

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน
รายงานผลการวิจัย

ลักษณะของแอกติโนฟาจที่แยกจากดิน
โดยวิธีส่งเสริมการเจริญ

Characterization of Actinophages Isolated from Soil
by Enrichment Method

โดย

รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์

28 ธันวาคม 2544

บทนำ

แบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือเรียกสั้นๆว่า ฟาจ (phage) หมายถึง ไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ (infection) ในแบคทีเรีย โดยเข้าไปเจริญเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย เป็นผลให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย (Bradley, 1967 ; Maloy *et al.*, 1994)

ประวัติการค้นพบ (Duckworth, 1976)

ฟาจจัดเป็นไวรัสกลุ่มที่สามที่ถูกค้นพบรองจากไวรัสสัตว์และไวรัสพืช มีรายงานเกี่ยวกับฟาจครั้งแรกในปี ค.ศ. 1915 โดย Frederick W. Twort สามารถแยกฟาจที่ทำลายเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มไมโครคอคคัส (micrococci) และบาซิลลัส (bacilli) ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่นั้นเขาสรุปว่าเกิดจากไวรัสแต่ไม่ได้ทำการศึกษาค้นคว้า ต่อมาในปี ค.ศ.1917 Felix d'Herrelle ได้ทำการทดลองกับผู้ป่วยโรคบิดซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae* โดย d'Herrelle แยกเชื้อนี้จากอุจจาระของผู้ป่วยและทำการกรองของเหลวออกจากอุจจาระนั้นด้วย จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ผสมลงไปในการอาหารเหลวที่สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. dysenteriae* และนำไปสเปรด (spread) ลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนพบว่าอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส และบนจานเพาะเชื้อไม่มี *S. dysenteriae* เจริญ เขาจึงสรุปว่าของเหลวที่กรองได้เป็นสิ่งมีชีวิตที่มองไม่เห็น นั่นคือไวรัส แต่เป็นไวรัสของแบคทีเรียจึงเรียกไวรัสนี้ว่า แบคทีริโอเฟจ ซึ่งมีความหมายว่าผู้กินแบคทีเรีย (bacteria eater)

คุณสมบัติทั่วไปของฟาจ

ฟาจถูกจัดเป็นออบลิเกตพาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรีย นั่นคืออนุภาคฟาจที่เป็นอิสระสามารถมีชีวิตอยู่ได้ด้วยตัวเอง แต่การเพิ่มจำนวนของอนุภาคจะเกิดขึ้นเฉพาะในเซลล์แบคทีเรียเท่านั้น แม้ว่าฟาจส่วนใหญ่มีเอ็นไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด แต่ฟาจจำเป็นต้องใช้ระบบการสังเคราะห์โปรตีน (protein-synthesizing system) กรดอะมิโน และระบบการสร้างพลังงาน (energy-generating system) ของเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นการที่ฟาจจะสามารถเพิ่มจำนวนอนุภาคได้จะต้องอยู่ในเซลล์แบคทีเรียที่มีเมตาบอลิซึมเท่านั้น ฟาจแต่ละอนุภาคจะมีกระบวนการเพื่อการดำรงชีวิตดังนี้

1. การป้องกันอันตรายของกรดนิวคลีอิกจากสิ่งแวดล้อมทางเคมี ซึ่งอาจจะทำให้โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกของฟาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น การแตกหักของโมเลกุลกรดนิวคลีอิกอันเป็นสาเหตุของการกลายพันธุ์

2. การส่งกรดนิวคลีอิกของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

3. การทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อฟาจไปเป็นเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนของฟาจอยู่ภายใน

4. การปลดปล่อยอนุภาคฟาจใหม่จากเซลล์แบคทีเรีย

ฟาจทุกชนิดจะมีกระบวนการต่างๆเพื่อการดำรงชีวิตในรูปแบบดังกล่าวข้างต้น แต่อาจมีความแตกต่างกันในรายละเอียดของกระบวนการ (Maloy *et al.*, 1994)

โครงสร้างพื้นฐานของฟาจ

โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคฟาจประกอบด้วย

แคปซิด (capsid) คือ โปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกไว้ภายใน เพื่อป้องกันการย่อยสลายจากเอนไซม์นิวคลีเอส แคปซิดประกอบด้วยแคปโซเมอร์ (capsomer) หลายหน่วยมาเรียงต่อกัน ทำให้เกิดรูปร่างได้หลายแบบ ได้แก่ รูปทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral) และสายยาว (filamentous) เป็นต้น

แคปซิดรูปทรงหลายเหลี่ยมที่รู้จักกันดี นั่นคือ รูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral shape) ซึ่งรูปแบบที่ง่ายที่สุด คือ มีมุมยอด 12 มุม แต่ละมุมประกอบด้วย แคปโซเมอร์ 5 หน่วยมาประกอบกันหรือเรียกว่า เพนตอน (penton) และมีหน้าของสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้าซึ่งเกิดจากแคปโซเมอร์ 6 หน่วยหรือเรียกว่า เฮกซอน (hexon) มาเรียงตัวรอบส่วนเพนตอน โครงสร้างนี้บางครั้งจะเรียกว่า ส่วนหัว (head) ซึ่งในฟาจแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกัน หากมีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมากนั้นเกิดจากการแบ่งย่อยของหน้าสามเหลี่ยมมากขึ้น แต่ยังคงมี 12 มุมเช่นเดียวกัน

แคปซิดที่มีรูปร่างเป็นสายยาวนั้น เกิดจากการเรียงตัวของแคปโซเมอร์แบบขดเป็นเกลียว โดยมีกรดนิวคลีอิกเป็นแกนกลาง นอกจากนี้ในฟาจที่มีโครงสร้างซับซ้อน (complex structure) จะพบว่าส่วนหางของฟาจ (tail) แคปโซเมอร์มีการเรียงตัวแบบขดเป็นเกลียวเช่นกัน มีลักษณะเป็นท่อ (tube) ที่ตรงกลางกลวง ส่วนหางของฟาจมีโครงสร้างอื่นๆได้แก่ ซีทห่อหุ้ม (tail sheath) แผ่นฐาน (base plate) ไยหาง (tail fiber) เป็นต้น ส่วนหางมีหน้าที่ในการเกาะติดกับรีเซพเตอร์ (receptor) บนผิวเซลล์แบคทีเรียและช่วยในการส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าสู่เซลล์ (Bradley, 1967 ; Luria *et al.*, 1978)

กรดนิวคลีอิก (nucleic acid)

ในแต่ละอนุภาคของฟาจทุกชนิดจะมีกรดนิวคลีอิกบรรจุอยู่เพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น โดยกรดนิวคลีอิกของฟาจแต่ละชนิดจะมีรูปแบบต่างๆกัน ดังนี้ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) ดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) และอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA)

ในฟาจที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงหลายเหลี่ยมนั้น ความยาวของกรดนิวคลีอิกจะยาวกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก ดังนั้นกรดนิวคลีอิกจะอัดตัวแน่นอย่างมากอยู่ในบริเวณที่ว่างหรือโพรงภายในแคพซิด ส่วนกรดนิวคลีอิกในฟาจที่มีรูปร่างเป็นสายยาวจะฝังตัวกับแคพไซเมอร์ที่ขีดเป็นเกลียวและจะอยู่ในรูปที่ขยายตัวออกไป (Dimmock and Primrose, 1988 ; Morgan, 1993)

การจัดจำแนกฟาจ

Bradley (1967) ได้ทำการจัดจำแนกฟาจโดยอาศัยรูปร่างของฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและชนิดของกรดนิวคลีอิกออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ (ดังแสดงในรูป 1) (Bradley, 1967)

A. มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) และมีส่วนหางที่มีซีทที่หดตัวได้หุ้ม (contractile sheath) อนุภาคมีลักษณะตรง และบริเวณส่วนปลายของอนุภาคมักจะมีโครงสร้างอื่น เช่น โยหาง แผ่นฐาน เป็นต้น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

B. มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวมากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก และไม่มีซีทที่หดตัวได้หุ้ม อาจมีหรือไม่มีโครงสร้างบริเวณปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

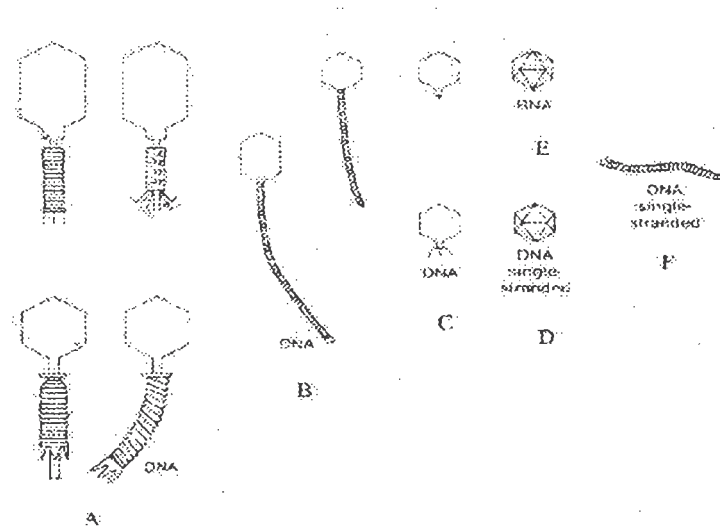
C. มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวและไม่สามารถหดตัวได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

D. รูปหกเหลี่ยม ที่ประกอบด้วยแคพไซเมอร์ขนาดใหญ่และมีปุ่ม (knob) เกาะอยู่บนมุมยอดของแคพซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

E. รูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคพไซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

F. รูปร่างสายยาว มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้ Reaney และ Ackermann (1982) ได้ทำการจัดจำแนกฟาจเป็น 7 กลุ่มหลัก คือ A-G ซึ่งในกลุ่ม A-F นั้นนอกจากจะใช้รูปร่างของอนุภาคและชนิดของกรดนิวคลีอิกในการจัดจำแนกเช่นเดียวกับวิธี Bradley แล้ว ในแต่ละกลุ่มหลักยังมีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยโดยอาศัยขนาดของแคพซิดมาเป็นหลักเกณฑ์ในการจำแนกด้วย ทำให้สามารถแบ่งออกเป็น 17 กลุ่มย่อย และมีเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งกลุ่ม คือ กลุ่ม G ซึ่งเป็นฟาจที่มีรูปร่างไม่แน่นอนและมีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (Reaney and Ackermann, 1982)



รูปที่ 1 การจำแนกฟาจด้วยวิธีการของ Bradley โดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก (Bradley, 1967)

การเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจ

กลไกการเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจในแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ ไลติกไซเคิล และไลโซเจนิคไซเคิล

ไลติกไซเคิล (Lytic cycle)

ฟาจที่สามารถเพิ่มจำนวนในไลติกไซเคิลเรียกว่า ไวรูเลนตฺฟาจ (virulent phage) ซึ่งขั้นตอนสุดท้ายของไซเคิลนั้นจะทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตก (lysis) และตายได้ (Duckworth, 1987) ตัวอย่างของไวรูเลนตฺฟาจได้แก่ ที-อีเวนฟาจ (T-even phage : T₂, T₄ และ T₆) เป็นต้น มีการศึกษากลไกต่างๆของไลติกไซเคิลอย่างมากในฟาจกลุ่มที-อีเวนฟาจ โดยมี *E. coli* เป็นโฮสต์ ฟาจเหล่านี้ได้มีการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางโมเลกุลมากพอจนสามารถใช้เป็นแบบจำลองของกลไกการเพิ่มจำนวนของฟาจได้ ไลติกไซเคิลประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (ดังแสดงในรูปที่ 2)

1. การเกาะติด (Attachment)

ฟาจจะใช้ปลายของส่วนหางหรือเรียกส่วนนี้ว่าตำแหน่งเกาะติดของฟาจ (attachment site) จับกับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) ที่จำเพาะบนผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยการเกาะติดนี้มีการสร้างพันธะด้วยแรงที่อ่อนระหว่างสองตำแหน่ง โดยธรรมชาติตำแหน่งรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น โปรตีน เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดไทโคอิก (teichoic acid) รวมทั้งแฟลกเจลลา (flagella) และพิลไล (pili) เป็นต้น ซึ่งโดยปกติรีเซพเตอร์เหล่านี้จะมีหน้าที่อื่น เช่น เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์หรือส่วน

ประกอบของแคปซูล (capsule) มากกว่าจะทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ให้ฟาจ (Furukawa *et al.*, 1983 ; Maloy *et al.*, 1994)

2. การส่งผ่านกรดนิวคลีอิกของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Penetration)

หลังจากเกิดการเกาะติดแล้ว ส่วนซีทที่หดตัวได้ของส่วนหางจะหดตัว ทำให้ส่วนแกนหาง (tail core) ผ่านเข้าสู่ผิวเซลล์จนถึงชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และส่งผ่านกรดนิวคลีอิกจากส่วนหัวผ่านส่วนแกนหางเข้าสู่ไซโตพลาสซึมโดยที่แคพซิดของฟาจยังคงอยู่ภายนอก ดังนั้นกรดนิวคลีอิกจะเข้าสู่เซลล์โดยไม่ผ่านสื่อกลางใด (Furukawa *et al.*, 1983)

ฟาจบางชนิดมีหางที่ยาวสามารถส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ แต่ฟาจที่มีส่วนหางสั้นจะส่งผ่านไปยังเพอริพลาสซึม (periplasm) ในบริเวณเพอริพลาสซึม (periplasmic space) ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนฟาจที่ไม่มีส่วนหางนั้นฟาจจะทำให้แคพซิดแตกออกก่อน และปล่อยกรดนิวคลีอิกไปที่ผนังเซลล์ก่อนเข้าสู่เซลล์ (Maloy *et al.*, 1994) และฟาจที่มีรูปร่างเป็นสายยาวพบว่าแคพซิดจะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วย (Campbell, 1996)

3 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อไปสู่กระบวนการสร้างอนุภาคฟาจ

หลังจากที่แบคทีเรียเกิดการติดเชื้อแล้ว ความสามารถในการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) การถอดรหัส (transcription) จะลดลงจนไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อีก เป็นเพราะดีเอ็นเอของแบคทีเรียเกิดการแตกหักหรือโปรตีนของฟาจที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ไปรบกวนการถอดรหัส (Mathews, 1977 ; Maloy *et al.*, 1994)

4. การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของฟาจ

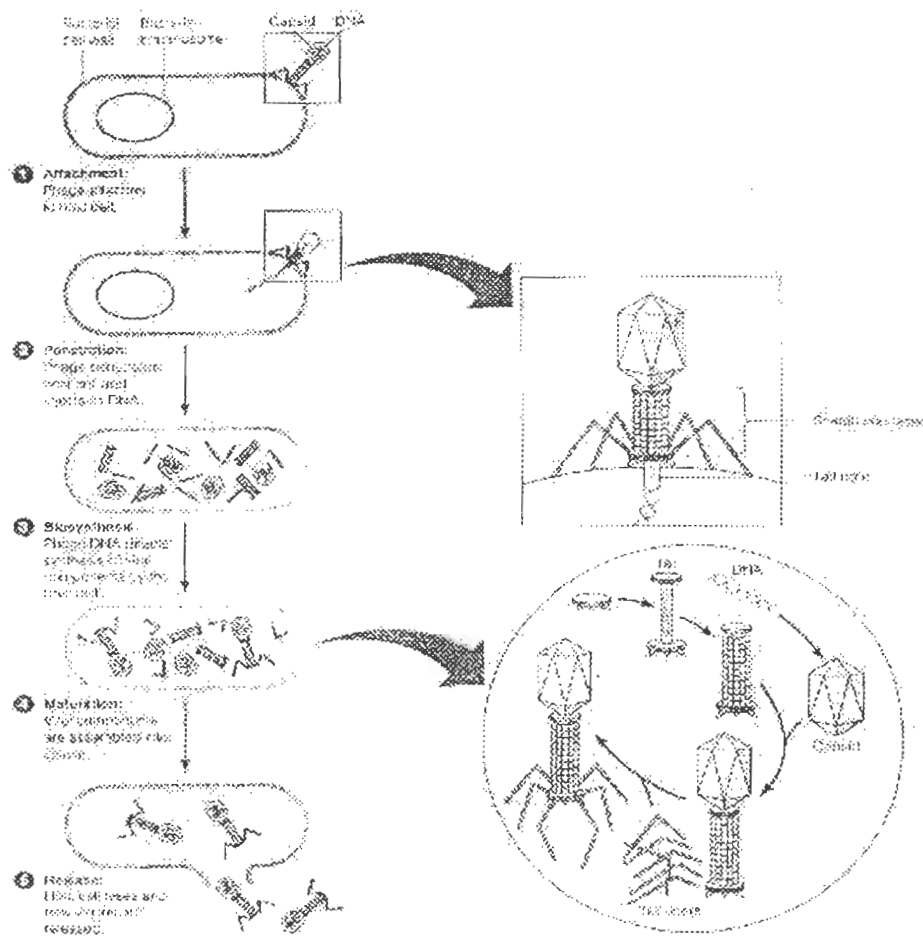
เมื่อดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของฟาจจะเริ่มต้นจากการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA : messenger RNA) จากดีเอ็นเอของฟาจโดยอาศัยอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) ของแบคทีเรีย ซึ่งเอ็มอาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นในช่วงนี้เรียกว่าเอ็มอาร์เอ็นเอช่วงต้น (early mRNA) และจะเกิดการแปลรหัส (translation) ไปเป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) อาร์เอ็นเอ โพลีเมอเรสของฟาจเอง เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนชุด (copy) ดีเอ็นเอของฟาจและควบคุมเมตาบอลิซึมในเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นมีการถอดรหัสช่วงหลังจากการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอของฟาจ โดยใช้อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของฟาจเอง จะได้เอ็มอาร์เอ็นเอช่วงหลัง (late mRNA) ซึ่งเมื่อแปลรหัสออกมาจะได้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคฟาจ เช่น แคพซิด ส่วนหาง รวมทั้งเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการประกอบโครงสร้างฟาจและการปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่

5. การประกอบเป็นรูปร่างของอนุภาคฟาจ (Morphogenesis)

ในกระบวนการนี้อาศัยโปรตีน 2 กลุ่ม คือ โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของฟาจ และโปรตีนช่วยในการประกอบโครงสร้าง ซึ่งโปรตีนกลุ่มที่สองจะไม่ใช่ส่วนหนึ่งของอนุภาคฟาจ การประกอบโครงสร้างจะแยกส่วนหัวและส่วนหาง โดยส่วนหัวนั้นดีเอ็นเอของฟาจจะรวมตัวกับโปรตีนจำเพาะอัดแน่นเข้าไปในแคพซิด สำหรับส่วนหางจะประกอบกับโครงสร้างอื่นๆของหางก่อน จากนั้นทั้งสองส่วนจะมาเชื่อมต่อกันจนเป็นอนุภาคสมบูรณ์ โดยทั่วไปในเซลล์แบคทีเรีย 1 เซลล์สามารถผลิตฟาจได้ 50-100 อนุภาค ทั้งนี้จำนวนอนุภาคฟาจขึ้นกับความจำเพาะของฟาจและแบคทีเรียด้วย (Luria *et al.*, 1978 ; Maloy *et al.*, 1994)

6. การปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Release)

ขั้นตอนสุดท้ายของการติดเชื้อจากฟาจ คือ ฟาจจะสังเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิดเพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรีย คือ เอนไซม์โฮลิน (holin) เพื่อย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ และไลโซไซม์เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและฟาจถูกปล่อยออกมาภายนอก (Young, 1992 ; Maloy *et al.*, 1994)



รูปที่ 2 ไลติคไซเคิลของ T-even phage (Tortora *et al.*, 1995)

ไลโซเจนิคไซเคิล (Lysogenic cycle)

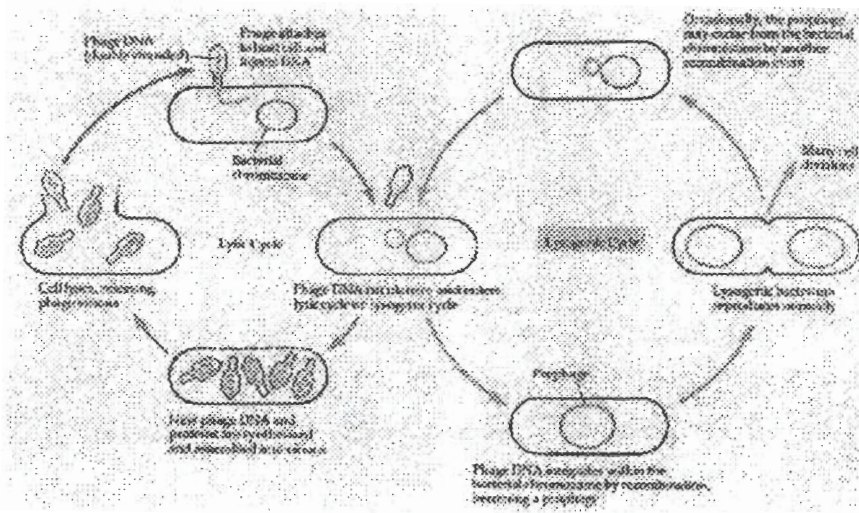
ฟาจที่มีการเพิ่มจำนวนแบบไลโซเจนิคไซเคิล หรือเพิ่มจำนวนในไลโซเจนิคเซลล์ เรียกว่า เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) ซึ่งฟาจประเภทนี้จะไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (Bradley, 1967 ; Duckworth, 1987) ตัวอย่างของเทมเพอเรตฟาจคือ แลมดาฟาจ (lambda phage) การศึกษาไลโซเจนิคไซเคิลนั้นจะใช้แลมดาฟาจที่มี *E. coli* เป็นโฮสต์เป็นแบบจำลอง ไลโซเจนิคไซเคิลประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (ดังแสดงในรูปที่ 3)

1. ฟาจจะทำการเกาะติดกับแบคทีเรียในตำแหน่งที่จำเพาะและปล่อยดีเอ็นเอสายตรงเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย
2. ดีเอ็นเอสายตรงของฟาจจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวนปิด
3. ดีเอ็นเอของฟาจในรูปวงแหวนปิด ในช่วงแรกจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและถอดรหัสโดยอาศัยเอนไซม์จากแบคทีเรีย เมื่อได้เอ็มอาร์เอ็นเอของฟาจแล้วจะเกิดการแปลรหัสและได้โปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งจะเข้าขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างอนุภาคของฟาจและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปลดปล่อยฟาจ (release) ดังนั้นจึงไม่เข้าสู่ไลติกไซเคิล จากนั้นดีเอ็นเอของฟาจในรูปวงแหวนปิดของฟาจจะเข้าสอดแทรก (integration) กับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งจะเรียกฟาจในช่วงนี้ว่า โปรฟาจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียนี้ว่า ไลโซเจน (lysogen) โปรฟาจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่มีโปรฟาจอยู่ในโครโมโซม จะไม่เกิดการติดเชื้อจากฟาจชนิดเดียวกันอีกครั้งเรียกว่า มีภูมิคุ้มกัน (immunity) เป็นเพราะว่าเมื่อดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่ไลโซเจนเซลล์จะไม่มีการถอดรหัส เพราะโปรตีนควบคุมจะเข้าขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนต่อไปได้ (Maloy *et al.*, 1994 ; Campbell, 1996)

4. การชักนำเข้าสู่ไลติกไซเคิล (Induction)

เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ สามารถทำให้โปรฟาจหลุดออกจากโครโมโซมแบคทีเรียและเข้าสู่ไลติกไซเคิลเพื่อผลิตอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ การชักนำโปรฟาจเข้าสู่ไลติกไซเคิลนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดระดับลงของโปรตีนควบคุม การชักนำเข้าสู่ไลติกไซเคิลนั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากการตอบสนองของแบคทีเรียที่มีต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ตหรือสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น (Luria *et al.*, 1978)



รูปที่ 3 ไลโซเจนิคไซเคิลของแลมดาฟาจ (Tortora *et al.*, 1995)

การเพาะเลี้ยงฟาจ

การเพาะเลี้ยงฟาจเพื่อเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นทำได้โดยการนำฟาจไปเพิ่มจำนวนในโฮสต์เซลล์ของแบคทีเรียที่มีแอกติวิตีของการเจริญเติบโต ซึ่งการเพาะเลี้ยงฟาจนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

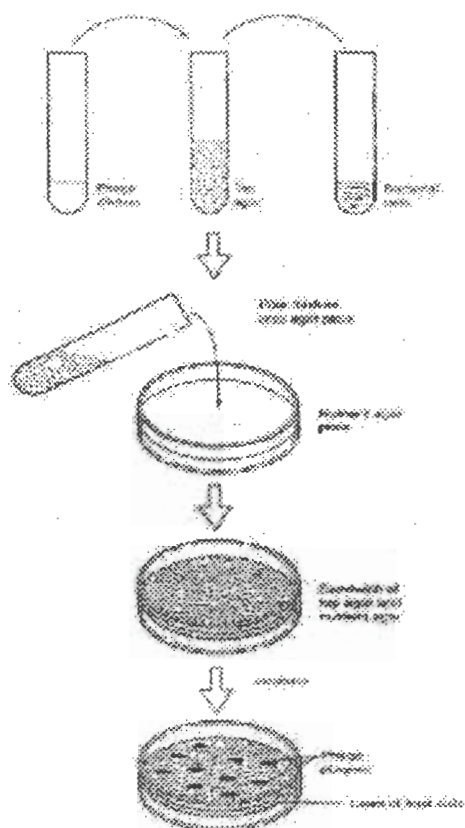
1. การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นำฟาจและแบคทีเรียใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฟาจจะเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียและทำให้เซลล์แตก ซึ่งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีลักษณะใสเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่การเจริญของเซลล์แบคทีเรียเพียงชนิดเดียว (Wistreich and Lechtman, 1980)

2. การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น

(double agar layer method)

นำฟาจและแบคทีเรียมาผสมกันในอาหารวุ้นเหลว (soft agar) ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงบนอาหารวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มทิ้งไว้ พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญบนชั้นของอาหารวุ้นเหลวหรือชั้นบนสุดของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะเป็นชั้นบางๆ ครอบคลุมบนผิวอาหารวุ้นเรียกว่า ลอน (lawn) ส่วนแบคทีเรียที่ถูกฟาจเข้าทำลายจะเกิดการแตกและปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ออกมา จากนั้นอนุภาคใหม่จะเข้าทำลายเซลล์ข้างเคียงต่อไป ทำให้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียเป็นบริเวณหนึ่ง เกิดเป็นบริเวณใสขึ้นบนลอนแบคทีเรีย เรียกว่า พลาคว (plaque) ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งวิธีนี้นอกจากเป็นการเพาะเลี้ยงฟาจแล้วสามารถใช้เป็นวิธีการแยกฟาจได้อีกด้วย (Adams, 1959; Bradley, 1967)



รูปที่ 4 การเพาะเลี้ยงฟาจด้วยวิธีการเลี้ยงบนอาหารชั้นสองชั้น (double agar layer method)
(Brock *et al.*, 1994)

ลักษณะของพลาัค

เมื่อไวรัสเลนตฟาจเกิดการติดเชื้กับแบคทีเรียจะให้พลาัคที่มีลักษณะใส (clear plaque) เป็นเพราะบริเวณที่เป็นพลาัคนั้นแบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตายจนหมด ส่วนเทมเพอเรตฟาจจะ ให้พลาัคที่มีลักษณะขุ่น (turbid plaque) เพราะบริเวณกลางพลาัคนั้นยังคงมีแบคทีเรียที่เป็นไลโซเจน เจริญอยู่ (Goyal, 1987)

การประยุกต์ใช้ฟาจในด้านต่าง ๆ

1. ทางการแพทย์

ฟาจบางชนิดสามารถทำให้เกิดการติดเชื้กับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เป็นเพราะ ความจำเพาะกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แบคทีเรีย และการมีระบบการป้องกันตัวเองของแบคทีเรีย หรือ Host controlled restriction and modification system เป็นตัวกำหนด ดังนั้นจึงได้มีการนำฟาจ มาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดเดียวกัน โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคที่มีความเหมือนกันมาก เช่น *Salmonella typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) หรือ *Staphylococcus aureus*

เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ อาศัยเทคนิคของ phage typing ทำให้การวินิจฉัยเชื่อเป็นไปอย่างรวดเร็วและถูกต้อง ฟาจที่นำมาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียนั้นจะต้องเป็นไวรัสเลนต์ฟาจ มีความเสถียร เจริญเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียอย่างรวดเร็วและให้ผลึกที่ชัดเจน (DuBow, 1994 ; Black, 1999)

2. ด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

ฟาจมีความสามารถในการถ่ายทอดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่งได้เรียกว่า ทรานสดักชัน (transduction) แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ทรานสดักชันแบบทั่วไป และ ทรานสดักชันแบบจำเพาะ

ทรานสดักชันแบบทั่วไป (generalized transduction)

เป็นการถ่ายทอดดีเอ็นเอแบบสุ่มและจะเกิดขึ้นโดยไวรัสเลนต์ ฟาจใน ขณะที่ฟาจเกิดการติดเชื้อ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และในขั้นตอนการประกอบอนุภาคฟาจใหม่ที่สมบูรณ์นั้น ชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะถูกบรรจุเข้าไปในส่วนหัวของฟาจ และเมื่อฟาจอนุภาคใหม่ที่มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียบรรจุอยู่เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียเซลล์ใหม่ ทำให้เกิดการถ่ายทอดดีเอ็นเอไปสู่เซลล์ใหม่ด้วย ตัวอย่างฟาจที่เกิดทรานสดักชันแบบนี้คือ ฟาจ P22 ที่มี *Salmonella typhimurium* เป็นโฮสต์ (Luria *et al.*, 1978 ; Maloy *et al.*, 1994)

ทรานสดักชันแบบจำเพาะ (specialized transduction)

เป็นการถ่ายทอดดีเอ็นเอโดยเทมเพลตฟาจ ซึ่งมีการศึกษาอย่างมากในแลมดาฟาจของ *E. coli* เมื่อแลมดาฟาจเกิดการติดเชื้อ ดีเอ็นเอของฟาจจะเข้าสู่สอดแทรกในดีเอ็นเอของ *E. coli* หรือคือโปรฟาจ โดยจะเข้าสู่สอดแทรกในตำแหน่งระหว่างยีน *gal* และยีน *bio* บนโอเปอรอนและเมื่อถูกชักนำเข้าสู่ไลติคไซเคิล โปรฟาจจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ของ *E. coli* ซึ่งทำให้มี ยีน *gal* และยีน *bio* ติดมากับดีเอ็นเอของฟาจด้วย หลังจากประกอบเป็นอนุภาคฟาจใหม่ที่มียีน *gal* หรือยีน *bio* อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองยีน ดังนั้นเมื่อเกิดการติดเชื้อมี *E. coli* ที่ไม่สามารถใช้กาแลคโตสหรือไม่สามารถสังเคราะห์ไบโอตินได้นั้นเปลี่ยนแปลงเป็นสามารถใช้กาแลคโตสหรือสร้างไบโอตินได้ตามลำดับ (Luria *et al.*, 1978 ; Maloy *et al.*, 1994)

จากความสามารถในการถ่ายทอดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง จึงมีการพัฒนาฟาจเพื่อใช้เป็นพาหะ (cloning vector) สำหรับกระบวนการดีเอ็นเอรีคอมบิแนนท์ (recombinant DNA) ของแบคทีเรียเช่น คอสมิด (cosmid) ฟาจมิด (phagemid) และแบคเทอริโอฟาจเวกเตอร์ (bacteriophage vector) (Chauthaiwale *et al.*, 1992)

แอกติโนมัยซีทีส (Actinomycetes)

แอกติโนมัยซีทีสเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีการแตกแขนง ติดสีแกรมบวก ต้องการออกซิเจนในการเจริญ การเจริญของแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เช่น ฐันพบว่าเส้นใยมีการแตกแขนงเรียกว่า มัยซีเลียม (mycelium) โดยเจริญเข้าไปภายในและบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยที่เจริญเข้าไปภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า ซับสเตรตมัยซีเลียม (substrate mycelium) ส่วนเส้นใยที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเรียกว่า แอเรียลมัยซีเลียม (aerial mycelium) แอเรียลมัยซีเลียมของแอกติโนมัยซีทีสหลายสายพันธุ์มีการเจริญอยู่บนซับสเตรตมัยซีเลียมและสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า โคนิเดียม (conidia) ซึ่งเป็นสปอร์ที่เกิดจากปลายเส้นใย แอกติโนมัยซีทีสบางสายพันธุ์สร้างสปอร์ไว้ในถุงเรียกว่า สปอแรนจิออสปอร์ (sporangiospore) (Lechevalier, 1989)

การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสอาศัยคุณสมบัติหลายประการเช่น ส่วนประกอบผนังเซลล์ ลักษณะรูปร่างของและสีของมัยซีเลียมและสปอร์ ปริมาณของ G+C ในสายดีเอ็นเอ ลักษณะรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น จากคุณสมบัติต่างๆ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.4 (1989) ได้จัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสออกเป็น 7 กลุ่มคือ Nocardioform actinomycetes, Actinomycetes with multilocular sporangia, Actinoplanetes, *Streptomyces* and related genera, Maduromycetes, *Thermomonospora* and related genera, Thermoactinomycetes นอกจากนี้มีแอกติโนมัยซีทีสบางสายพันธุ์ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มข้างต้นได้ จึงถูกจัดไว้ในกลุ่ม Other genera (Lechevalier, 1989; Lechevalier and Lechevalier, 1993)

แอกติโนมัยซีทีสมีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Hayakawa and Nonomura, 1987) โดยเฉพาะในแหล่งดินจะพบแอกติโนมัยซีทีสจำนวนมาก Labeda and Shearer (1990) ได้รายงานว่าในดินที่มีการทำเกษตรกรรม 1 กรัมสามารถแยก *Streptomyces* sp. 10^8 ซี.เอฟ.ยู (CFU : Colony-forming unit) และ *Micromonospora* sp. 10^4 – 10^5 ซี.เอฟ.ยู นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทีสยังมีความสำคัญทางการแพทย์และเทคโนโลยีชีวภาพ นั่นคือเป็นแหล่งผลิตสารเมตาบอไลต์ที่สำคัญได้แก่ สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ เป็นต้น (Labeda and Shearer, 1990)

แอกติโนฟาจ (Actinophage)

แอกติโนฟาจ คือ ฟาจที่สามารถเกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียที่เรียกลุ่มแอกติโนมายซีทีส (actinomycetes) มีการศึกษาครั้งแรกโดย Wieringa และ Wiebols ในปี 1936 (Dowding, 1973) การศึกษาแอกติโนฟาจส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาแอกติโนฟาจที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อกับสเตรปโตมัซีทีส (Streptomyces) เช่น ฟาจ ϕ C31, R4 และ SH10 เป็นต้น ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากนักวิทยาศาสตร์มีความสนใจที่จะพัฒนาแอกติโนฟาจเป็นพาหะสำหรับงานด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ของสเตรปโตมัซีทีส (Donadio *et al.*, 1986 ; Kuhn *et al.*, 1987 ; Diaz *et al.*, 1989)

นอกจากนี้ยังมีแอกติโนฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแอกติโนมายซีทีสกลุ่มอื่น เช่น ϕ FR114, ϕ FR113 และ ϕ FR371 แยกมาจาก *Faenia rectivirigula* (Schneider *et al.*, 1987) ϕ -115A แยกจาก *Thermoactinomyces* sp. และ ϕ -150A แยกจาก *Micropolyspora* sp. (Kurup and Heinzen., 1978)

Ackermann และคณะ (1985) ให้ความหมายของแอกติโนฟาจว่า นอกจากเป็นฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียที่เรียกลุ่มแอกติโนมายซีทีสแล้ว ยังรวมถึงฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแอกติโนมายซีทีสด้วย เช่น *Corynebacteria* และ *Propionibacteria* เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของแอกติโนฟาจที่เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียที่ไม่อยู่ในกลุ่มแอกติโนมายซีทีส (Ackermann *et al.*, 1985)

แบคทีเรีย	ชนิดแอกติโนฟาจ
<i>Corynebacterium</i> sp.	β , A
<i>Arthobacter</i> sp.	Arp, ϕ AG8010, AN25-S1
<i>Kurthia</i> sp.	7/26
<i>Propionibacterium</i> sp.	P-a-1
<i>Actinomyces</i> sp.	AV-1
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bir
<i>Mycobacterium</i> sp.	13, lacticola, Leo R1-Myb

การศึกษาแอกติโนฟาจในดิน

เนื่องจากกลุ่มของแอกติโนมัยซิทีสที่พบมากที่สุด在地面คือ สเตรปโตมัยซิทีส ดังนั้น การศึกษาแอกติโนฟาจที่อาศัยอยู่ในดินจึงมุ่งเน้นไปที่แอกติโนฟาจที่มีความจำเพาะกับสเตรปโตมัยซิทีสนั่นเอง แอกติโนฟาจหลายตัวถูกแยกจากสิ่งแวดล้อมธรรมชาติและนำไปศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ แต่การศึกษาเกี่ยวกับการดำรงชีวิตของฟาจในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติยังมีน้อยมาก (Herron and Wellington, 1990)

Sykes และ Williams (1978) พบว่าแอกติโนฟาจจำนวนมากกว่า 60 เพอร์เซ็นต์ที่แยกจากดินนั้นจะถูกดูดซับไว้ด้วยอนุภาคเคโอลิไนท์ (kaolinite) ที่อยู่ในดิน

Sykes และคณะ (1981) พบว่าแอกติโนฟาจจะมีความเสถียรอยู่ในดินที่มีความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.5 ถึง 9.0 และแอกติวิตีของแอกติโนฟาจจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในดินที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงกว่านี้ แอกติโนฟาจจะดำรงชีวิตอยู่ในดินได้ดีเมื่อดินนั้นมีความเป็นกรด-ด่างเป็นกลางและสามารถดำรงชีวิตได้ช่วงระยะหนึ่งเมื่อดินมีความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการศึกษาการดำรงชีวิตของแอกติโนฟาจที่เป็นอนุภาคอิสระในดิน ซึ่ง Reaney และคณะ (1983) รายงานว่าในความเป็นจริงแล้วมีความเป็นไปได้มากที่ฟาจส่วนใหญ่ในธรรมชาติจะดำรงชีวิตในรูปของไลโซเจน ดังนั้น Herron และ Wellington (1990) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของสเตรปโตมัยซิทีสและแอกติโนฟาจในดิน โดยการนำสปอร์ของสเตรปโตมัยซิทีสและแอกติโนฟาจที่มีความจำเพาะกัน ใส่ลงไปในดิน 2 ชนิด คือ ดินที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อที่มีการเติมไคติน (chitin) และแป้ง (soluble starch) บ่มทิ้งไว้ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าในช่วงแรกของการทดลองในดินทั้งสองชนิดจะมีสารอาหารจำนวนมาก สเตรปโตมัยซิทีสเกิดการออกเป็นมัยซีเลียมและเกิดการติดเชื้อโดยแอกติโนฟาจ ทำให้ในช่วงนี้ตรวจพบปริมาณแอกติโนฟาจอิสระจำนวนมาก แต่หลังจากบ่มไว้หลายวันในดินที่มีการฆ่าเชื้อปริมาณสารอาหารลดลง การเจริญของสเตรปโตมัยซิทีสเข้าสู่ช่วงการเป็นสปอร์ (sporulation) โดยในช่วงนี้จะพบแอกติโนฟาจในรูปของไลโซเจนและจะตรวจพบไปจนถึงวันที่ 60 ของการ ทดลอง แต่ในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อไม่สามารถตรวจหาไลโซเจนได้ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าในดินนั้นมีสารอาหารเพียงพอจากการดำรงชีวิตร่วมกันของจุลินทรีย์หลายชนิดในดิน ซึ่งทำให้สเตรปโตมัยซิทีส มีการเจริญในช่วงมัยซีเลียมสั้นและไม่เข้าสู่ช่วงการเป็นสปอร์ จึงพบแต่การเพิ่มจำนวนของอนุภาคแอกติโนฟาจอิสระ ซึ่ง Herron และ Wellington ได้สรุปว่าเทมเพอเรตฟาจสามารถถ่ายถอดยีนไปสู่ประชากรของสเตรปโตมัยซิทีสได้ในดินที่มีไลโซเจนเซลล์ที่มีความทนทาน และสามารถเกิดการกระจายของยีนไปสู่สเตรปโตมัยซิทีสด้วยการปล่อยอนุภาคฟาจโดยวิธีธรรมชาติ (spontaneous release) ในช่วงเวลาที่ดินมีสารอาหารเพียงพอ (Herron and Wellington, 1990)

การแยกแอคติโนฟาจจากดิน

การแยกแอคติโนฟาจจากดินสามารถทำได้ 2 วิธีคือ วิธีการนับจำนวนโดยตรง และวิธีส่งเสริมการเจริญ ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้จะตรวจสอบอนุภาคแอคติโนฟาจโดยอาศัยการแตกของไฮสท์จากการทำอาหารวุ้นสองชั้น

วิธีการนับจำนวนโดยตรง (direct counts)

เป็นวิธีที่ประมาณจำนวนของแอคติโนฟาจที่มีชีวิตอยู่ต่อน้ำหนักดิน โดยนำตัวอย่างดินที่ทราบน้ำหนักมาทำการเจือจางและกำจัดแบคทีเรียออกไปด้วยวิธีการกรองหรือทำลายเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อของแอคติโนฟาจกับไฮสท์ที่คาดว่าจะเกิดการติดเชื้อหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ซึ่งจำนวนพลาัคที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงจำนวนอนุภาคแอคติโนฟาจในดินที่จำเพาะกับไฮสท์ที่ใช้ ดังนั้นการแยกแอคติโนฟาจด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับทางเลือกชนิดสายพันธุ์ของไฮสท์ที่ใช้ (Williams *et al.*, 1987 ; Williams, 1994) แต่การแยกและนับจำนวนฟาจจากดินด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ว่า ถ้าฟาจในดินมีปริมาณต่ำมากจะไม่สามารถแยกฟาจได้ (Sykes and Williams, 1978)

วิธีส่งเสริมการเจริญ (enrichment procedures)

เป็นวิธีที่อาศัยกระบวนการบ่ม (incubation) ของตัวอย่างดินในอาหารเหลวกับไฮสท์สายพันธุ์ที่ต้องการให้เกิดการติดเชื้อในความเข้มข้นสูง ช่วงเวลาที่ใช้ในกระบวนการบ่มนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของไฮสท์ที่ต้องการแยกแอคติโนฟาจ หลังจากบ่มแล้วแยกอนุภาคดินออก และนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปกำจัดแบคทีเรียออกด้วยการกรองหรือทำลายเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม ตรวจสอบการติดเชื้อของอนุภาคแอคติโนฟาจกับไฮสท์สายพันธุ์ที่ทำการบ่ม วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพในการแยกฟาจในดินที่จำเพาะกับไฮสท์ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Rhizobium* sp. เป็นต้น (Williams *et al.*, 1987)

สำหรับการแยกแอคติโนฟาจที่จำเพาะกับแอคติโนมัยซีทีสในดินส่วนใหญ่จะใช้วิธีส่งเสริมการเจริญ โดยนำตัวอย่างดินมาบ่มกับสปอร์หรือมัยซีเลียของแอคติโนมัยซีทีสที่ต้องการแยกฟาจในอาหารเหลว ทำการเขย่าที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบแอคติโนฟาจด้วยการทำอาหารวุ้นสองชั้น (Dowding, 1973 ; Anne *et al.*, 1984 ; Greene and Goldberg, 1985) นอกจากนี้อาหารเหลวที่ใช้บ่มตัวอย่างดินอาจมีการเติมแร่ธาตุ สารอาหาร และสารปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกแอคติโนฟาจ (Diaz *et al.*, 1989)

ลักษณะเฉพาะทั่วไปของแอคติโนฟาจ

การศึกษาลักษณะเฉพาะของฟาจที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งรวมถึงแอคติโนฟาจนั้น จะอาศัยหลักเกณฑ์ในการศึกษาดังนี้ คือ ลักษณะของพลาัค การเป็นไลโซเจนของไฮสท์ รูปร่างอนุภาคแอคติโนฟาจ และหลักเกณฑ์อื่นๆ เช่น การทนต่อคลอโรฟอร์ม ค่าความเป็นกรด-ด่างและ

อุณหภูมิต่างๆ ชนิดของกรดนิวคลีอิก เป็นต้น เพื่อนำลักษณะเฉพาะนี้ไปใช้ในการจัดหมวดหมู่ฟาจ และเป็นข้อมูลในการศึกษาฟาจทางด้านพันธุศาสตร์ต่อไป (Goyal, 1987)

ลักษณะของพลาัค

เมื่อทำการตรวจสอบแอกติโนฟาจด้วยการทำอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าฟาจแต่ละชนิดจะให้พลาัคที่มีรูปร่าง และความขุ่นของพลาัคแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ความแตกต่างนี้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกฟาจได้ การศึกษารูปร่างของพลาัคจะดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพลาัค และลักษณะขอบของพลาัค ส่วนความขุ่นของพลาัคมี 2 ลักษณะเช่นเดียวกับฟาจทั่วไป คือ พลาัคที่มีลักษณะใสซึ่งเป็นลักษณะของไวรัลเลนส์ฟาจ และพลาัคที่มีไฮสท์เซลล์เจริญอยู่กลางพลาัคซึ่งเป็นลักษณะของเทมเพอเรตฟาจ (Clair and McCoy, 1958 ; Dowding and Hopwood, 1973)

การเป็นไลโซเจนของไฮสท์

เป็นการตรวจสอบการเป็นไลโซเจนิกของไฮสท์หรือโปรฟาจ โดยนำไฮสท์ที่เจริญกลางพลาัคของพลาัคที่มีลักษณะขุ่นมาทำการเพิ่มจำนวน ตรวจสอบการมีภูมิคุ้มกัน นั่นคือไม่เกิดการติดเชื้อซ้ำจากฟาจตัวเดิม (Stuttard, 1982) และการตรวจสอบการชักนำโปรฟาจเข้าสู่ไลติคไซเคิล (Chater and Carter., 1979 ; Schneider *et al.*, 1990 ; Maloy *et al.*, 1994)

การศึกษารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจ

การศึกษารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจจะศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านด้วยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟ (negative staining) โดยจะทำการย้อมด้วยยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) (Chater and Carter, 1979 ; Stuttard and Dwyer, 1981) หรือโพแทสเซียม ฟอสโฟทังสเตต (potassium phosphotungstate) (Dowding, 1973 ; Hranueli *et al.*, 1979)

Ackermann และคณะ (1985) ทำการรวบรวมแอกติโนฟาจที่จำเพาะกับแอกติโนมัยซีทีสหลายจีโนส เพื่อนำมาจัดจำแนกหมวดหมู่ พบว่ารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจเป็นแบบรูปทรงไอโคซาฮีดรัลที่มีส่วนหาง ไม่พบแบบรูปทรงไอโคซาฮีดรัลที่ไม่มีส่วนหางหรือรูปร่างแบบสายยาว Ackermann และคณะ ได้จัดหมวดหมู่แอกติโนฟาจโดยใช้รูปร่างของอนุภาคเป็นเกณฑ์พบว่าอยู่ในกลุ่ม A1, A2, B1, B2, C1 และ C2 ซึ่งตรงกับการจัดจำแนกกลุ่มของฟาจโดยวิธีของ Bradley (1967) ในกลุ่ม A, B และ C

ความสำคัญของแอกติโนฟาจ

เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทีส มีความสามารถในการผลิตสารเมทาบอลไลท์ได้หลายชนิดโดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ การศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ของแอกติโนมัยซีทีสจึงมุ่งเน้นทางด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อให้สามารถผลิตสารเมทาบอลไลท์ที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งสามารถพัฒนาสารเมทาบอลไลท์ชนิดใหม่ได้ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจในการนำแอกติโนฟาจมาพัฒนาเป็นพาหะเช่น ϕ C31, R4, SH10, TGI และ ϕ SF1 (Diaz *et al.*, 1989) แอกติโนฟาจที่ได้พัฒนาเป็นพาหะที่ถูกนำมาศึกษามากที่สุดคือ ϕ C31 (Hartley *et al.*, 1994) ซึ่งเป็นเทมเพอเรตฟาจที่แยกจาก *Streptomyces coelicolor* A3(2) รูปร่างของอนุภาคประกอบด้วยส่วนหัวรูปทรงไอโคซาฮีดรัลมีส่วนหางที่ยาว เมื่อนำอนุภาคมาจัดจำแนกตามวิธีการจัดกลุ่มของ Bradley พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม B (Lomovskaya *et al.*, 1980) มีรายงานถึงการศึกษา ϕ C31 เพื่อพัฒนาเป็นพาหะจำนวนมาก เช่น การศึกษาแผนที่ยีน การถอดรหัสและการแสดงออกของยีนของฟาจ ϕ C31 ในสเตรปโตมัยซีทีส เป็นต้น (Harris *et al.*, 1983 ; Smith *et al.*, 1992 ; Howe and Smith, 1996)

แอกติโนฟาจยังมีประโยชน์ในการนำมาใช้จัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสจิ้นส์ต่างๆ เป็นเครื่องมือตรวจสอบและอธิบายเรื่องเกี่ยวกับระบบป้องกันภายในตัวโฮสต์เซลล์ของแบคทีเรียหรือ host controlled restriction-modification system ฟาจมีประโยชน์ใช้ในการศึกษาชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) แต่บางชนิดก็ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านอุตสาหกรรมการหมักของแอกติโนมัยซีทีสด้วย (Lomovskaya *et al.*, 1980 ; Anne *et al.*, 1984) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาสภาพการดำรงชีวิตของแอกติโนฟาจในดินเพื่อใช้เป็นข้อมูลทำความเข้าใจเกี่ยวกับการถ่ายทอดยีนระหว่างโฮสต์เซลล์ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน (Herron and Wellington, 1990)

จากความสำคัญของฟาจดังกล่าว ก่อให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาแอกติโนฟาจ อีกทั้งปัจจุบันรายงานการศึกษาเบื้องต้นของแอกติโนฟาจมีน้อย สำหรับประเทศไทยจะมีการศึกษากันในกลุ่มคณะวิจัยของ รศ.ดร.สุรีนา ชวนิชย์ เท่านั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาแอกติโนฟาจที่ได้จากดินแหล่งต่างๆในประเทศ โดยขั้นต้นจะทำการแยกแอกติโนมัยซีทีสและแอกติโนฟาจจากดิน ซึ่งการแยกแอกติโนฟาจจะใช้วิธีส่งเสริมการเจริญ จากนั้นทำการศึกษาลักษณะเฉพาะของแอกติโนฟาจ เช่น ลักษณะของพลาซมิดซึ่งตรวจสอบด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารรุ่นสองชั้น ศึกษารูปร่างลักษณะอนุภาคของแอกติโนฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) ด้วยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟ (negative staining) ผลการศึกษาลักษณะและการจัดจำแนกหมวดหมู่ของแอกติโนฟาจที่แยกได้จากดินจะเป็นข้อมูลที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาฟาจเวคเตอร์ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมของแอกติโนมัยซีทีส อันจะนำไปสู่การให้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม การแพทย์และสาขาอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะและการจัดจำแนกหมวดหมู่แอกติโนฟาจที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อมัยยิตที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศ

ขั้นตอนการวิจัย

1. แยกแอกติโนมัยยิตที่สจากดิน
2. แยกแอกติโนฟาจจากดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ
3. ตรวจสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อมัยยิตที่แยกได้ด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารรูนสองชั้น
4. การทำฟาจให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณแอกติโนฟาจ
5. ศึกษาลักษณะของแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D-0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific supply Co.Ltd., Thailand.
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น R-88 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) model HERTZ บริษัท Kubota Corporation, Japan.
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Aquatherm G-86 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.
- เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น vortex-2 Genie model G-560E บริษัท Scientific Industries., U.S.A.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.
- แผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate filter) Pore size 0.45 μ M บริษัท Sartorius, Germany.
- หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand.

- ซีมาซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร บริษัท Boeco, West Germany.
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) รุ่น SZH-10 บริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan.
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan.
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) รุ่น JEOL model JEM-200CX , Japan.
- Swinnex Filter Unit บริษัท Millipore Corporation, USA.

2. สารเคมี

- กรดฮิวมิก (humic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไบโอดีน (biotin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไรโบเฟลวิน (riboflavin) บริษัท Merck, Germany.
- ไนอะซิน (niacin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไพริดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แมนนิทอล (mannitol) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) บริษัท Fluka Chemika, Switzerland.

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกแอคติโนมัยซีทีสจากดิน

1.1 ดินตัวอย่าง

1.1.1 การเก็บดินตัวอย่าง

เก็บดินตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆของประเทศไทยประมาณ 30-100 กรัม โดยเก็บลึกจากผิวดินประมาณ 7-10 เซนติเมตร บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะและสีของดิน นำมาเก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

ชั่งดินตัวอย่าง 5 กรัม เติมน้ำกลั่นค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งสารแขวนลอยดินให้ตกตะกอน นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Lanning and Williams, 1982)

1.2 การแยกแอคติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง

นำดินตัวอย่าง 1 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เจือจางสารแขวนลอยดินให้มีค่าลดจางระดับสิบเท่า (serial ten fold dilution) ประมาณห้าระดับ (10^{-1} - 10^{-5}) และนำสารแขวนลอยดินแต่ละระดับการเจือจางไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตร สเปรด (spread) บนอาหารฮิวมิก แอซิด วิตามิน อการ์ (Humic acid Vitamin agar) (Hayakawa and Nonomura, 1987) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วโดยโคโลนีจะมีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กบนผิวน้ำอาหารร่วน ทำการถ่ายเชื้อมาขีดลงบนอาหารเอ็มเอ็ม อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

1.3 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ขีดแอคติโนมัยซีทีสจากข้อ 1.2 ลงบนอาหารร่วนเอ็มเอ็ม อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญจนมีสปอร์มากพอ เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตรลงไป ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย แล้วนำไปกรองด้วยสำลีปลอดเชื้อ ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ เก็บรักษาสปอร์แขวนลอยที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4 การศึกษาลักษณะของแอกติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากดิน

1.4.1 ศึกษาสีของโคโลนีและสปอร์

ขีดแอกติโนมัยซิทีสลงบนอาหารอินออร์แกนิก ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salt Starch Agar) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตสีของโคโลนีและสปอร์ที่เกิดขึ้น

1.4.2 ศึกษาลักษณะของมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์

นำเชื้อแอกติโนมัยซิทีสมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีการทำสไลด์คัลเจอร์ (slide culture) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน นำมาย้อมด้วยแลคโตฟีโนล (lactophenol) ศึกษาลักษณะของมัยซีเลียม การเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2. การแยกแอกติโนฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมัยซีทีสโดยวิธีส่งเสริมการเจริญ (enrichment method)

นำตัวอย่างดิน 25 กรัม ใส่ในนิวเตรียนท์บรอก 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมสปอร์แขวนลอยของแอกติโนมัยซิทีสที่แยกจากดินตัวอย่างเดียวกันนี้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกดินออกโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใส (supernatant) ไปกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Dowding, 1973) ได้ส่วนน้ำใสของแอกติโนฟาจแขวนลอย (actinophage suspension) จากนั้นนำไปตรวจสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อของแอกติโนฟาจด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น

3. ตรวจสอบการติดเชื้อของแอกติโนฟาจด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น

นำแอกติโนฟาจแขวนลอยเจือจางด้วยนิวเตรียนท์บรอกให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5} จากนั้นนำส่วนน้ำใสแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตรและสปอร์แขวนลอยของแอกติโนมัยซิทีสสายพันธุ์เดียวกันกับที่ทำการแยกแอกติโนฟาจในข้อ 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมนลงในสลีปปีอการ์ ผสมให้เข้ากัน เทลงบนนิวเตรียนท์ อการ์ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อของแอกติโนฟาจกับแอกติโนมัยซิทีสจากการเกิดพลาัค (Dowding, 1973; Lanning and Williams, 1982; Anne *et al.*, 1984)

4. การทำฟาจให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณแอกติโนฟาจ

นำแอกติโนฟาจแขวนลอยที่ได้จากข้อ 3 ของระดับการเจือจางที่ให้ฟลัคปริมาณที่เหมาะสมทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น โดยเพิ่มปริมาณจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น 15-20 จาน เติมนิวเตรียนท์บรอกพลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เกิดฟลัค เขย่าจานเพาะเลี้ยงเชื้อทุก 15 นาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อมารองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตดขนาด 0.45 ไมโครเมตร ได้ปริมาณแอกติโนฟาจที่เพิ่มมากขึ้น เก็บแอกติโนฟาจที่แขวนลอยในนิวเตรียนท์บรอกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การศึกษาแอกติโนฟาจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ทำการตกตะกอนแอกติโนฟาจแขวนลอยจากข้อ 4 ด้วยโซเดียมคลอไรด์และโพลีเอทิลีนไกลคอล (ปรับปริมาตรทั้งหมดของสารละลายให้เป็น 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์และ 10 เปอร์เซ็นต์โพลีเอทิลีนไกลคอล) บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 (Ammonium acetate buffer)

หยดแอกติโนฟาจในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดลงบนกริด (grid) และย้อมด้วยวิธีเนกาทีฟ สเทนนิ่ง (negative staining) โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ยูรานิลอะซิเตด (uranyl acetate) จากนั้นนำไปศึกษารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Dowding, 1973 ; Kuhn *et al.*, 1987)

ผลการวิจัย

1. การแยกและศึกษาลักษณะแอกติโนมัยซิทีสจากดิน

1.1 ลักษณะของดินตัวอย่าง

ทำการเก็บดินตัวอย่างจาก 13 จังหวัดในประเทศไทย จำนวน 18 ตัวอย่าง โดยดินตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้มีเนื้อดิน สี แตกต่างกัน ดินตัวอย่างส่วนใหญ่เก็บในบริเวณที่มีการเกษตรกรรม เช่น นาข้าว สวนผลไม้ เป็นต้น และบริเวณที่มีต้นไม้หรือวัชพืชขึ้นปกคลุมอยู่ ทำให้มีเศษซากไม้ปะปนด้วย เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดินทั้งหมดที่เก็บได้พบว่าตัวอย่างดินมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.50 ถึง 9.10 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งที่มา และค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	แหล่งที่มา	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
1	แปลงข้าวโพด อ.เมือง จ.ลพบุรี	8.91
2	ไต้ต้นมะม่วง อ.เมือง จ.ลพบุรี	6.49
3	บริเวณนาข้าว อ.โคกเจริญ จ.ลพบุรี	8.92
4	บริเวณสวนผลไม้ อ.โคกเจริญ จ.ลพบุรี	8.88
5	ไต้ต้นไม้ อ.เมือง จ.ระยอง	6.99
6	ไต้ต้นไม้ อ.ไพศาลี จ.นครสวรรค์	5.56
7	บริเวณไร่ข้าวโพด อ.ศรีเทพ จ.เพชรบูรณ์	8.04
8	ไต้ต้นไม้ สุขุมวิท 31 คลองเตย กรุงเทพฯ	7.78
9	สวนผลไม้ อ.เมือง จ.ชัยนาท	6.05
10	บริเวณนาข้าว อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	4.50
11	สวนน้อยหน้า อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี	6.65
12	ไต้ต้นไม้ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	8.82
13	ไต้ต้นไม้ อ.เมือง จ.ชุมพร	7.02
14	บริเวณใกล้ชายหาด อ.เมือง จ.ภูเก็ต	7.93
15	บริเวณแม่น้ำชี จ.ยโสธร	6.33
16	ไต้ต้นไม้ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	9.10
17	บริเวณแม่น้ำทวน จ.ยโสธร	6.20
18	แปลงผัก อ.เมือง จ.นครราชสีมา	5.79

1.2 การศึกษาลักษณะของแอกติโนมายซีทีสที่แยกจากดิน

ทำการแยกแอกติโนมายซีทีสจากดินตัวอย่าง 18 ตัวอย่างโดยใช้อาหารฮิวมิก แอซิด วิตามิน อการ์ พบว่าสามารถแยกแอกติโนมายซีทีสได้จำนวน 50 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกัน จากนั้นนำแอกติโนมายซีทีสทั้งหมดมาศึกษาลักษณะของโคโลนี ลักษณะมายซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์

ลักษณะ สีของโคโลนีและสปอร์

โคโลนีของแอกติโนมายซีทีสมีลักษณะนูนบนผิวอาหารและขรุขระ เมื่อเจริญเต็มที่สปอร์ขึ้นปกคลุมโคโลนี สีของโคโลนีมีสีต่างๆ ดังนี้คือ เหลือง เทา น้ำตาล ขาว ชมพู และแดง ส่วนสีของสปอร์ได้แก่ เทา ขาว เหลือง น้ำตาล และดำ แอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะมีสีของโคโลนีและสปอร์จะแตกต่างกัน แต่หลายสายพันธุ์พบว่ามียีสเดียวกัน นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุได้ทำให้เกิดสีในอาหาร

ลักษณะของมายซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์

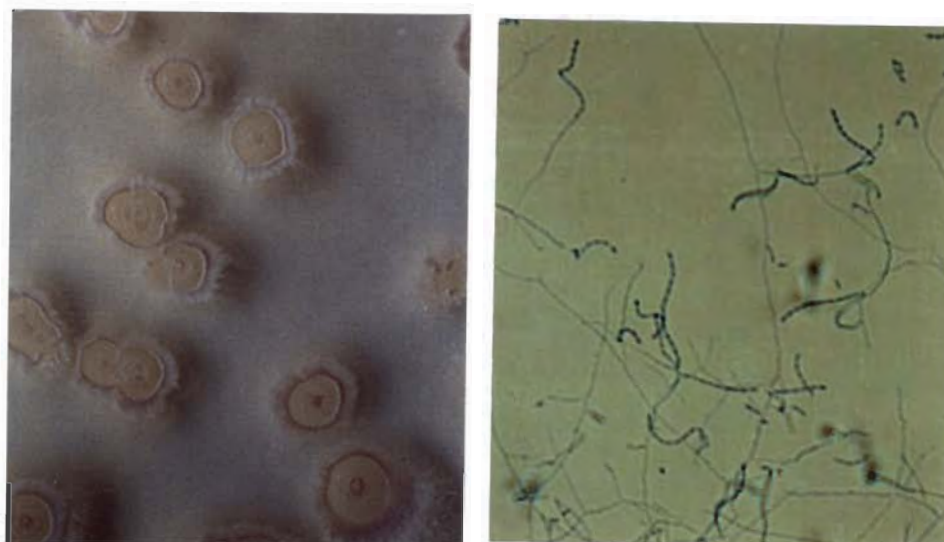
จากการตรวจสอบรูปร่างของแอกติโนมายซีทีสด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะเป็นมายซีเลียมที่มีการแตกแขนงเป็นสายสั้นและยาวและไม่มีผนังกัน ลักษณะของสปอร์มีการเรียงต่อกันเป็นสายยาวจำนวนตั้งแต่ 2 ถึง 20 สปอร์หรือมากกว่านั้น สายสปอร์ของแอกติโนมายซีทีสแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันคือ มีลักษณะเป็นสายตรง โค้งงอ และม้วนเป็นเกลียว การเรียงตัวกันของสปอร์พบว่าเกิดขึ้นบริเวณปลายของมายซีเลียมและมีบางส่วนหลุดออกจากมายซีเลียม

2. การแยกแอกติโนฟาจจากดินด้วยวิธีการส่งเสริมการเจริญ

จากการนำแอกติโนมายซีทีสที่แยกได้จากดินจำนวน 50 สายพันธุ์มาเป็นโฮสต์ในการแยกแอกติโนฟาจด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ พบว่ามีแอกติโนมายซีทีสจำนวน 12 สายพันธุ์ที่มีการติดเชื้อจากแอกติโนฟาจโดยดูจากการเกิดฟลัค ดังนั้นจึงสามารถแยกแอกติโนฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแอกติโนมายซีทีสจำนวน 12 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 และลักษณะของโคโลนี การเรียงตัวของมายซีเลียมและสายสปอร์ของแอกติโนมายซีทีสทั้ง 12 สายพันธุ์แสดงดังรูปที่ 5-16

ตารางที่ 3 แอกติโนฟาจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากดิน

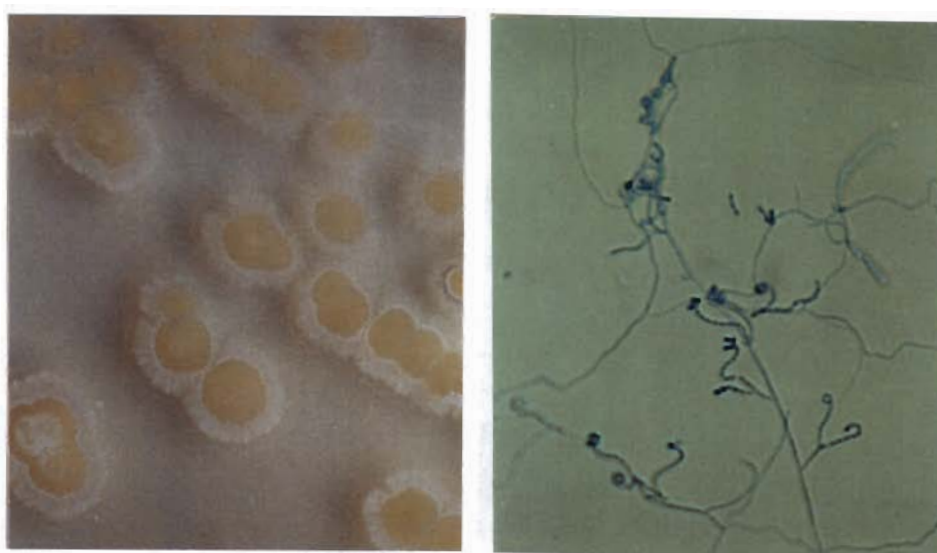
ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอกติโนมายซีทีส	ชนิดแอกติโนฟาจ	ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอกติโนมายซีทีส	ชนิดแอกติโนฟาจ
5	S5-1	Ac1	9	S9-2	Ac7
5	S5-2	Ac2	9	S9-3	Ac8
6	S6-2	Ac3	9	S9-4	Ac9
7	S7-1	Ac4	9	S9-7	Ac10
7	S7-3	Ac5	10	S10-1	Ac11
9	S9-1	Ac6	11	S11-3	Ac12



(a)

(b)

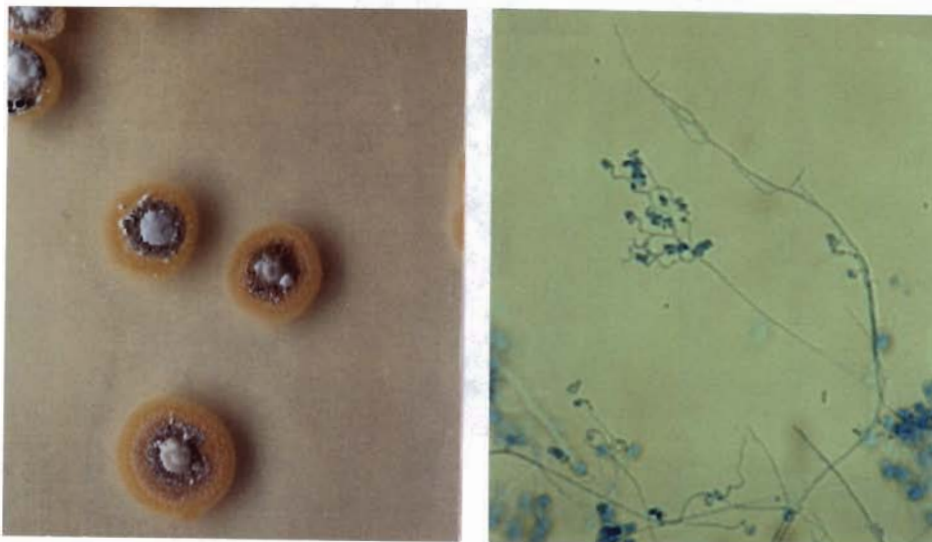
รูปที่ 5 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ S5-1



(a)

(b)

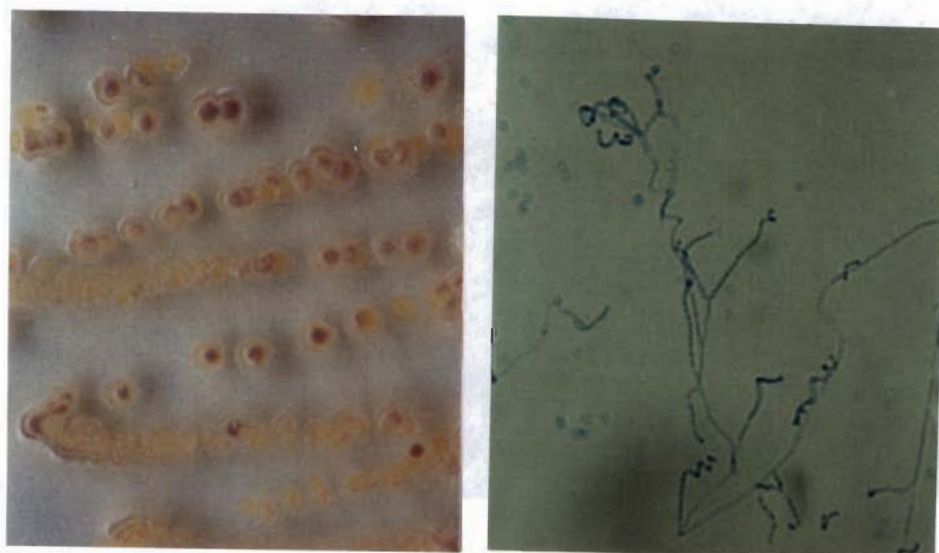
รูปที่ 6 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ S5-2



(a)

(b)

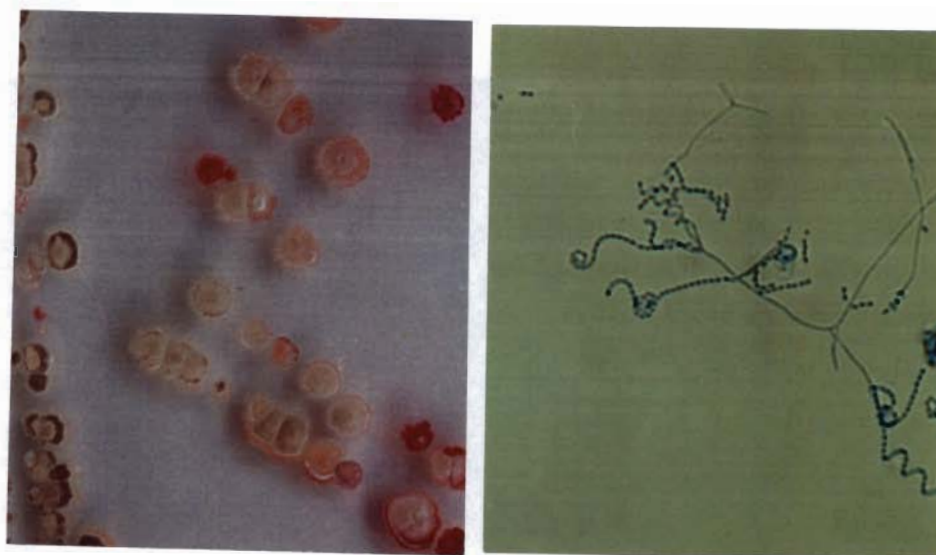
รูปที่ 7 ลักษณะของโคโคโคนี (a) รูปร่างมัยซีเลียวมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอคติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ S6-2



(a)

(b)

รูปที่ 8 ลักษณะของโคโคโคนี (a) รูปร่างมัยซีเลียวมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอคติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ S7-1

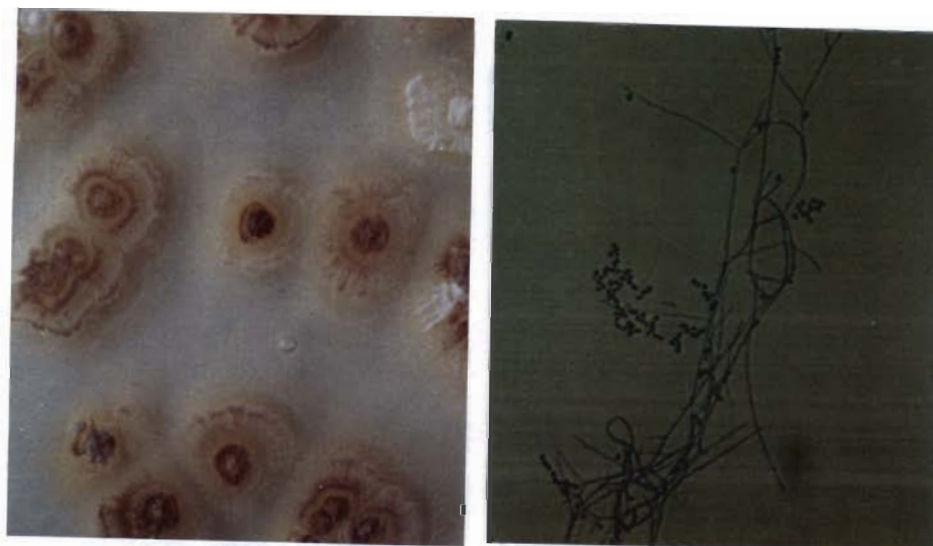


(a)

(b)

รูปที่ 9

ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัชชีเหลี่ยมและการเรียงตัวของสปอร์
(กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอคติโนมัยซีที่สสายพันธุ์ S7-3



(a)

(b)

รูปที่ 10

ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัชชีเหลี่ยมและการเรียงตัวของสปอร์
(กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอคติโนมัยซีที่สสายพันธุ์ S9-1

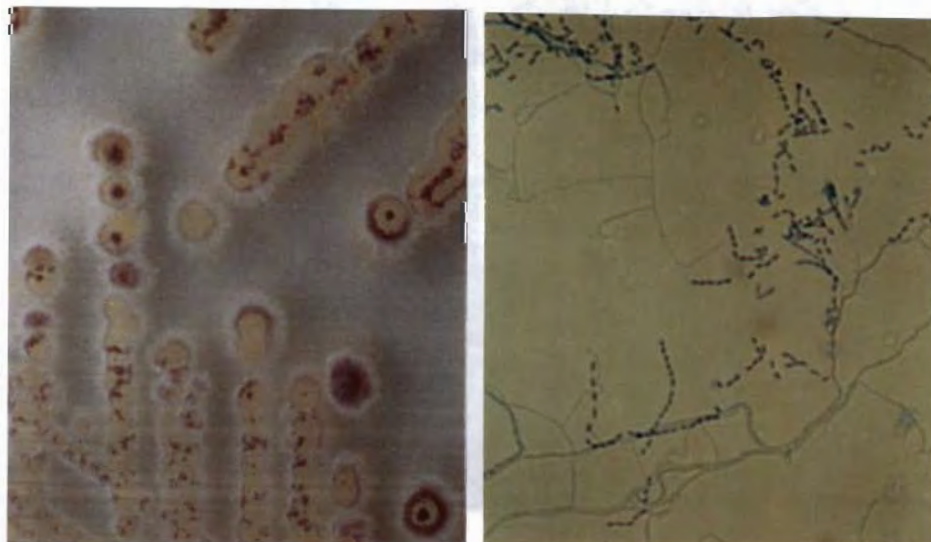


(a)

(b)

รูปที่ 11

ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเดียมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ S9-2

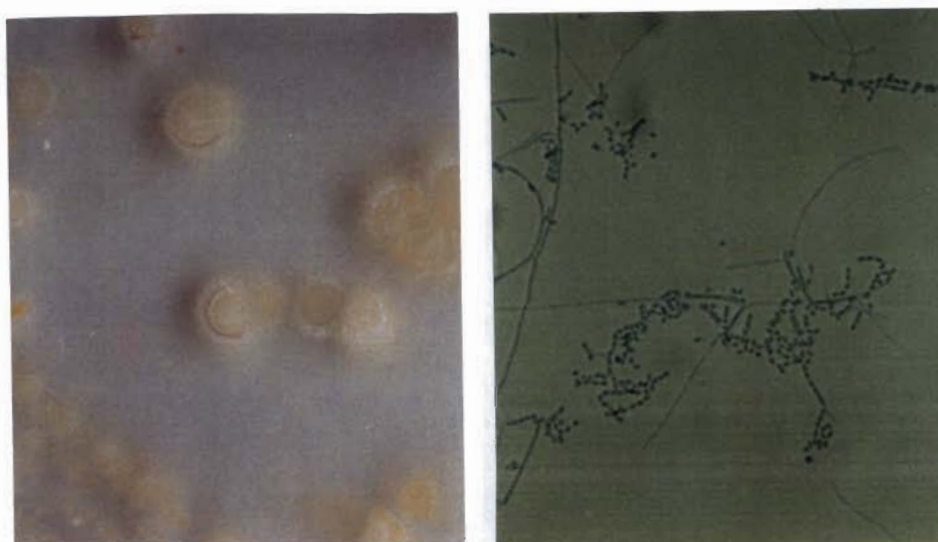


(a)

(b)

รูปที่ 12

ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเดียมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ S9-3

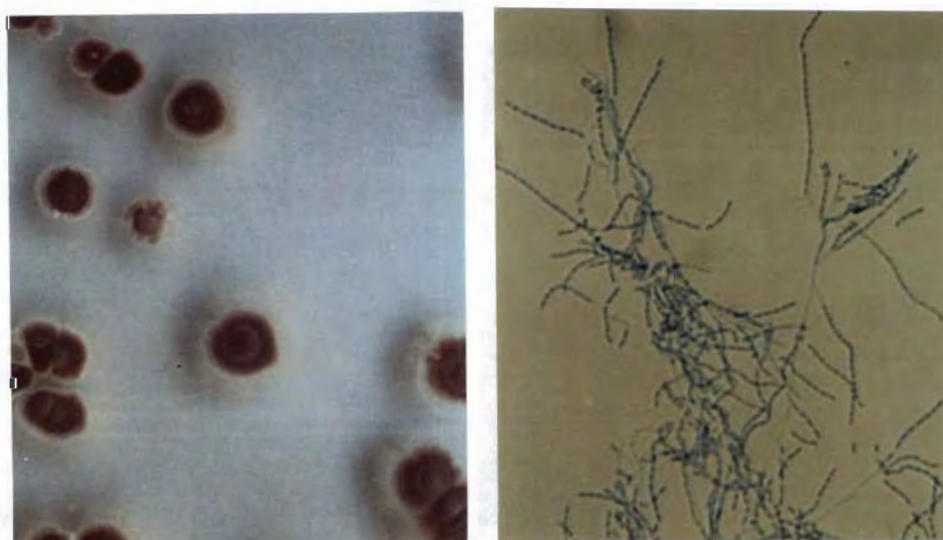


(a)

(b)

รูปที่ 13

ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัชชีเหลี่ยมและการเรียงตัวของสปอร์
(กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ S9-4

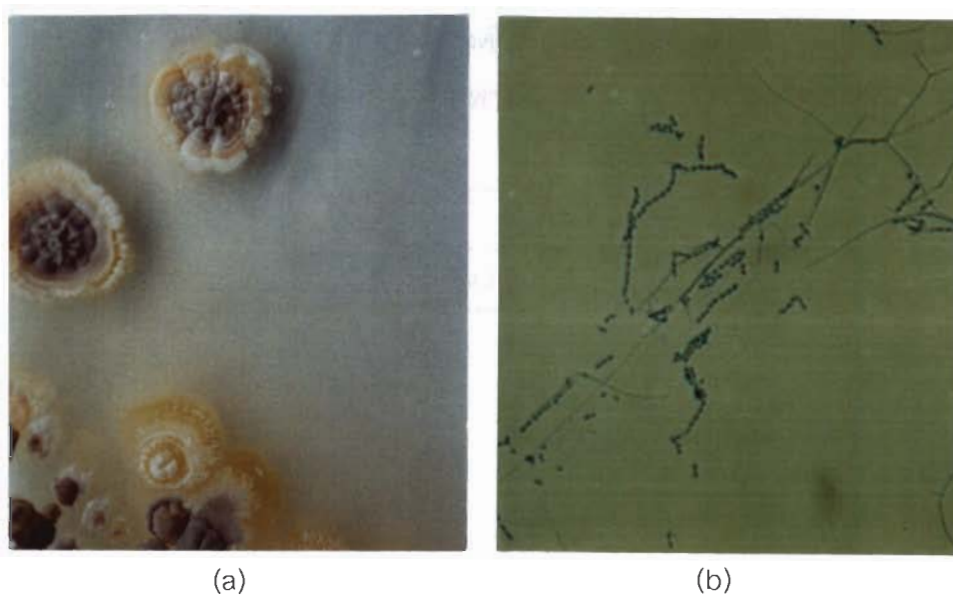


(a)

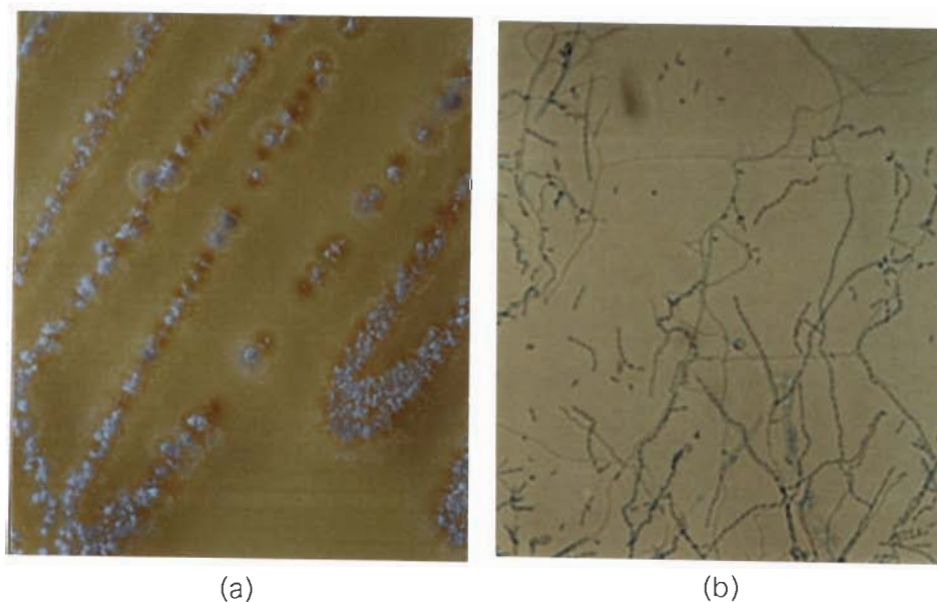
(b)

รูปที่ 14

ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัชชีเหลี่ยมและการเรียงตัวของสปอร์
(กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ S9-7



รูปที่ 15 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ S10-1



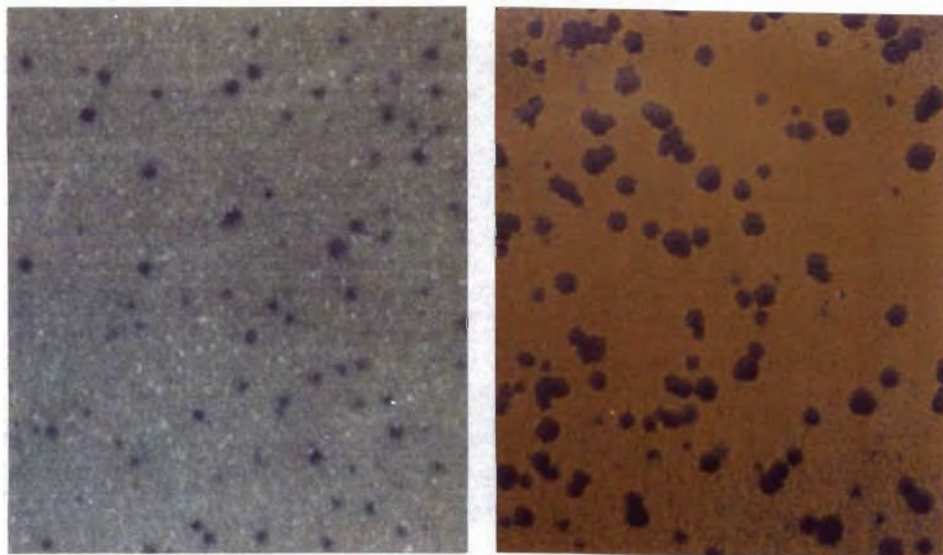
รูปที่ 16 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า) (b) ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ S11-3

3. การตรวจสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อของแอกติโนฟาจด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น

จากการตรวจสอบการติดเชื้อของแอกติโนฟาจทั้ง 12 ชนิดกับแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ที่ทำกรแยกแอกติโนฟาจชนิดนั้นๆ ด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้นพบว่าแอกติโนฟาจแต่ละชนิดจะให้พลาไคที่มีลักษณะและขนาดแตกต่างกัน ดังแสดงดังตารางที่ 4 และรูปที่ 17-22

ตารางที่ 4 ลักษณะของพลาไคของแอกติโนฟาจ Ac1 ถึง Ac12

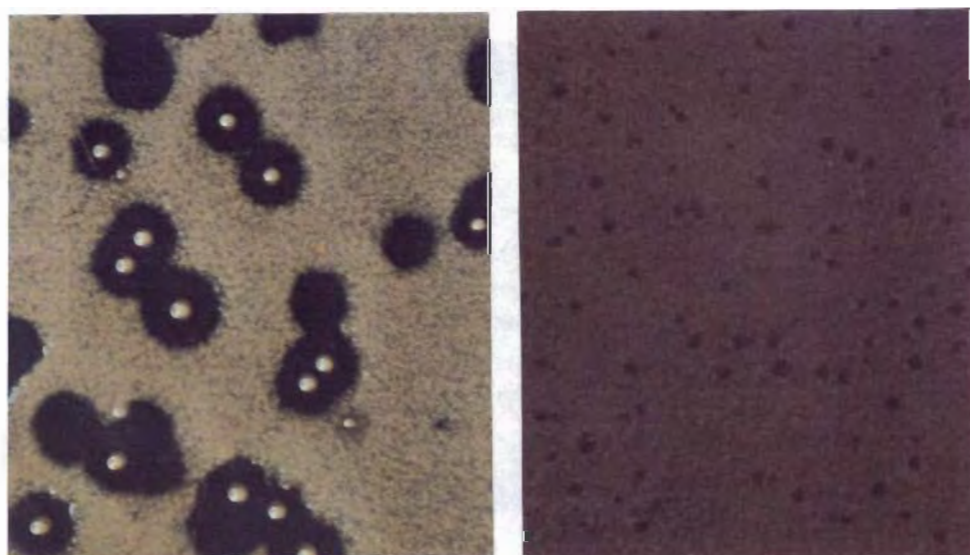
ชนิดแอกติโนฟาจ	ลักษณะของพลาไค		
	ขนาด (มม.)	ความขุ่น	ลักษณะขอบ
Ac1	1.0-2.2	ใส	เรียบ
Ac2	1.2-2.5	ใส	เรียบ
Ac3	5.0-6.5	เนื้อเจริญเป็นจุด กลางพลาไค	เรียบ
Ac4	0.5-1.2	ใส	เรียบ
Ac5	0.5-1.0	ใส	เรียบ
Ac6	1.0-1.2	ใส	เรียบ
Ac7	0.5-1.0	ใส	เรียบ
Ac8	0.6-1.5	ใส	เรียบ
Ac9	3.0-8.0	ใส	เรียบ
Ac10	1.0-1.5	ใส	เรียบ
Ac11	0.5-1.0	ใส	ไม่เรียบ
Ac12	3.5-4.0	ใส	ไม่เรียบ



Ac1

Ac2

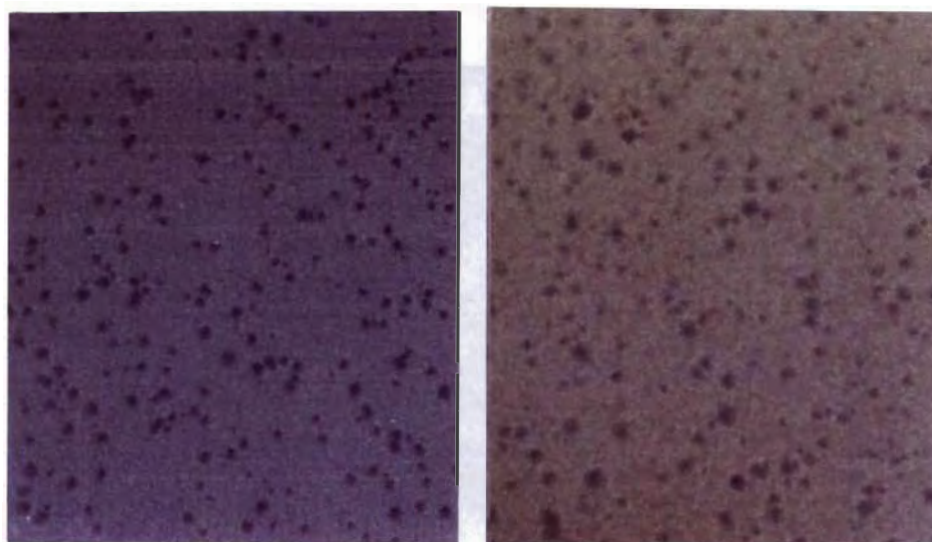
รูปที่ 17 ลักษณะของพล้ำคของแอกติโนไฟจ Ac1 และ Ac2



Ac3

Ac4

รูปที่ 18 ลักษณะของพล้ำคของแอกติโนไฟจ Ac3 และ Ac4

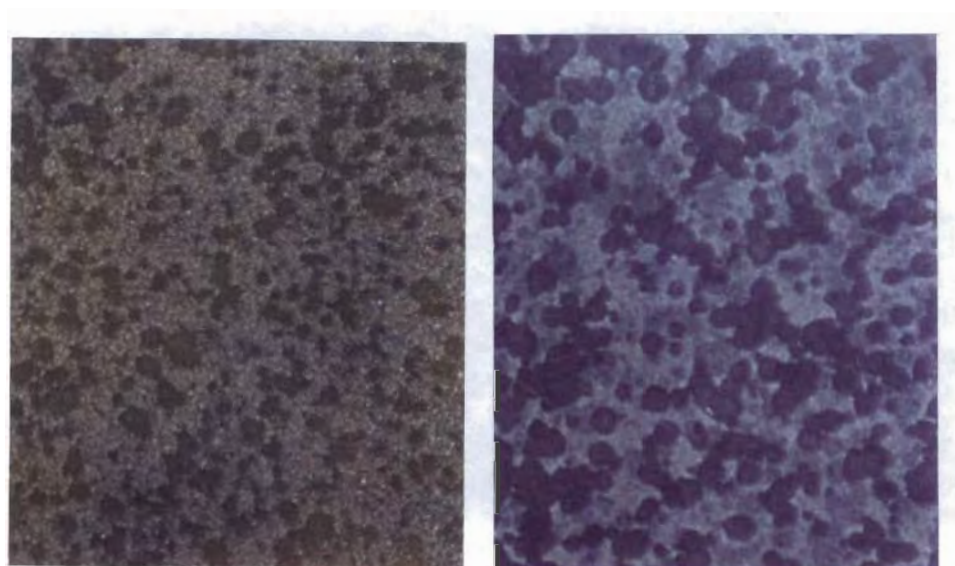


Ac5

Ac6

รูปที่ 19

ลักษณะของพลาไคของแอคทีโนฟาจ Ac5 และ Ac6

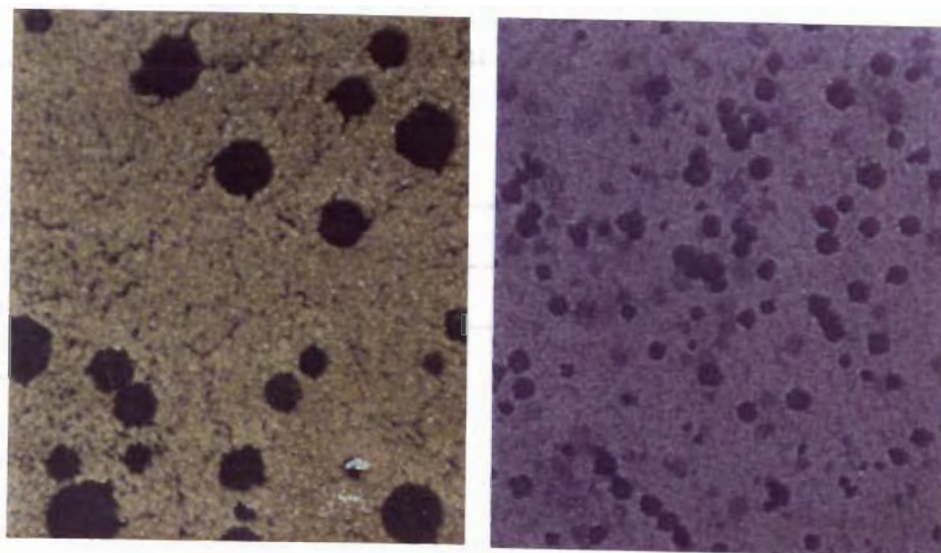


Ac7

Ac8

รูปที่ 20

ลักษณะของพลาไคของแอคทีโนฟาจ Ac7 และ Ac8

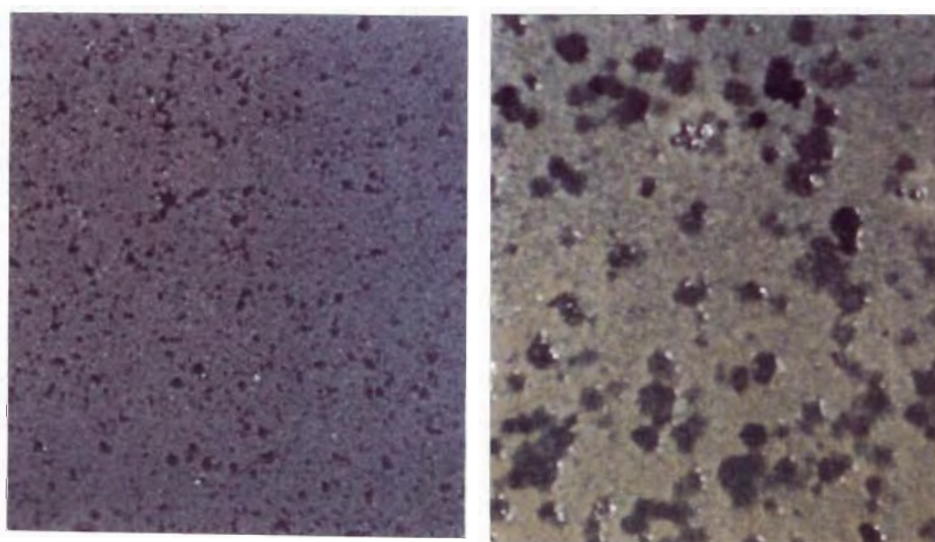


Ac9

Ac10

รูปที่ 21

ลักษณะของฟิล์มของแอคทีโนฟาจ Ac9 และ Ac10



Ac11

Ac12

รูปที่ 22

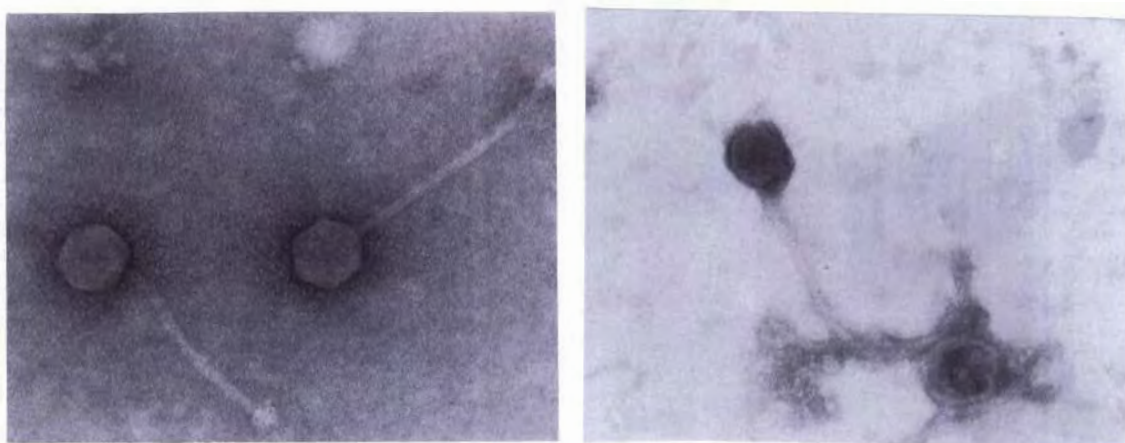
ลักษณะของฟิล์มของแอคทีโนฟาจ Ac11 และ Ac12

4. การศึกษาแอกติโนฟาจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

จากการศึกษารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ด้วยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟ พบว่าอนุภาคแอกติโนฟาจทั้งหมดมีส่วนหัวที่มีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม แอกติโนฟาจทุกชนิดมีส่วนหางที่ยาวและเป็นหางที่ไม่สามารถหดได้ ดังแสดงในรูปที่ 23-28 แอกติโนฟาจ Ac1 และ Ac5 มีโครงสร้างแผ่นฐานที่บริเวณปลายส่วนหาง ขนาดของส่วนหัวและส่วนหางของแอกติโนฟาจแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ขนาดของแอกติโนฟาจ (นาโนเมตร)

ชนิด แอกติโนฟาจ	ส่วนหัว		ส่วนหาง		แผ่นฐาน
	ส่วนยาว	ส่วนกว้าง	ความยาว	ความกว้าง	
Ac1	73.3	60.0	233.3	10.0	+
Ac2	53.3	46.7	166.7	6.7	-
Ac3	60.0	53.3	193.3	6.7	-
Ac4	53.3	46.7	146.7	13.3	-
Ac5	53.3	46.7	160.0	6.7	+
Ac6	53.3	53.3	153.3	6.7	-
Ac7	60.0	53.3	133.3	13.3	-
Ac8	73.3	62.0	253.3	10.0	-
Ac9	53.3	53.3	166.7	13.3	-
Ac10	86.7	66.7	200.0	10.0	-
Ac11	80.0	86.7	120.0	20.0	-
Ac12	60.0	46.7	200.0	6.7	-

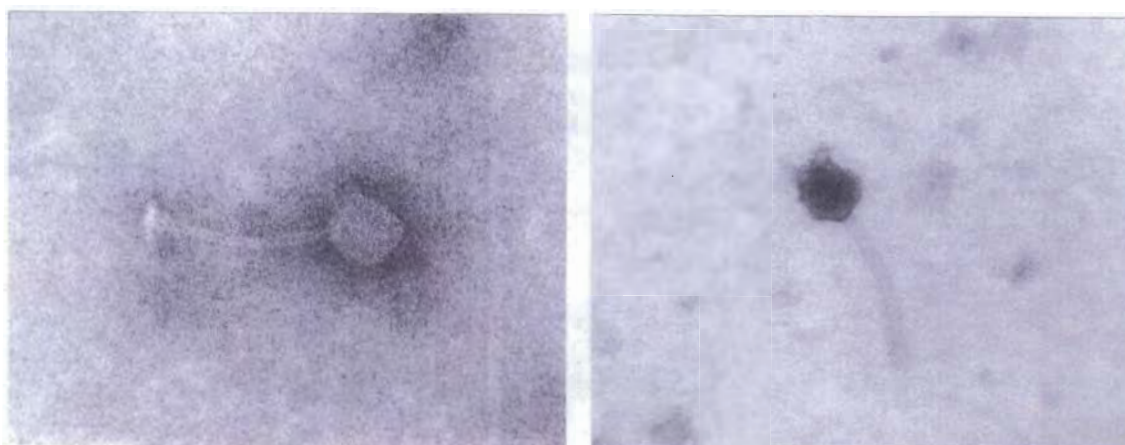


Ac1

Ac2

รูปที่ 23

รูปร่างของแอกตินโนฟาจ Ac1 และ Ac2 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)

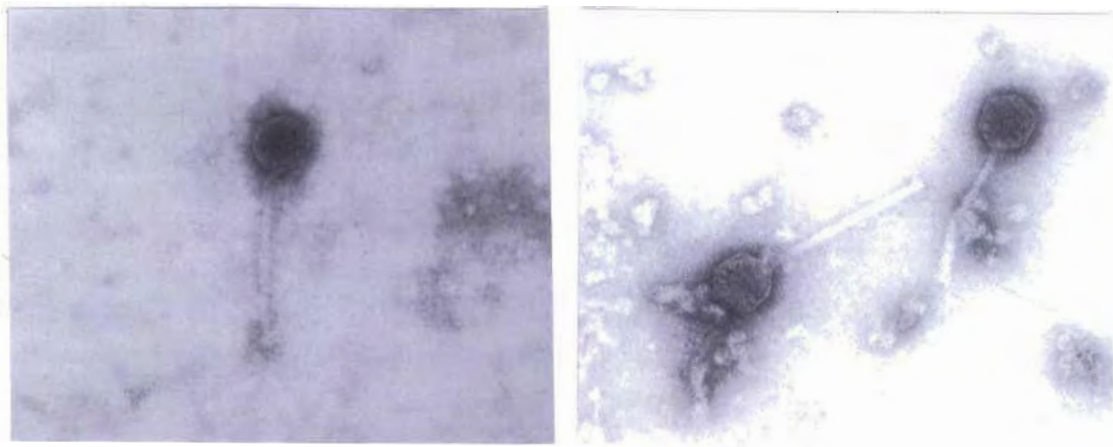


Ac3

Ac4

รูปที่ 24

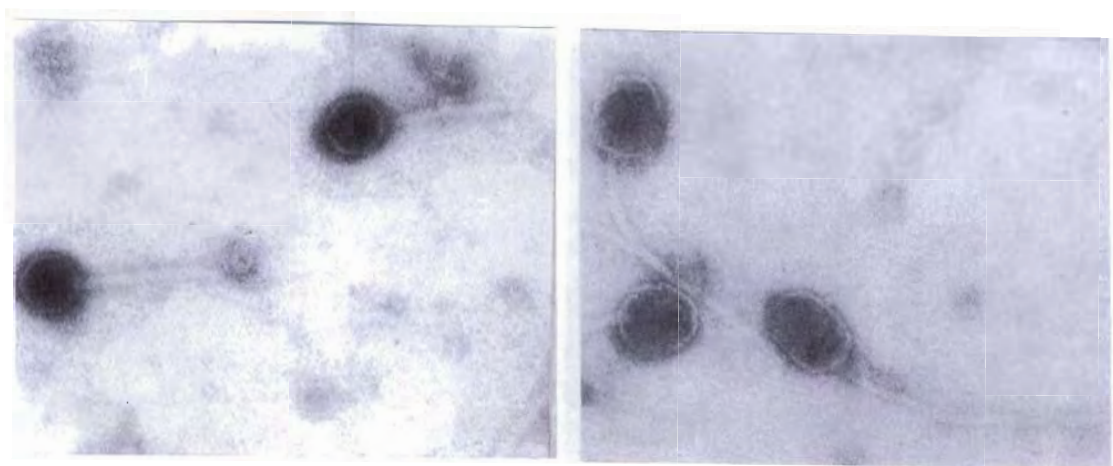
รูปร่างของแอกตินโนฟาจ Ac3 และ Ac4 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)



Ac5

Ac6

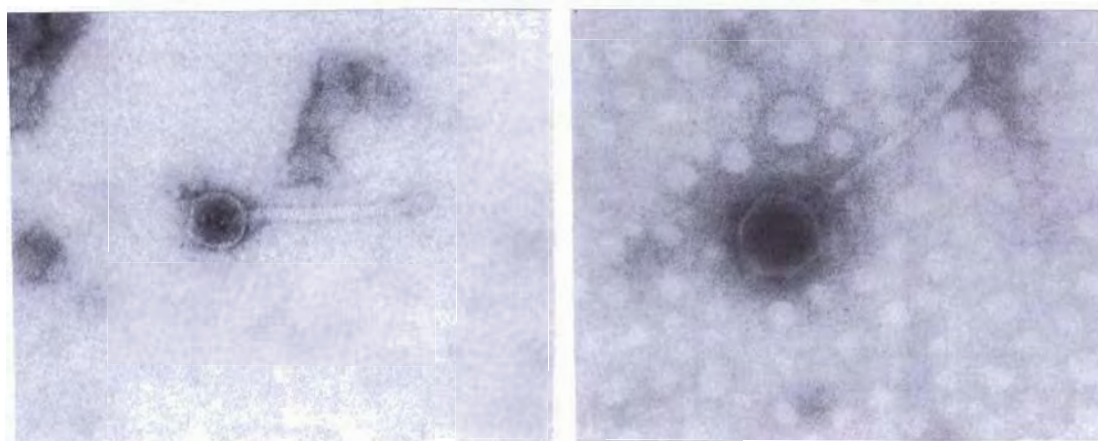
รูปที่ 25 รูปร่างของแอกตินโนฟาจ Ac5 และ Ac6 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)



Ac7

Ac8

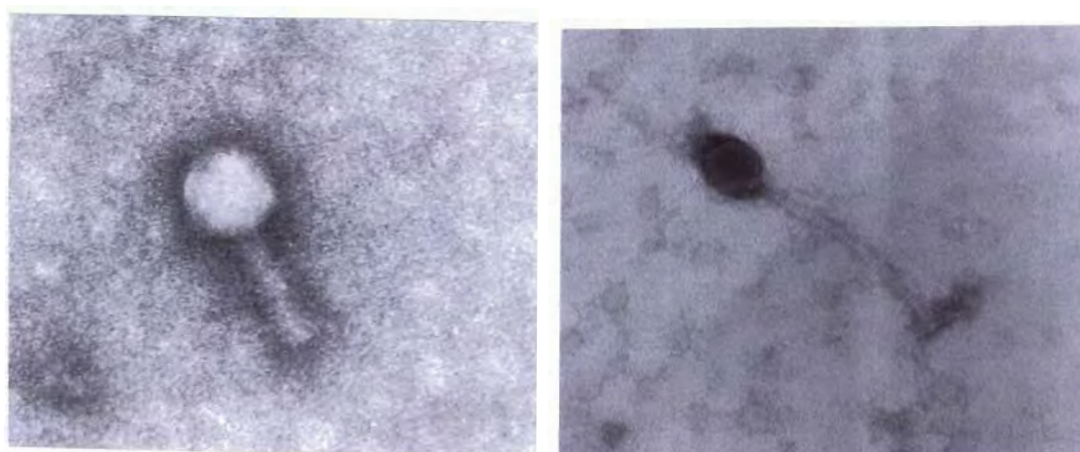
รูปที่ 26 รูปร่างของแอกตินโนฟาจ Ac7 และ Ac8 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)



Ac9

Ac10

รูปที่ 27 รูปร่างของแอกติโนฟาจ Ac9 และ Ac10 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)



Ac11

Ac12

รูปที่ 28 รูปร่างของแอกติโนฟาจ Ac11 และ Ac12 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการแยกแอคติโนมายซีทีสและแอคติโนฟาจากตัวอย่างดินจำนวน 18 ตัวอย่างที่ทำการเก็บมาจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย โดยการแยกแอคติโนมายซีทีสจากดินจะทำการแยกด้วยอาหารฮิวมิก แอซิด วิตามิน อการ์ ซึ่งอาหารชนิดนี้ Hayakawa และ Nonomura (1987) ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารที่คัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมายซีทีสโดยเฉพาะ โดยมีองค์ประกอบสำคัญคือ กรดฮิวมิก ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามินบี และไซโคลเฮกซิมิดที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Hayakawa และ Nonomura ได้ทดสอบการเจริญของแอคติโนมายซีทีสบนอาหารชนิดนี้ พบว่าสเตรปโตมายซีทีสมีการเจริญดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแอคติโนมายซีทีสจิ้งอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ เช่น *Micromonospora* sp., *Microbispora* sp., *Streptosporangium* sp. และ *Dactylosporium* sp. โคโลนีของสเตรปโตมายซีทีสจะเจริญปรากฏให้เห็นเมื่อถูกบ่มในอาหารชนิดนี้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ขณะที่แอคติโนมายซีทีสจิ้งอื่นดังกล่าวข้างต้นจะใช้เวลาในการเจริญประมาณ 3-4 สัปดาห์ สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อนำสารแขวนลอยตัวอย่างดินมาสเปรดบนอาหารฮิวมิก แอซิด วิตามิน อการ์ บ่มไว้ 7-14 วัน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารอินออร์แกนิก ซอล์ทสตาร์ช อการ์ โคโลนีในระยะแรกมีลักษณะนูนเป็นแผ่นติดแน่นบนผิวหน้าอาหาร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปช่วงระยะเวลาหนึ่งจะมีสปอร์เจริญครอบคลุมบนโคโลนี ทำให้มีลักษณะฟูและยับย่น ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวข้างต้นทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์แอคติโนมายซีทีสที่แยกจากดินออกเป็น 50 สายพันธุ์ จากการศึกษารูปร่างของแอคติโนมายซีทีสที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะเป็นมายซีเลียมที่มีการแตกแขนง ไม่พบผนังกั้นภายในมายซีเลียม พบสปอร์ที่มีการเรียงตัวเป็นสายยาวบริเวณปลายของมายซีเลียมหรืออาจหลุดออกมานอกมายซีเลียม ลักษณะของสายสปอร์ที่พบมีทั้งเป็นเส้นตรงโค้งงอเล็กน้อยคล้ายตะขอ และมีลักษณะม้วนงอเป็นเกลียว เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีและรูปร่างของมายซีเลียมกับลักษณะที่อ้างอิงใน *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* แล้ว (Williams et al., 1989) ทำให้กล่าวได้ว่าแอคติโนมายซีทีสที่แยกได้นี้จัดอยู่ในกลุ่มของสเตรปโตมายซีทีส การจำแนกสายพันธุ์แอคติโนมายซีทีสที่แยกได้ให้ลงถึง species จำเป็นต้องศึกษาลักษณะต่างๆหลายประการเช่น ลักษณะพื้นผิวของสปอร์ การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆและการผลิตเอนไซม์ เป็นต้น รวมทั้งการใช้ลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA (Kataoka et al., 1997) จึงจะสามารถจำแนกได้ แต่ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์แอคติโนมายซีทีสในเบื้องต้นเท่านั้น ทั้งนี้งานวิจัยมุ่งเน้นที่จะศึกษาลักษณะของฟาจมากกว่าลักษณะของโฮสต์เซลล์

การแยกแอคติโนฟาจากตัวอย่างดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญเป็นการเพิ่มจำนวนแอคติโนฟาที่อยู่ในดินตัวอย่างให้มากขึ้น ด้วยการเพิ่มจำนวนขั้นต้นของโฮสต์เซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอคติโนฟาแต่ละชนิดให้มากขึ้นก่อน ทำได้ด้วยการเติมสปอร์ของแอคติโนมายซีทีสลงไปบนดินตัวอย่างชนิดเดียวกันกับที่แยกแอคติโนมายซีทีสสายพันธุ์นั้นๆ แล้วบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เมื่อสปอร์อยู่

ในสภาวะที่เหมาะสมจะเกิดการงอก ทำให้แอกติโนฟาจในดินเกิดการติดเชื้อในแอกติโนมัยซีทีสได้ เกิดการเพิ่มจำนวนของแอกติโนฟาจ จากการแยกแอกติโนฟาจจากตัวอย่างดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญพบว่าสามารถแยกแอกติโนฟาจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมัยซีทีสได้จำนวน 12 สายพันธุ์ และให้ชื่อแอกติโนฟาจดังนี้ คือ Ac1, Ac2, Ac3, Ac4, Ac5, Ac6, Ac7, Ac8, Ac9, Ac10, Ac11 และ Ac12

จากการตรวจสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อของแอกติโนฟาจ Ac1 ถึง Ac12 ในแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่จำเพาะต่อแอกติโนฟาจแต่ละชนิดด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าจะให้พลาไคที่มีลักษณะดังนี้ คือ แอกติโนฟาจทุกชนิดยกเว้น Ac3 ให้พลาไคที่มีลักษณะใส ที่เรียกว่า clear plaque ทั้งนี้เกิดจากการที่แอกติโนฟาจสามารถเพิ่มจำนวนอนุภาคในไลติกไซเคิล ในขั้นตอนสุดท้ายของไซเคิลจะทำให้โฮสต์เซลล์เกิดการแตกสลายและตายได้ ดังนั้นแอกติโนฟาจทั้ง 11 ชนิดจึงจัดเป็นไวรัลเลนต์ฟาจ ส่วนแอกติโนฟาจ Ac3 ให้พลาไคที่มีลักษณะขุ่นที่เรียกว่า turbid plaque ซึ่งเป็นลักษณะเบื้องต้นของเทมเพอเรตฟาจ เป็นเพราะว่ายังมีโฮสต์เซลล์ที่เป็นไลโซเจนเจริญอยู่กลางพลาไครูปร่างและขนาดของพลาไคของแอกติโนฟาจแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม ขอบของพลาไคเรียบ แต่แอกติโนฟาจบางชนิดจะให้พลาไคที่มีขอบไม่เรียบ คือ พลาไคของ Ac11 และ Ac12 พลาไคของแอกติโนฟาจ Ac1, Ac2, Ac4, Ac5, Ac6, Ac7, Ac8, Ac9, Ac10 และ Ac11 มีขนาดเล็กประมาณ 0.5-2.5 มิลลิเมตร ส่วนพลาไคของ Ac3, Ac9 และ Ac12 มีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 3.0-8.0 มิลลิเมตร

การศึกษารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้น ขั้นตอนแรกจะต้องทำการตกตะกอนอนุภาคของแอกติโนฟาจแขวนลอย จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและแยกตะกอนอนุภาคแอกติโนฟาจนำไปละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต ซึ่งขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นจะต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่างยิ่ง เนื่องจากว่าถ้าหากอนุภาคแอกติโนฟาจได้รับการกระทบกระเทือนมาก จะทำให้โครงสร้างของแอกติโนฟาจไม่สมบูรณ์เช่น ส่วนหัวและส่วนหางขาดออกจากกัน เป็นต้น อาจทำให้การศึกษารูปร่างของแอกติโนฟาจผิดพลาดได้ การศึกษารูปร่างอนุภาคแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จะทำการย้อมอนุภาคแอกติโนฟาจด้วยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟ การย้อมด้วยวิธีนี้จะทำให้เห็นอนุภาคแอกติโนฟาจมีสีขาวในขณะที่แบคกราวด์ (background) จะทึบแสง (Bradley, 1967)

ผลการศึกษารูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจที่ทำการแยกได้จากดินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าอนุภาคแอกติโนฟาจทั้งหมดมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม แอกติโนฟาจทุกชนิดมีส่วนหางที่มีความยาวกว่าความยาวของส่วนหัวมาก แต่เป็นหางที่ไม่หดตัว (non-contractile tail) อนุภาคแอกติโนฟาจ Ac1 และ Ac5 มีโครงสร้างพื้นฐานบริเวณปลายส่วนหางแอกติโนฟาจแต่ละชนิดมีรูปร่างและขนาดอนุภาคแตกต่างกัน แอกติโนฟาจที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ Ac11

มีส่วนหัวขนาด 86.7×80 นาโนเมตร และส่วนหางมีขนาด 20×120 นาโนเมตร รองลงมาคือ Ac10 ส่วนหัวมีขนาด 66.7×86.7 นาโนเมตร และส่วนหางมีขนาด 10×200 นาโนเมตร ส่วนอนุภาคแอกติโนฟาจอื่นอีก 10 ชนิด พบว่ามีส่วนหัวที่มีขนาดอยู่ในช่วง 46.7×53.3 นาโนเมตรถึง 62.0×73.3 นาโนเมตร ส่วนหางมีขนาดไม่แน่นอน คือ มีความยาวอยู่ในช่วง 133.3 ถึง 200.0 นาโนเมตรและมีความกว้าง ในช่วง 6.7-13.0 นาโนเมตร

เมื่อนำรูปร่างแอกติโนฟาจทั้ง 12 ชนิดมาทำการจัดจำแนกชนิดโดยวิธีการของ Bradley (1967) พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม B ทั้งหมด ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับแอกติโนฟาจที่มีการศึกษามาแล้ว เช่น แอกติโนฟาจ R4, VP11, RP2, SH10, ϕ SPK1 และ ϕ C31 เป็นต้น (Dowding, 1973 ; Chater and Carter, 1979 ; Hranueli et al, 1979 ; Lomovskaya et al, 1980 ; Klaus et al, 1981 ; Kuhn et al, 1987)

การวิจัยครั้งนี้ได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือสามารถแยกแอกติโนฟาจจำนวน 12 ชนิดจากแอกติโนมายซีทีสจำนวน 12 สายพันธุ์ด้วยวิธีการส่งเสริมการเจริญ พืชที่เกิดจากแอกติโนฟาจแต่ละชนิดที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อมีกับแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ที่จำเพาะต่อแอกติโนฟาจชนิดนั้นๆ จะมีลักษณะรูปร่าง ขนาด ความขุ่นของพลาแคแตกต่างกัน แอกติโนฟาจเกือบทุกชนิดเป็นไวรัลเลนส์ฟาจเมื่ออยู่ในสเตรปโตมายซีทีสสายพันธุ์ที่แยกแอกติโนฟาจชนิดนั้น มีเพียง Ac3 เท่านั้นที่เป็นเทมเพลตฟาจ รูปร่างของอนุภาคแอกติโนฟาจทุกชนิดมีลักษณะส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมและมีส่วนหางที่ยาว ไม่สามารถหดตัวได้ มีขนาดอนุภาคต่างกัน ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกชนิดของ Bradley (Bradley, 1967)

รายการอ้างอิง

- Adams, H. A. 1959. Bacteriophages. New York: Interscience Publisher.
- Ackermann, H. W., Berthiaume, L., and Jones, L. A. 1985. New actinophage species. Intervirology. 23: 121-130.
- Anne, J., Wohlleben, W., Burkardt, H. J., Springer, R., and Puhler, A. 1984. Morphological and molecular characterization of several actinophages isolated from soil which lyse *Streptomyces cattleya* or *S. venezuelae*. J. Gen. Microbiol. 130: 2639-2649.
- Black, J. C. 1999. Microbiology principles and explorations. 4th ed. New Jersey : Prentice-Hall.
- Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31: 230-314.
- Brock, T. D., Martinko, J. M., and Parker, J. 1994. Biology of microorganisms. 7th ed. London : Prentice-Hall International.
- Campbell, A. M. 1996. Bacteriophages. In : Fields, D. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.) Fields virology. 3rd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven.
- Chater, K. F., and Carter, A. T. 1979. A new, wide host-range, temperate bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its interaction with some restriction-modification system. J. Gen. Microbiol. 115: 431-442.
- Chauthaiwale, V. M., Therwath, A., and Deshpande, V. V. 1992. Bacteriophage lambda as a cloning vector. Microbiol. Rev. 56:577-591.
- Clair, J. ST., and McCoy, E. 1958. Plaque morphology of certain streptomycetes phages. J. Bacteriol. 77: 131-136.
- Diaz, L. A., Hardisson, C., and Rodicio, M. R. 1989. Isolation and characterization of actinophages infecting *Streptomyces* species and their interaction with host restriction-modification systems. J. Gen. Microbiol. 135: 1847-1856.
- Dimmock, N. J., and Primrose, S. B. 1988. Introduction to modern virology. 3rd ed. Oxford : Blackwell Scientific.
- Donadio, S., Paladino, R., Costanzi, I., Sparapani, P., Schreil, W., and Iaccarino, M. 1986. Characterization of bacteriophages infecting *Streptomyces erythreus* and properties of phage-resistant mutants. J. Bacteriol. 166: 1055-1060.

- Dowding, J. E. 1973. Characterization of a bacteriophage virulent for *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 76: 163-176.
- Dowding, J. E., and Hopwood, D. A. 1973. Temperate bacteriophages for *Streptomyces coelicolor* A3(2) isolated from soil. J. Gen. Microbiol. 73: 349-359.
- DuBow, M. S. 1994. Bacterial identification use of bacteriophages. In: Webster, R. G., and Granoff, A. (eds.) Encyclopedia of virology. Vol.2 London : Academic Press.
- Duckworth, D. H. 1976. "Who discovered bacteriophage?" Bacteriol. Rev. 40: 793-802.
- Duckworth, D. H. 1987. History and basic properties of bacterial viruses. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage ecology. p1-45. New York : John Wiley and Sons.
- Furukawa, H., Kuroiwa, T., and Mizushima, S. 1983. DNA injection during bacteriophage T4 infection of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 154: 938-945.
- Goyal, S. M. 1987. Methods in phage ecology. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage ecology. p267-297. New York : John Wiley and Sons.
- Greene, J., and Goldberg, R. B. 1985. Isolation and preliminary characterization of lytic and lysogenic phages with wide host-range within the streptomycetes. J. Gen. Microbiol. 131: 2459-2465.
- Harris, J. E., Chater, K. F., Bruton, C. J., and Piret, J. M. 1983. The restriction mapping of c gene deletions in *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 and their use in cloning vector development. Gene. 22: 167-174.
- Hartley, M. N., Murphy, G. O., Bruton, C. J., and Chater, K. F. 1994. Sequence of the essential early region of ϕ C31, a temperate phage of *Streptomyces* spp. with unusual features in its lytic development. Gene. 147: 29-40.
- Hayakawa, M., and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. Ferment. Technol. 65: 501-509.
- Herron, P. R., and Wellington, E. M. H. 1990. New method for extraction of streptomycetes spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. App. Environ. Microbiol. 56: 1406-1412.
- Howe, C. H. and Smith, M. C. M. 1996. Gene expression in *cos* region of the *Streptomyces* temperate actinophage ϕ C31. Microbiol. 142: 1357-1367.

- Hranueli, D., Pigac, J., and Vesligaj, M. 1979. Characterization and persistence of actinophage RP2 isolated from *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. J. Gen. Microbiol. 114: 295-303.
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., and Yoshida, T. 1997. Application of the variable region in 16s rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. FEMS. Microbiol. Lett. 151:249-255.
- Klaus, S., Krugel, H., Suss, F., Neigenfind, M., Zimmermann, I., and Taubeneck, U. 1981. Properties of temperate actinophage SH10. J. Gen. Microbiol. 123: 269-279.
- Kuhn, S. P., Lampel, J. S., and Strohl, W. R. 1987. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from *Streptomyces galilaeus*. App. Environ. Microbiol. 53: 2708-2713.
- Kurup, V. P., and Heinzen, R. J. 1978. Isolation and characterization of actinophages of *Thermoactinomyces* and *Micropolyspora*. Can. J. Microbiol. 24: 794-797.
- Lanning, S., and Williams, S. T. 1982. Methods for the direct isolation and enumeration of actinophages in soil. J. Gen. Microbiol. 128: 2063-2071.
- Labeda, D. P., and Shearer, M. C. 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In: Labeda, D. P. Isolation of biotechnological organism from nature. p1-17. New York : McGraw-Hill.
- Lechevalier, H. A. 1989. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Williams, S. T., Sharpe, M. E., and Holt, J. G.(eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.4 p2344-2347. Baltimore/London : Williams and Wilkins.
- Lechevalier, H. A., and Lechevalier, M. P. 1993. The bacteria : the actinomycetes. In: Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (eds.) Microbiology. 2nd ed. p506-517. Melbourne : WmC.Brown.
- Lomovskaya, N. D., Chater, K. F., and Mkrtumian, N. M. 1980. Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. Microbiol. Rev. 44: 206-229.
- Luria, S. E., Darnell, J. E., Jr., Baltimore, D., and Campbell, A. 1978. General virology. 3rd ed. New York ; John Willey and Sons.
- Maloy, S. R., Cronan, J. E., Jr., and Freigelder, D. 1994. Microbial genetics. 2nd ed. Boston : Jones and bartlett.

- Mathews, C. K. 1977. Reproduction of large virulent bacteriophage. In: Fraenkel-Conrat, H., and Wagner, R. R. (eds) Reproduction bacterial DNA viruses. Comprehensive virology 7. p179-294. New York : Plenum Press.
- Reaney, D. C., and Ackermann, H. W. 1982. Comparative biology and evolution of bacteriophages. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage ecology. p53. New York : John Wiley and Sons.
- Reaney, D. C., Gowland, P. C., and Slater, J. H. 1983. Genetic interactions among microbial communities. In: Slater, J. H., Whittenbury, R., and Wimpenny, J. W. T. (eds.) Microbes in their natural environments. p379-421. Cambridge : Cambridge University Press.
- Schneider, J., Garcia, I. A., and Kutzner, H. J. 1987. Characterization of family of temperate actinophages of *Faenia rectivirgula*. J. Gen. Microbiol. 133: 2263-2268.
- Schneider, J., Korn-Wendisch, F., and Kutzner, H. J. 1990. ϕ SC623, a temperate actinophage of *Streptomyces coelicolor* Muller, and its relatives ϕ SC347 and ϕ SC681. J. Gen. Microbiol. 136: 767-772.
- Smith, M. C. M., Ingham, C. J., Owen, C. E., and Wood, N. T. 1992. Gene expression in the *Streptomyces* temperate phage ϕ C31. Gene. 115: 43-48.
- Stuttard, C. 1982. Temperate phages of *Streptomyces venezuelae*: lysogeny and host specificity shown by phages SV1 and SV2. J. Gen. Microbiol. 128: 115-121.
- Stuttard, C., and Dwyer, M. 1981. A new temperate phage of *Streptomyces venezuelae* : morphology, DNA molecular weight, and host range of SV2. Can. J. Microbiol. 27: 496-499.
- Sykes, I. K., and Williams, S. T. 1978. Interactions of actinophage and clays. J. Gen. Microbiol. 108: 97-102.
- Sykes, I. K., Lanning, S., and Williams, S. T. 1981. The effect of pH on soil actinophage. J. Gen. Microbiol. 122: 271-280.
- Tortora, J. G., Funke, B. R., and Case, C. L. 1995. Microbiology an introduction. 5th ed. California : The Benjamin/comming.

- Williams, S. T., Goodfellow, M., and Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces* waksman and henrici, 1943, 339^{AL}. In: Williams, S. T., Sharpe, M. E., and Holt, J. G.(eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.4 p2451-2492. Baltimore/London : Williams and Wilkins. .
- Williams, S. T., Mortimer, A. M., and Manchester L. 1987. Ecology of soil bacteriophage. In : Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage ecology. p157-179. New York : John Wiley and Sons.
- Williams, S. T., 1994. Bacteriophage in soil. In: Webster, R. G., and Granoff, A. (eds.) Encyclopedia of virology. Vol.2 London : Academic Press.
- Young, R. Y. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol. Rev. 56: 430-481.

ภาคผนวก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แมนนิทอล มังปิ้ง อการ์ (Mannitol Mungbean Agar)

ถั่วเขียวบด	20.0	กรัม
น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol)	20.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำประปา	500.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0

ต้มถั่วเขียวบดกับน้ำประปาจนเดือด กรองเอาถั่วเขียวออก นำน้ำต้มถั่วเขียวที่ได้มาเติมน้ำตาลแมนนิทอล วุ้นผง และน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดต่าง แล้วนำไปต้มอีกครั้งจนเดือด

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)

2. นิวเตรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. นิวเตรียนท์ บรอก (Nutrient Broth)

สารสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. สลีอปปีอการ์ (Sloppy Agar)

สารสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

แบ่งใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

5. ฮิวมิก แอซิด-วิตามิน อการ์ (Humic acid- Vitamin Agar)

* กรดฮิวมิก (humic acid)	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	1.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)	0.02	กรัม
** ไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide)	50.0	มิลลิกรัม
*** วิตามินบี		
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.2

* ละลายกรดฮิวมิกใน 0.2 นอร์มอลสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 มิลลิลิตร

** ไซโคลเฮกซิมิดและวิตามินบี ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอนเมตรและเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานแล้วที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

*** วิตามินบี

ไทอามิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
ไรโบเฟลวิน (Riboflavin)	0.5	มิลลิกรัม
ไนอะซิน (Niacin)	0.5	มิลลิกรัม
ไพริดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxin-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
ไอโนซิทอล (Inositol)	0.5	มิลลิกรัม
พารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic)	0.5	มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	0.25	มิลลิกรัม

6. อินออร์แกนิก ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salt Starch Agar)

แป้ง (soluble agar)	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต	1.0	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl ₂ ·7H ₂ O)	1.0	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	1.0	มิลลิกรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.1 โมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์

แอมโมเนียม อะซิเตต (C ₂ H ₇ NO ₂)	0.77	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วย 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์