บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

Streptomyces spp. ทั้งหมด 178 ไอโซเลตคัดกรองได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน หลังจากการศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ พบว่าให้ข้อมูลที่ค่อนข้างคาบเกี่ยวกันสูงมาก มีลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันมากถึง 153 ลักษณะ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถนำไปเป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp.ได้อย่างชัดเจน งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้จัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะจีโนไทป์ ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของบริเวณ 16S-ITS ซึ่งมีบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงมาก และลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้จะมีความแตกต่างกันในระดับสปีชีส์ (Wenner และคณะ, 2002) ผลิตภัณฑ์ PCR จากบริเวณ 16S-ITS ของ *Streptomyces* ที่ถูกสุ่มคัดเลือกแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III และวิเคราะห์บนอะกาโรสเจล พบว่ามีแถบดีเอ็นเอ 4-6 แถบ ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษา RFLP จาก 16S rRNA ของ *Streptomyces* spp. 3 ไอโซเลต ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III ให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบที่มีขนาดต่างกันในแต่ละไอโซเลต จึงระบุได้ว่าทั้ง 3 ไอโซเลตมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (Ninaweetal และคณะ, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา RFLP จาก 16S rRNA ของ *Actinomyces* spp. 7 สายพันธุ์ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III ให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบ และให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แต่มี 3 สายพันธุ์ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ซึ่งเกิดจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันมาก (Sato และคณะ, 1998) เพื่อให้เกิดความชัดเจนมากขึ้นในงานวิจัยนี้ หลังจากจัดกลุ่มครั้งแรกด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเอนไซม์ *Hae*III จึงจัดกลุ่มย่อยด้วย RFLP จากบริเวณ 16S-ITS ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI เนื่องจากมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส และจะตัดเฉพาะระหว่างเบส GC กับ GC เท่านั้น และ *Streptomyces* เองเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณเบส GC มากถึง 69-78% (Rintala, 2003) โอกาสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI จึงมีมากและมีจำนวนของแถบดีเอ็นเอมากกว่าการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III ทำให้ในแต่ละกลุ่มใหญ่ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III จึงถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ RFLP จึงขึ้นอยู่กับความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะจดจำได้ หลังจากนั้นคัดเลือกตัวแทนกลุ่มละหนึ่งตัวอย่างทั้งหมด 29 ไอโซเลตนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic Tree เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP พบว่ามีความสอดคล้องกัน แต่ไม่มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลักษณะฟีโนไทป์ เช่นเดียวกับการรายงานของ Baines และคณะ (2007) ซึ่งจัดจำแนก *Streptomyces* spp. 153 ไอโซเลต โดยใช้ลักษณะฟีโนไทป์เช่น ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน วิเคราะห์ fatty

acid methyl ester และ antibiotic resistance เปรียบเทียบกับการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ ด้วยเทคนิค BOX-PCR fingerprinting และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าลักษณะฟีโนไทป์และจีโนไทป์ที่พบมีความสอดคล้องกันน้อยมาก ความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เกิดจากความแตกต่างทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรม เช่น การเกิด horizontal transfer การกลายพันธุ์ของยีน การเกิด recombination ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA (Cooper และ Feil, 2004) และระบบนิเวศของบริเวณที่คัดแยก *Streptomyces* spp. (Develos Baines และคณะ, 2007) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบว่าการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP มีความละเอียดกว่าการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เช่นเดียวกับการรายงานของ Lanoot และคณะ (2005) ที่เปรียบเทียบการจัดกลุ่ม *Streptomyces* และ *Kitasatospora* 436 สายพันธุ์ ด้วยข้อมูล 16S-ITS RFLP และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ด้วยค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 98% ได้ 25 กลุ่ม พบว่าการจัดกลุ่มด้วย 16S-ITS RFLP มีความใกล้เคียงกับการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA แต่การจัดกลุ่มด้วย 16S-ITS RFLP ให้ข้อมูลที่ละเอียดกว่า เห็นได้จากจำนวนกลุ่มที่มีมากกว่าคือ 59 กลุ่ม ถึงแม้ว่าจะพบความหลากหลายเล็กน้อยของกลุ่มที่จัดด้วย 16S-ITS RFLP ที่กระจายอยู่ในกลุ่มของ 16S rDNA ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่า 16S rDNA และมีขนาดแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ การเปลี่ยนแปลงเบส 1 ถึง 2 คู่เบส ของ variable region อาจทำให้เกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ในแต่ละสายพันธุ์ (Song และคณะ, 2004) นอกจากนี้บริเวณที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ร่วมด้วยจึงทำให้มีจำนวนกลุ่มมากกว่า และให้ข้อมูลที่ละเอียดกว่าการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และความไม่สอดคล้องกันบางส่วนที่พบจากการจัดกลุ่มทั้งสองวิธีนั้น อาจเนื่องมาจากการศึกษาด้วยวิธีลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP ต้องการสภาวะต่างๆ เช่น ระยะเวลา อุณหภูมิ หรือความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดผลิตภัณฑ์ PCR และความเข้มข้นของอะคลิลาไมด์ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต้องมีความสม่ำเสมอในทุกๆครั้ง (Lanoot และคณะ, 2005) ดังนั้นการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค RFLP มีความแม่นยำ (McDonald และ Deighton, 2005) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ง่าย รวดเร็วหากมีจำนวนไอโซเลตมาก เทคนิคนี้จึงถูกนำมาใช้จัดกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Flavobacterium* spp (Darwish และ Ismaiel, 2005) *Carnobacterium* spp. (Rachman และคณะ, 2004) หรือ *Streptococcus* spp. (McDonald และ Deighton, 2005) เทคนิค 16S-ITS RFLP จึงเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ได้เบื้องต้น และเพื่อเป็นการยืนยันความหลากหลาย ของ *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทนในแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree พบว่ามีความหลากหลายของสปีชีส์ที่พบ และจากการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP จากเอนไซม์ *Hae*III ประกอบกับ เอนไซม์ *Bst*UI สามารถจัดจำแนก *Streptomyces* 100 ไอโซเลต ได้เป็น 39 กลุ่ม แสดงว่า *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินใน

จังหวัดน่านมีความหลากหลายสูงมาก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไป

นอกจากนี้ได้ศึกษา *Streptomyces* ทั้ง 178 ไอโซเลตเบื้องต้นถึงการนำมาใช้ประโยชน์ พบว่ามี 19 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิดพบว่ามีค่าแตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบนั้นๆ แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสารชนิดใหม่ โดยเฉพาะไอโซเลต O145702 ที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย และยีสต์ทดสอบได้ ที่สามารถนำมาประยุต์ใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร การแพทย์ หรืออุตสาหกรรม งานวิจัยในครั้งนี้จึงสามารถเป็นข้อมูลเริ่มต้นในการศึกษาต่อไปได้

สรุปผลการทดลอง

1. การจัดจำแนกตามลักษณะฟีโนไทป์ด้วยสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี นั้นสามารถจัดจำแนก *Streptomyces* ได้เป็น 153 กลุ่ม
2. การจัดจำแนกตามลักษณะจีโนไทป์ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP สามารถจัดลุ่มย่อยได้เป็น 39 กลุ่ม และการจัดจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยใช้ Phylogenetic Tree ได้ 14 กลุ่ม
3. จากการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยลักษณะฟีโนไทป์และจีโนไทป์พบว่ามีความสอดคล้องกันน้อยมาก
4. เปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA มีความสอดคล้องกัน แต่การจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP มีความละเอียดมากกว่า
5. เทคนิคลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP สามารถนำมาใช้จัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว
6. Phylogenetic Tree และลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน