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rDNA ของเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งแยกได้จากดิน (Mikko Metsa-Ketela *et al.*, 2002) ร่วมกับคุณสมบัติอื่นๆ สามารถจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. (Chun *et al.*, 1997)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างนิวคลีโอไทด์ของ universal primer ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่เกี่ยวข้องกับ 16S rRNA gene

Name of primer	Nucleotide (5'-3')	References
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
F8	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Gee <i>et al.</i> , 2003
R1492	ACCTTGTTACGACTT	
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	Song <i>et al.</i> , 2004
rF2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
F1	AGAGTTTGATCITGGCTCAG	Cook, 2003
R5	AGCCITACCTTGTTACGACTT	
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Shrout <i>et al.</i> , 2005
1525R	AGGAGGTGATCCAGCC	

หมายเหตุ I= inosine

หรือต่ำกว่า ปัจจุบันจึงได้ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาช่วยในการศึกษาถึงสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และแบคทีเรียก็ได้เกิดแนวทางใหม่สำหรับการจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย โดยการจัดจำแนกแบบระบบคุณสมบัติแบบผสมผสาน (polyphasic taxonomy) ซึ่งเป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ข้อมูลทางสารพันธุกรรม และข้อมูลของสายวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อระบุชนิด ซึ่งจะทำให้เกิดการจัดจำแนกที่ใกล้เคียงและสมบูรณ์มากขึ้น เนื่องจากในการจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* ที่เทียบเคียงกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition อาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เป็นหลักแต่เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อ *Streptomyces* มีความใกล้เคียงกันมาก อาจทำให้การเทียบเคียงผิดพลาดได้ ดังนั้นการใช้ระบบจัดจำแนกแบบผสมผสานจะทำให้ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น เช่น Chun *et al.* (1997) จัดจำแนก Actinomycetes ที่แยกได้จากดินในประเทศเกาหลี ด้วยระบบ polyphasic taxonomy โดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางเคมี และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA สามารถระบุเชื้อดังกล่าวคือ *Streptomyces seoulensis* การระบุเชื้อ *Streptomyces* strains KS3-5 ที่แยกได้จากดิน เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ และ DNA homology สามารถระบุชนิดได้เป็น เชื้อ *S. toxytricini* (Wu and Chen, 1995) ทำนองเดียวกัน Tashiro *et al.* (1990)

สามารถระบุชนิดของ *S. scabies* และ *S. acidiscabies* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา DNA-DNA homology และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA เช่นเดียวกับ Saintpierre *et al.* (2003) จำแนกเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จาก ultramafic soil โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว สามารถระบุชนิดสกุล *Streptomyces* และ เชื้อสายพันธุ์ SOFCin 76 ระบุได้เป็น *S. yatensis* sp. Nov. ทำนองเดียวกันการจัดจำแนกเชื้อ Thermophilic actinomycete สายพันธุ์ที่แยกได้จาก poultry faces สามารถระบุอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ สายพันธุ์ B19T ระบุได้เป็น *S. thermocoprophilius* sp. Nov. (Kim *et al.*, 2000)

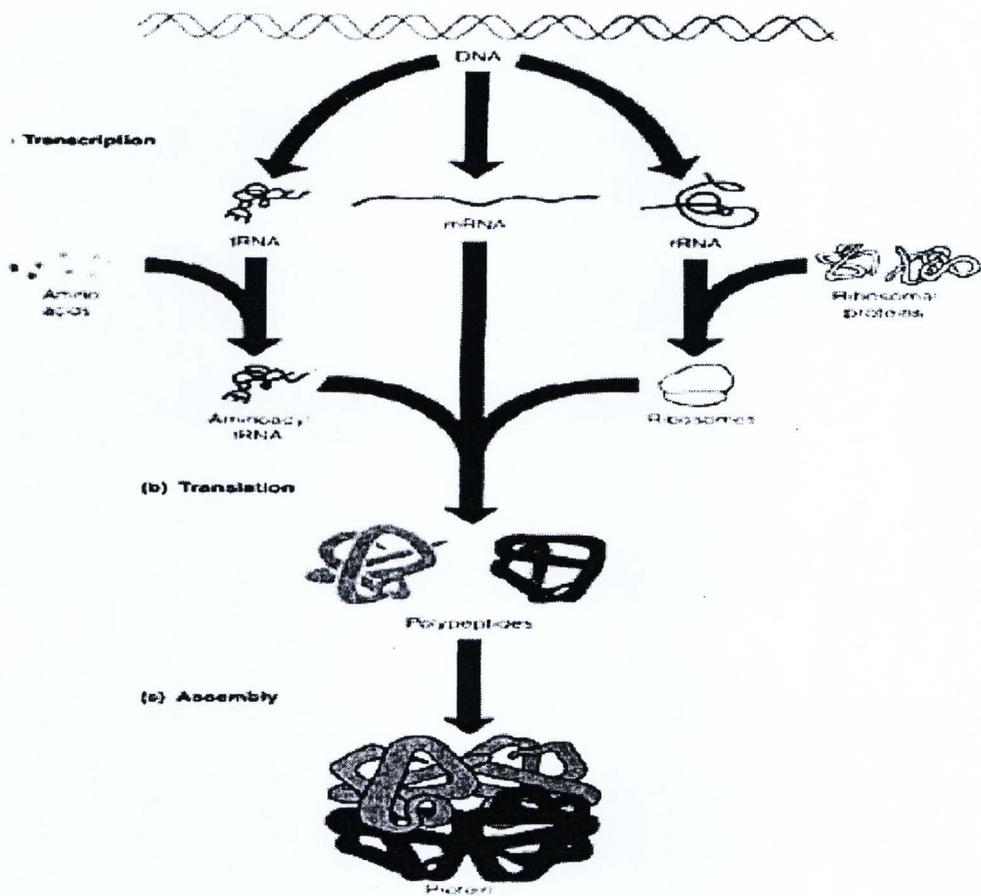
RNA Molecules

โมเลกุลอาร์เอ็นเอ (RNA molecule) ของโปรคาริโอต และยูคาริโอต ที่ได้จากการบวนการถอดรหัส (transcription) สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1) mRNA (messenger RNA) ทำหน้าที่เป็นตัวกลางของยีน (gene) ซึ่งจะถูกแปลรหัส (translation) ได้ผลผลิตของยีน (gene product) คือ โปรตีนหรือสายโพลีเปปไทด์ (protein หรือ polypeptide) โดยทั่วไปโมเลกุลของ mRNA มีระยะเวลา และคงสภาพอยู่ภายในเซลล์ค่อนข้างสั้น

2) ribosomal RNA (rRNA) เป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซมซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปลรหัส

3) transfer RNA (tRNA) เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการนำกรดอะมิโนมาส่งให้ mRNA ทั้ง rRNA และ tRNA สามารถคงสภาพภายในเซลล์ได้ยาวนาน และสามารถทำงานได้ทันทีไม่ต้องผ่านกระบวนการแปลรหัส (final product of expression) แต่พบว่า ทั้ง tRNA และ rRNA มีบทบาทสำคัญโดยตรงกับกระบวนการแปลรหัสของ mRNA ดังในรูปที่ 5



รูปที่ 5 โมเลกุลอาร์เอ็นเอทั้ง 3 ชนิด

Ribosomal RNA (rRNA)

โดยทั่วไปโมเลกุลของ rRNA ประกอบรวมอยู่กับโปรตีนแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่เรียกว่า ไรโบโซม (Ribosome) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปลรหัส ดังในรูปที่ 6

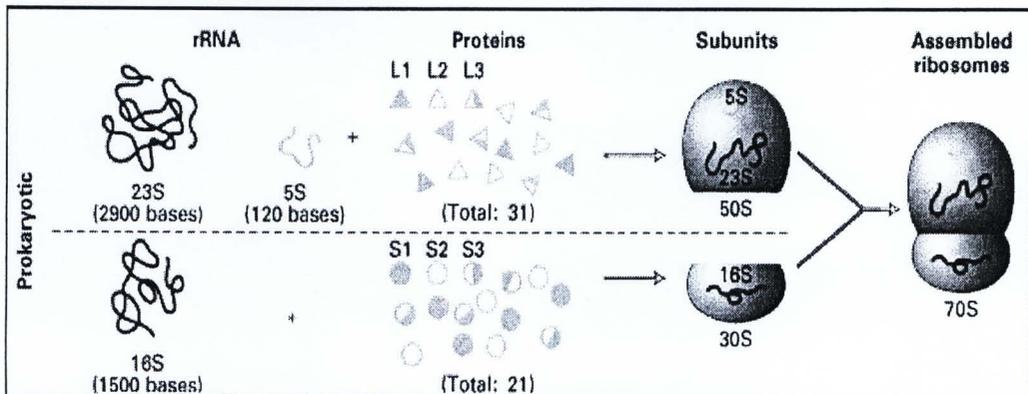
โปรคาริโอต สามารถแบ่งโมเลกุลของ rRNA ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. 23S rRNA มีขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 50S
2. 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ เป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 30S
3. 5S rRNA มีขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 50S

ไรโบโซมของโปรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ 50S และ 30S โดย

1. Large subunit (50S) ประกอบด้วย 23S rRNA + 5S rRNA + protein 34 ชนิด
2. Small subunit (30S) ประกอบด้วย 16S rRNA + protein 21 ชนิด

(S = Sevedberg unit คือ A value used to express the velocity with a molecule or structure sediments when centrifuged in a dense solution.)



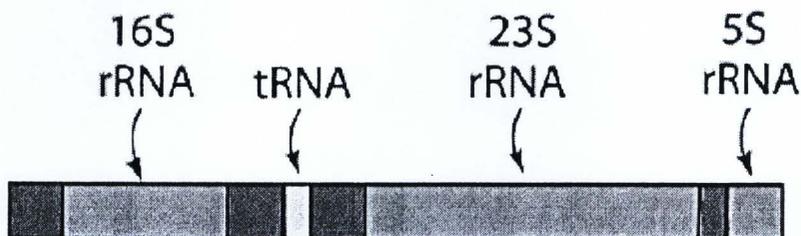
รูปที่ 6 องค์ประกอบของไรโบโซม

(ที่มา: <http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/EUrDNA.jpeg>, 2547)

การสังเคราะห์ rRNAs (Synthesis of rRNAs)

โมเลกุล rRNA ของทั้งโปรคาริโอตที่มี 3 ชนิด และยูคาริโอตที่มี 4 ชนิด จะถูกผลิตออกมาในปริมาณเท่าๆ กัน และมีปริมาณมากเพียงพอ ดังนั้น rRNA gene ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โมเลกุล rRNA ทุกชนิดนั้นจะอยู่ในสภาพเป็นกลุ่ม หรือเป็นหน่วย ที่เรียกว่า rRNA transcription unit ซึ่งแตกต่างกันในโปรคาริโอต และยูคาริโอต ดังนี้

1. rRNA transcription unit ของโปรคาริโอต ประกอบด้วย 16S, 23S และ 5S rRNA gene เรียงต่อกัน โดยแต่ละ rRNA gene ถูกคั่นด้วยลำดับเบสขนาดสั้นๆ ที่ไม่ใช่ยีน เรียกว่า ช่องว่าง (spacer) ซึ่ง rRNA ทั้ง 3 ชนิด จะถูกจำลองรหัสออกมาพร้อมกัน โดยใช้ promoter ร่วมกัน ดังรูปที่ 7 เช่น ใน *E. coli* มีกลุ่มของยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนดีเอ็นเอ ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ rRNA ทั้ง 3 ชนิด ประกอบด้วย rRNA transcription unit มี 7 ชุด (copies)



รูปที่ 7 rRNA transcription unit ของโปรคาริโอต

(ที่มา : <http://www.irn.pdx.edu/~newman1/SynRRNA.GIF>, 2547)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นขบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งขบวนการนี้เลียนแบบขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ผู้คิดค้นเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) คือ Kary Mullis พีซีอาร์ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation)

ใช้อุณหภูมิประมาณ 94°C เมื่อเริ่มต้นดีเอ็นเอแม่แบบจะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94°C ทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกันโดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2. การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)

ใช้อุณหภูมิประมาณ $40-62^{\circ}\text{C}$ เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้วจะลดอุณหภูมิลงเหลือ $40-62^{\circ}\text{C}$ เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส ที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารถที่จะเริ่มจากศูนย์ได้เนื่องจากเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำนิวคลีโอไทด์ตัวต่อมาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่มีชื่อว่า Primase เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension)

ใช้อุณหภูมิประมาณ $68-72^{\circ}\text{C}$ ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับการทำงานของ Taq DNA polymerase (ที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

องค์ประกอบที่สำคัญในการทำ PCR ได้แก่

- ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA)
- เอนไซม์ DNA Polymerase ชนิดทนความร้อน (*Taq* DNA polymerase)
- Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)
- บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (PCR Buffer)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- เครื่องมือที่สำคัญในการทำพีซีอาร์ได้แก่ Thermal cycler หรือ PCR machine

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อกลุ่มสเตรปโตมัยซีทจากบริเวณหมู่เกาะตะรุเตาจังหวัดสตูล
2. เพื่อจัดจำแนกเชื้อสเตรปโตมัยซีทโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และคุณสมบัติทางชีวโมเลกุล