บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจที่อยู่ในดิน การแยกฟาจจากดิน วิธีที่นิยม คือ วิธีส่งเสริมการเจริญ ซึ่งจำเป็นต้องแยกจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโฮสท์ก่อน จากนั้นจึงใช้โฮสท์ที่แยกได้มาช่วยในการเพิ่มจำนวนฟาจที่มีอยู่ในดินให้เพิ่มมากขึ้นจนสามารถตรวจสอบฟาจได้โดยง่าย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจนิยมศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายก็ไม่สูงเกินไป นอกจากนั้นยังช่วยในการจัดจำแนกชนิด และโครงสร้างของฟาจอีกด้วย ฟาจที่ถูกนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านจะถูกย้อมสีด้วยเทคนิคแบบเนกาทีพสเตนนิ่ง ซึ่งวิธีนี้จะให้รายละเอียดในส่วนที่มีขนาดเล็กได้อย่างชัดเจน

เนื่องจากการแยกฟาจจากดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ อ้างอิงมาจากบทความต่างประเทศ (Adams, 1959; Syke *et al.*, 1981; Lanning and Williams, 1982; Kuhn *et al.*, 1987) ซึ่งบทความต่างประเทศหลายฉบับที่นำมาอ้างอิงมิได้กล่าวถึงสภาพของดินที่เก็บตัวอย่างว่าควรเก็บตัวอย่างดินบริเวณใด สภาพของดินควรมีลักษณะอย่างไร จึงจะแยกจุลินทรีย์และฟาจได้มากที่สุด ดังนั้นจึงใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มตามจังหวัดต่างๆ 10 จังหวัดในประเทศไทย ได้ตัวอย่างดินทั้งสิ้น 59 ตัวอย่าง ต่อมาพบว่า มีปัจจัยหลายประการที่กำหนดหรือเป็นตัวแปรประสิทธิภาพการแยกจุลินทรีย์และฟาจ ประการแรกพบว่าการเก็บตัวอย่างดินควรทำการเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 10-15 เซ็นติเมตร ซึ่งที่ระดับความลึกดังกล่าวมีรายงานการวิจัยว่าเป็นระดับความลึกที่สามารถแยก *Actinomycetes* ได้มากที่สุด (Davies and Williams, 1970) ประการที่สอง พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดินเป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยก *Actinomycetes* และฟาจจากดินเป็นอย่างมาก โดยพบว่า ดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่เป็นกลางสามารถแยก *Actinomycetes* และฟาจได้มากที่สุด (Davies and Williams, 1970; Sykes *et al.*, 1981) ประการที่สาม ลักษณะทางกายภาพของดิน พบว่าดินที่มีฮิวมัส (humus) เป็นส่วนประกอบอยู่มากจะสามารถแยก *Actinomycetes* ได้มาก (Hayakawa and Nonomura, 1987) ซึ่งส่งผลให้ความน่าจะเป็นในการแยกฟาจมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย ข้อมูลรายละเอียดที่ทราบมีประโยชน์อย่างมากในการพิจารณาตัวอย่างดินที่จะเก็บมาใช้ในการแยกจุลินทรีย์และฟาจ จากข้อมูลนี้เองได้นำมาใช้ในการพิจารณาคัดเลือกตัวอย่างดินที่เก็บมา 59 ตัวอย่าง

โดยคัดเลือกไว้เหลือเพียง 31 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) ที่มีโอกาสที่จะแยกจุลินทรีย์และฟาจได้มากที่สุด การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน ใช้วิธีของ (Reed and Cummings, 1945) ซึ่งวัดโดยใช้น้ำกลั่นผสมกับตัวอย่างดินในอัตราส่วนของน้ำต่อดินเท่ากับ 2:1 ค่าความเป็นกรด-ด่างวัดโดยใช้อิเลคโตรดแก้ว และอ่านค่าโดยตรงจากพีเอชมิเตอร์ โดยแต่ละตัวอย่างดินจะวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ครั้ง และนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยเป็นค่าที่ใช้รายงาน (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าตัวอย่างดิน 31 ตัวอย่างที่คัดเลือกมาก็มิได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่เป็นกลางทั้งหมด มี 3 ตัวอย่างที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 8.5 และมี 4 ตัวอย่างที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.0 ส่วนที่เหลืออีก 24 ตัวอย่างมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.0 - 8.5 ทั้งนี้ถ้าสามารถแยกฟาจจากดินได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงกว่า 8.5 หรือต่ำกว่า 5.0 ได้ก็จะเป็นสิ่งที่ดีมาก เนื่องจากยังไม่พบรายงานการแยก *Streptomycetes* ฟาจที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ช่วงดังกล่าวได้มาก่อน

ปริมาณน้ำในตัวอย่างดิน วัดจากน้ำหนักที่สูญเสียไปของตัวอย่างดิน ที่ถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักที่วัดได้มีค่าคงที่ ตามวิธีของ Lanning and Williams (1982) จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างดินที่คัดเลือกมา 31 ตัวอย่างมีค่าปริมาณน้ำในดินอยู่ในช่วง 1.3 - 89.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 6 ตัวอย่างที่มีค่าปริมาณน้ำในดินสูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ มี 9 ตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำในดินต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 16 ตัวอย่างมีปริมาณน้ำในดินอยู่ในช่วง 10 - 30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

การแยก *Actinomycetes* จากดิน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด ฮิวมิค แอซิด-วิตามิน อการ์ มีเดียม (humic acid-vitamin agar medium; HV agar) (Hayakawa and Nonomura,1987) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้แยก *Actinomycetes* จากดินโดยเฉพาะ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยก *Actinomycetes* ได้ทั้งหมด 95 สายพันธุ์ จาก 28 ตัวอย่างดิน โดยตัวอย่างดินหมายเลข 1 หมายเลข 7 และหมายเลข 21 ไม่สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของตัวอย่างดินหมายเลข 1 หมายเลข 7 และหมายเลข 21 พบว่ามีค่าเท่ากับ 9.3 4.1 และ 3.5 ตามลำดับ จากกราฟแสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้กับค่าความปืนกรด-ด่างของตัวอย่างดิน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง (รูปที่ 41) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jansen (1930) ที่ได้ทำการทดลองแยก *Actinomycetes* ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยก *Actinomycetes* ได้น้อยมากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4.6 จากนั้นปริมาณของจุลินทรีย์ที่แยกได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น และปริมาณของจุลินทรีย์ที่แยกได้จะมีค่าสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 6.8 - 8.0 Bradley *et al.* (1963) รายงานว่า *Streptomycetes* ส่วนใหญ่จะเจริญได้ช้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นต่ำกว่า 4.0 และสูงกว่า 9.0

Davies and Williams (1970) รายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแยก *Actinomycetes* จากดิน โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4.75 จะสามารถแยก *Actinomycetes* ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย สภาวะที่เป็นกรดหรือด่างเป็นปัจจัยที่สำคัญ ต่อแอคติวิตี้ และอัตราการรอดชีวิตของ *Actinomycetes* ที่แยกได้จากดิน มีรายงานการแยก *Actinomycetes* จากดิน พบว่า *Actinomycetes* ส่วนใหญ่ แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่เป็นกลาง (Williams *et al.*, 1971) นอกจากนี้ Kuhn and Williams (1975) รายงานการศึกษา *Actinomycetes* ที่ชอบสภาพเป็นกรด ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีสภาพเป็นกรด 17 ตัวอย่าง พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Streptomyces*

จากกราฟระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้กับปริมาณน้ำในดิน (รูปที่ 42) พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้พบว่ามีจุลินทรีย์ 72 สายพันธุ์แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีปริมาณน้ำในดินสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Davies and Williams (1970) ที่ศึกษาถึงปริมาณน้ำในดินต่อจำนวน *Actinomycetes* ที่แยกได้ โดยพบว่าสามารถแยก *Actinomycetes* ได้สูงสุดในตัวอย่างดินที่มีค่าปริมาณน้ำในดินมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

ปัญหาของการแยก *Actinomycetes* จากดิน คือ แบคทีเรียและราจำนวนมากที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน (Lingappa and Lockwood, 1961; El-Nekeeb and Lechevalier, 1963) การพัฒนาเทคนิคที่ใช้แยกโดย Williams and Davies (1965) ก่อให้เกิดความเป็นไปได้ในการที่จะแยก *Actinomycetes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น สิ่งสำคัญที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียและรา คือการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราที่ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราต้องกระทำอย่างระมัดระวัง เนื่องจากสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรานั้นมีผลต่อ *Actinomycetes* ด้วย โดยทำให้จำนวนที่นับได้มีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย คล้ายกับ *Actinomycetes* ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่นิยมใช้เพื่อนับจำนวนของ *Actinomycetes* จากดินโดยตรง

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Actinomycetes* ทั้ง 95 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 31 ตัวอย่าง จะถูกเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์เมื่อเชื้อเจริญขึ้นมา และนำไปลากบนอาหารวุ้นเอียงชนิดแมนนิทอลซอยบีน อการ์ มีเดียม บ่มที่อุณหภูมิ 28 อาศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 - 14 วัน จึงนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้ และคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกันที่แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลขเดียวกันเก็บไว้ (ตารางที่ 7) เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่ต่างกันอาจมีลักษณะเหมือนกันได้ เนื่องจากการแยกฟาจด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ นอกจากปัจจัยเรื่องความจำเพาะของฟาจที่มีต่อโฮสท์แล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจนั้นๆ ด้วย ดังนั้นเชื้อชนิดเดียวกันที่แยกได้จากตัวอย่างดินต่างกันอาจ

จะแยกฟาจได้จากดินชนิดเดียวหรือได้ทั้งสองชนิดก็ได้ ทั้งนี้ปัจจัยที่สำคัญขึ้นอยู่กับสภาพของฟาจในดิน ส่วนประกอบของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ปริมาณน้ำในดิน และปัจจัยอื่นๆ อีกมากมาย (Goyal et al., 1987)

การแยกฟาจจากตัวอย่างดิน ใช้วิธีของ Adams (1959) โดยนำจุลินทรีย์ 95 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 31 ตัวอย่าง ดังกล่าวข้างต้นมาใช้เพื่อแยกฟาจด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกฟาจได้จำนวน 18 ชนิด จากตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง ใน 6 จังหวัดของประเทศไทย ฟาจที่แยกได้มีหมายเลขดังนี้คือ P4(2) P6(2) P10(1) P10(2) P11(1) P13(1) P13(2) P13(3) P16(1) P16(2) P20(2) P26(1) P26(2) P26(4) P27(4) P28(1) P29(2) P30(1) ตัวอย่างดินหมายเลข 13 และ 26 สามารถแยกฟาจได้มากที่สุดโดยแยกได้ตัวอย่างละ 3 ชนิด (ตารางที่ 8) ฟาจที่แยกได้ด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ สามารถแยกได้ 18 ชนิด จากโฮสท์ 95 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 18.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับโฮสท์ จากกราฟระหว่างจำนวนฟาจที่แยกได้กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน (รูปที่ 133) พบว่าจำนวนฟาจที่แยกได้สูงสุดอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Sykes *et al.* (1981) ที่ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินต่อแอคติโนฟาจ (actinophage) จากการศึกษาพบว่า ไม่สามารถที่จะพบฟาจได้ในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 ทั้งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าวสามารถแยก *Streptomycetes* ที่ชอบสภาวะเป็นกรดได้ แอคติโนฟาจที่แยกได้แสดงความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 5.5 - 9.0 แต่จะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่าค่าที่กำหนดไว้ การรอดชีวิตของฟาจจะมีค่าสูงในดินที่มีสภาพเป็นกลางแต่จะลดลงอย่างรวดเร็วในดินที่มีสภาพเป็นกรด โดยความเป็นกรดมีผลหลายประการ ต่อหลายขั้นตอนของขบวนการเพิ่มจำนวนของฟาจ เช่น ขั้นตอนการจับกันอย่างจำเพาะ ขั้นตอนการส่งถ่ายสารพันธุกรรม ความยาวของระยะพัก และท้ายสุดมีผลต่อเมตาบอลิคแอคติวิตีของโฮสท์

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการทดลองครั้งนี้พบว่า แม้ฟาจส่วนใหญ่จะแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีสภาพเป็นกลาง แต่มีฟาจอยู่หนึ่งชนิด คือฟาจหมายเลข P4(2) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.6 จะเห็นได้ว่าการแยกฟาจจากตัวอย่างดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 เป็นสิ่งที่น่าสนใจและมีความสำคัญเนื่องจากยังไม่เคยพบรายงานการแยกฟาจของ *Actinomycetes* จากดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 มาก่อน ในจุลินทรีย์ที่ทนต่อสภาพที่เป็นกรด เช่น *Lactobacilli sp.* และ *Streptococci sp.* สามารถถูกฟาจเข้าไปเจริญภายในเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามมักจะเกิดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้กับค่าที่เป็นกลาง (Zachary, 1974; Torvik and Dundas, 1974) Sykes *et al.* (1981) รายงานว่าไม่สามารถแยกฟาจจากดินที่มีค่า

ความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดินต่ำกว่า 6.0 ได้ แม้ว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังกล่าวจะสามารถแยกจุลินทรีย์ที่เป็นโฮสท์ของฟาจได้ก็ตาม Williams and Lanning (1984) ศึกษาฟาจของ *Streptomycetes* ที่แยกได้จากดินที่มีสภาพเป็นกลาง พบว่าฟาจชนิดนี้สามารถเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 3.0 การที่ฟาจ P4(2) แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีสภาพเป็นกรด (pH 4.6) แสดงว่าฟาจนั้นทนต่อสภาพความเป็นกรดของดินได้ ซึ่งหมายความถึงเอนไซม์ที่เป็นส่วนสำคัญของเมตาบอลิคของฟาจสามารถทำงานได้ในสภาวะที่เป็นกรด จากข้อดีนี้ทำให้ฟาจที่แยกได้อาจมีศักยภาพในการนำไปใช้ในงานด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ต่อไป

จากกราฟแสดงฟาจที่แยกได้กับค่าปริมาณน้ำในดิน (รูปที่ 134) พบว่าฟาจ 18 ชนิดที่แยกได้ มี 4 ชนิดที่มีค่าปริมาณน้ำในดินที่แยกได้ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ 14 ชนิดมีค่าปริมาณน้ำในดินที่แยกได้สูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยฟาจที่มีปริมาณน้ำในดินสูงสุดคือฟาจหมายเลข P10(1) และ P10(2) ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำในดินเท่ากับ 71.6 เปอร์เซ็นต์ ฟาจที่แยกได้จากดินที่มีปริมาณน้ำในดินต่ำสุด ได้แก่ฟาจหมายเลข P28(1) โดยมีค่าปริมาณน้ำในดินเท่ากับ 2.3

ฟาจที่แยกได้ทั้ง 18 ชนิดมีค่าความสามารถทำให้เกิดพล๊าค (plaque forming unit) (p.f.u./ml.) อยู่ในช่วง 200 ถึง 120,000 (ตารางที่ 10 และรูปที่ 135) โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 120,000 ในฟาจหมายเลข P13(1) และ P16(2) และมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 200 ในฟาจหมายเลข P4(2) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณฟาจที่ได้มีค่าต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น ขบวนการทำฟาจให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ชนิดของฟาจที่เข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์เป็นเทมเปอร์เรทฟาจ การจับกันของฟาจกับโมเลกุลของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิที่ใช้ในการแยก สารเคมีที่เติมลงไปในนิวเตรียนท์บร์อทเพื่อช่วยรักษาความสามารถในการทำกิจกรรมของฟาจ เป็นต้น ซึ่งสาเหตุต่างๆ เหล่านี้อาจก่อให้เกิดการสูญเสียปริมาณของฟาจที่แยกได้ถึง 30 - 50 เปอร์เซ็นต์ (Lanning and Williams, 1982)

การตรวจสอบฟาจที่แยกได้กระทำตามวิธีของ Adams (1959) ซึ่งทำการทดสอบบนอาหารแข็งสองชั้น โดยอาหารแข็งชั้นล่างคือ นิวเตรียนท์ อการ์ อาหารแข็งชั้นบนคือ สลอปปี้ อการ์ ที่มีสปอร์แขวนลอยรวมกับฟาจแขวนลอย ผลการทดสอบได้พล๊าค ซึ่งคือบริเวณใสที่เกิดจากการแตกของโฮสท์เซลล์เมื่อถูกฟาจเข้าไปเจริญ พล๊าคของฟาจแต่ละชนิดจะมีลักษณะจำเพาะ (ตารางที่ 9 รูปที่ 43-78) ซึ่งสามารถใช้เป็นหลักเกณฑ์ประการหนึ่งในการจัดจำแนกชนิดฟาจกับโฮสท์เซลล์ โดยลักษณะทั่วไปของพล๊าคที่ใช้ในการจัดจำแนก คือ ลักษณะใส ขุ่น เป็นวงแหวน ขอบของพล๊าคมีลักษณะเรียบ ไม่เรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางของพล๊าคมีขนาดเท่าใด เนื่องจากระยะเวลาในการทำให้เกิดพล๊าคของฟาจแต่ละชนิดไม่เท่ากัน โดยทั่วไปมีค่าอยู่ในช่วง 16 - 32 ชม.

ดังนั้นการพิจารณาลักษณะโดยทั่วไปของพล๊าคจึงทำที่ 32 ชั่วโมงของการบ่ม เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกันกับฟาจทุกชนิดที่สามารถแยกได้ Clair and McCoy (1959) รายงานว่ารูปแบบของพล๊าคอาจช่วยในการจำแนกชนิดทั้งโฮสท์และฟาจ ซึ่งให้ความแน่ชัดสูงกว่าดูจาก ช่วงของโฮสท์ หรือความไวของฟาจต่อโฮสท์ ลักษณะของพล๊าคอาจจะถูกควบคุมด้วยโฮสท์หรือด้วยฟาจดังนั้นจึงมีลักษณะที่จำเพาะและแตกต่างกันไป การถ่ายภาพพล๊าคด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคปที่กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะของพล๊าคนั้นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคปชนิดที่มีไดอะแฟรม (diaphram) เพื่อปรับความเข้มของแสงและต้องถ่ายภาพในลักษณะดาร์คฟิลด์ (dark field) เท่านั้นจึงสามารถถ่ายภาพพล๊าคบนจานเพาะเชื้อเพื่อศึกษาลักษณะของพล๊าคได้

ขั้นตอนการทดสอบฟาจที่แยกได้บนอาหารแข็งสองชั้น ลำดับของการผสมฟาจแขวนลอย สปอร์แขวนลอย กับสลอปปี้ อการ์ มีความสำคัญเนื่องจากสลอปปี้ อการ์ที่ใช้แช่อยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยกำหนดอุณหภูมิของน้ำไว้ที่ 46 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้อการ์แข็งตัว การทดสอบควรใส่สปอร์แขวนลอยลงไปในสลอปปี้อการ์อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสก่อนฟาจแขวนลอย ทั้งนี้เนื่องจากสปอร์แขวนลอยและฟาจแขวนลอยที่ใช้เก็บอยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การใส่ฟาจแขวนลอยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสลงในสลอปปี้อการ์อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) ซึ่งมีผลเสียต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ การใส่สปอร์แขวนลอยก่อนถึงแม้สปอร์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว แต่ผลที่เกิดขึ้นต่อสปอร์คิดว่ามีน้อยเนื่องจากสปอร์อยู่ในสภาพที่ทนการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ดีกว่า นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วอาจช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ด้วย หลังการเติมสปอร์แขวนลอยจะทำให้อุณหภูมิลดต่ำลงมา เมื่อเติมฟาจแขวนลอยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะลดลง ซึ่งช่วยรักษาความสามารถในการทำกิจกรรมของฟาจให้ยังคงมีประสิทธิภาพที่ดีอยู่

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Actinomycetes* 18 สายพันธุ์ที่แยกฟาจได้ถูกนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่าบนอาหารวุ้นเอ็มเอส ที่กำลังขยาย 40 เท่าด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป และบนสไลด์ที่กำลังขยาย 1,600 เท่า ด้วยกล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป (รูปที่ 79-132) การสังเกตุจุลินทรีย์ *Actinomycetes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้ง่าย จึงสะดวกต่อการแยกเชื้อในกลุ่มนี้ ทั้งนี้เพราะเชื้อดังกล่าวมีการสร้างไมซีเลียมที่แท้จริง จำนวนมากเมื่อเจริญเต็มที่ และมีแอเรียลสปอร์ (aerial spore) สีต่างๆ ดังนั้นผิวโคโลนีจึงมีลักษณะต่างไปจากแบคทีเรียทั่วไป อย่างไรก็ตามเส้นใยมีขนาดเล็กกว่าเชื้อราและโคโลนีมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรามาก จึงสามารถแยก *Actinomycetes* ตามความแตกต่างของโคโลนี ออกจากโคโลนีของแบคทีเรียและเส้นใยของราได้ด้วยตาเปล่า

ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Actinomycetes* 18 สายพันธุ์ที่ทดสอบอยู่ในจีนัส *Streptomyces* ทั้งหมด ทั้งนี้โดยพิจารณาจาก ลักษณะและการจัดเรียงตัวของสปอร์ และไมซีเลียม อ้างอิงการจัดจำแนกตามคู่มือการจัดจำแนกแบคทีเรียของเบอร์กี้ (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (Holt, 1974) อยู่ในส่วนที่ 17 ออเดอร์ *Actinomycetaceae* โดยจุลินทรีย์ในจีนัส *Streptomyces* จะมีสปอร์เกิดบนเส้นใยที่ยื่นพ้นอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นไปบนอากาศ (aerial mycelium) เรียก แอเรียลสปอร์ โดยแอเรียลสปอร์มักเกิดเป็นสายซึ่งรูปร่างของสายสปอร์ มีได้หลายแบบขึ้นกับสปีชีส์ เช่น เป็นสายตรง เป็นสายคดไปมา ม้วนเป็นวง โค้งงอที่ปลาย หรือพันเป็นเกลียว ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ใน แฟมิลี *Streptomycetaceae* ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 จีนัส คือ จีนัส *Streptomyces* และ จีนัส *Streptoverticillium* โดยสองจีนัสนี้ แตกต่างกันที่การจัดเรียงตัวของแอเรียลสปอร์

โดยทั่วไปการศึกษาลักษณะสปอร์และไมซีเลียมด้วยกล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคปจะทำโดยการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) ซึ่งการเตรียมเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดในการถ่ายภาพ จากปัญหาการโฟกัสภาพ นอกจากนั้นยังเสียเวลาในการเตรียมเชื้อบนสไลด์นาน ต้องใช้อุปกรณ์มาก มีค่าใช้จ่ายสูง และเกิดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อราอยู่เป็นประจำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้วิธีการเตรียม *Actinomycetes* เพื่อศึกษาลักษณะสปอร์และไมซีเลียมด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ที่เขียนไว้ใน ภาคผนวก ง. ข้อดีของการเตรียมสไลด์ด้วยวิธีนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี slide culture คือ เตรียมได้ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่มีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนจากเชื้อรา ภาพที่ได้มีความคมชัด เนื่องจากสามารถโฟกัสได้ทั่วบริเวณของภาพ เห็นการจัดเรียงตัวของสปอร์และไมซีเลียมชัดเจน ไม่ต้องเสียเวลาในการย้อมสี หรือเตรียมเป็นสไลด์ถาวร เพราะดูเป็นสไลด์สดได้เลย ข้อเสียของการเตรียมสไลด์ด้วยวิธีนี้ คือ เสียเวลาในการหาบริเวณที่เหมาะสมนาน เนื่องจากสไลด์ที่เตรียมจะมีความหนาแน่นของสปอร์และไมซีเลียมมาก มีบางบริเวณเท่านั้นที่สปอร์และไมซีเลียมจะจัดเรียงตัวเหมือนสภาพธรรมชาติ การศึกษาครั้งนี้ใช้ *Streptomycetes* ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์บนจานเพาะเชื้อ สายพันธุ์ละ 3 จาน ปกติจะสามารถทำสไลด์ได้ 2 สไลด์ ต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ ดังนั้นเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีสไลด์ 6 สไลด์ ภาพที่ใช้รายงานเป็นภาพที่ดีที่สุดที่คัดเลือกมาจาก 6 สไลด์

ขั้นตอนการทำฟาจที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ ทำได้โดยการกรองฟาจแขวนลอยผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร การกรองเป็นขบวนการที่สำคัญในการทำให้ฟาจบริสุทธิ์เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายใช้เวลาน้อย ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ อย่างไรก็ตามขั้นตอน และอุปกรณ์ที่ใช้ในขบวนการกรอง ก็มีความแตกต่างกันไปแล้วแต่ว่าใครจะเห็นว่าวิธีใดเหมาะสมที่สุด (Dickey and Bryden, 1946; Orlicek, 1956) เป็นที่ทราบกันดีว่าประสิทธิภาพของ

การกรองสารแขวนลอยของฟาจผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับขนาดและช่องของฟิลเตอร์แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอีกหลายประการ ซึ่งบางปัจจัยก็ไม่สามารถควบคุมได้ (Mackie and McCartney, 1950; Merchant, 1950; Barziza and Manso Soto,1974) Mudd (1928) ศึกษาวัสดุที่นำมาใช้ทำเป็นฟิลเตอร์ที่มีผลต่อฟาจ ผลการศึกษาพบว่าวัสดุที่ใช้ทำเป็นทำฟิลเตอร์มีความสำคัญต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ Salle (1954) รายงานว่าความสมดุลย์ของประจุไฟฟ้าที่อยู่รอบๆ วัสดุที่ใช้ในการกรองก็มีความสำคัญต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจโดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน ดังนั้นฟิลเตอร์ที่จะนำมาใช้ในการ กรองฟาจแขวนลอย ควรผ่านขบวนการปรับค่าความสมดุลย์ทางประจุไฟฟ้าให้เหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้งานเสมอการทำฟาจให้บริสุทธิ์โดยการกรองมีผลในการลดปริมาณฟาจ Lanning and Williams (1982) พบว่าการกรองสารแขวนลอยของแอคติโนฟาจหมายเลข ϕ069 มีผลทำให้สูญเสียปริมาณของฟาจไปประมาณ 27 - 55 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเริ่มต้น Willoughby *et al.* (1972) รายงานว่า แอคติโนพลาเนส (actioplanes) ฟาจจะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ เมื่อสารละลายของดินที่ใช้ในการแยกฟาจถูกกรองผ่านฟิลเตอร์เมมเบรน

ขั้นตอนการทดสอบฟาจที่แยกได้นั้น สามารถใช้ฟาจแขวนลอยที่ได้จากการปั่นและกรองผ่านฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตรมาทดสอบบนอาหารแข็งสองชั้นได้เลย โดยไม่จำเป็นต้องกรองฟาจแขวนลอยที่ได้ผ่านฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตรก่อนเพื่อให้ปราศจากเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากในกรณีที่ต้องการทดสอบฟาจแขวนลอยเป็นจำนวนมากสามารถที่จะประหยัดการใช้ฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตรได้อย่างมาก การใช้ฟาจแขวนลอยที่ผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตรมาทดสอบ มักจะเกิดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และรา อย่างไรก็ตาม ความสำคัญของการทดสอบฟาจแขวนลอยนั้นอยู่ที่ต้องการทดสอบว่าฟาจแขวนลอยหมายเลขใดก่อให้เกิดพล๊าคได้บ้าง ดังนั้นการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือราก็ไม่มีความสำคัญมากนัก จากนั้นสามารถนำฟาจแขวนลอยที่เกิดพล๊าคไปกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อให้ฟาจแขวนลอยบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนได้ในภายหลัง

การเพิ่มจำนวนฟาจให้มีปริมาณมาก ใช้วิธีของ Kuhn *et al.* (1987) ซึ่งทำโดยนำฟาจแขวนลอยบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไปทดสอบบนอาหารแข็งสองชั้น โดยทำซ้ำ 10 จานต่อฟาจแขวนลอยหนึ่งชนิด เมื่อเกิดพล๊าคขึ้นก็เติมนิวเตรียนท์ บร์อท ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อจานลงบนจานทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำสารละลายใสที่ได้จาก 10 จานมารวมกัน นำไปตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์และโพลีเอทธิลีนไกลคอล ต่อไป นอกจากวิธีดัง

กล่าวแล้วพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณฟาจได้อีกหนึ่งวิธี โดยนำฟาจบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุนิวเตรียนท์บร์อทปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยลงไป บ่มหลอดทดลองดังกล่าว ประมาณ 16-32 ชั่วโมงที่ 28 อาศาเซลเซียส นำสารผสมฟาจกับสปอร์แขวนลอยไปปั่นที่ 4,000 รอบ 10 นาที นำส่วนน้ำใสมากรองผ่านฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารแขวนลอยฟาจที่ได้ไปตกตะกอนฟาจต่อไป ทั้งนี้ถ้าต้องการฟาจปริมาณมาก ก็สามารถเพิ่มจำนวนหลอดที่ทำได้จากนั้นนำมารวมกัน วิธีนี้ทำให้ไม่ต้องเตรียมนิวเตรียนท์อการ์เพลตจำนวนมาก นอกจากนั้นยังไม่ต้องใช้สลอปปี้ อการ์ด้วย

ขั้นตอนการตกตะกอนฟาจ มักจะมีขั้นตอนการปั่นและเขย่าฟาจแขวนลอยอย่างรุนแรง ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อสภาพธรรมชาติของฟาจ เช่น ส่วนหัวและหางหลุดออกจากกัน ส่วนขาเกิดการขาดไม่สมบูรณ์ ซึ่งทำให้การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นไปได้ด้วยความลำบาก อย่างไรก็ตามสามารถลดปริมาตรของฟาจแขวนลอยจากการตกตะกอนเป็นการนำฟาจแขวนลอยที่ได้ไประเหยเอานิวเตรียนท์บร์อทส่วนเกินออกให้มีปริมาตรน้อยลง ในเครื่องระเหย (vaccuum) เช่น ไลโอฟิลิเซอร์ (lyophilizer) หรือ เครื่องระเหยที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ทั้งนี้การลดปริมาตรภายใต้อุณหภูมิต่ำจะช่วยลดการสูญเสียความสามารถในการทำกิจกรรมของฟาจได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจทั้ง 18 ชนิดที่แยกได้ (ตารางที่ 11 รูปที่ 136-153) ฟาจหมายเลข P4(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 54.3 x 53.3(กว้างxยาว) นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 10.7 x 110.7 (กว้างxยาว) นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐาน (baes plate) มีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา (tail fiber) ฟาจหมายเลข P6(2) มีส่วนหัวยาวปลายหัวท้ายโค้งมน ขนาด 44.7 x 79.0 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 16.7 x185.0 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P10(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 51.0 x 57.3 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดได้ ขนาด 16.0 x 112.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P10(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 43.3 x 46.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 8.3 x 105.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P11(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 52.0 x 57.0 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 12.3 x 210.0 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P13(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 48.0 x 54.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 9.0 x 153.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P13(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 56.7 x 60.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 12.0 x 173.7 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P13(3) มีส่วนหัวแบบ

หกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 56.0 x 66.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 16.7 x 104.7 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P16(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 45.7 x 47.0 นาโนเมตร ส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 12.3 x 139.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P16(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 59.0 x 58.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 9.0 x 233.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นปม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P20(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 84.3 x 70.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 12.3 x 281.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะแหลม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P26(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 43.7 x 53.3 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 9.3 x 130.0 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P26(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 58.3 x 60.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 8.7 x 266.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P26(4) มีส่วนหัวยาวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 50.0 x 76.3 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดได้ ขนาด 15.3 x 130.3 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P27(4) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 63.0 x 64.3 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 11.7 x 219.0 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P28(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 100.3 x 121.7 นาโนเมตร มีส่วนหางยาวแบบหดได้ ขนาด 29.0 x 467.0 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะแหลม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P29(2) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 58.3 x 55.7 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 10.3 x 220.7 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา ฟาจหมายเลข P30(1) มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 51.0 x 53.3 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาด 10.0 x 177.7 นาโนเมตร ส่วนแผ่นฐานมีลักษณะเป็นส้อม ไม่พบส่วนขา

ฟาจหมายเลข P10(1) P26(4) P28(1) มีลักษณะคล้ายฟาจในกลุ่มที่ห้า (V) ฟาจหมายเลข P4(2) P6(2) P10(2) P11(1) P13(1) P13(2) P13(3) P16(1) P16(2) P20(2) P26(1) P26(2) P27(4) P29(2) P30(1) มีลักษณะคล้ายฟาจในกลุ่มที่สี่ (IV) ของการจัดจำแนกฟาจตามลักษณะรูปร่างภายนอก ของ Bradley (1967) (รูปที่ 4)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจที่แยกได้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) กระทำตามวิธีของ Brenner and Horne (1959) โดยนำฟาจแขวนลอยที่อยู่ในแอมโมเนียมอะซิเตคบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตรของ 2 เปอร์เซ็นต์ฟอสโฟทังสติค แอซิค (pH 7.4) จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวสเปร์ยลงบนกริด ทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องให้แห้ง นำไปศึกษาด้วย TEM จากการทดลองพบว่าไม่สามารถตรวจพบฟาจได้เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นทั้งที่ได้ลองเปลี่ยนสภาวะในการเตรียมหลายอย่างแล้ว ซึ่งเข้าใจว่าน่าจะเกิดจากปัญหาสองประการคือ ประการแรกเกิดจากตัวอย่างที่นำมาศึกษามีฟาจอยู่ปริมาณน้อยหรือไม่มีฟาจอยู่เลย โดย Ackermann and Nguyen (1983) รายงานว่าปริมาณฟาจในตัวอย่างที่ใช้ศึกษาด้วย TEM เป็นข้อจำกัดในการมองเห็น ตัวอย่างเช่น ถ้าตัวอย่างประกอบด้วยฟาจน้อยกว่า 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้อง TEM ส่วนประการที่สอง เกิดจากสภาวะที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างนั้นยังไม่เหมาะสม เมื่อพิจารณาแล้วคิดว่าปัญหาที่สองแก้ไขได้ง่ายกว่าจึงได้ลองเปลี่ยนสีที่ใช้ย้อมเป็นยูรานิลอะซิเตด (Bradley and Kay, 1960; Bradley, 1962; Painter and Bradley, 1965) ผลการทดลองพบว่าสามารถเห็นฟาจได้แต่ไม่ค่อยมีความชัดเจนนักจึงได้เปลี่ยนแปลงสภาวะในการย้อมใหม่จนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดดังนี้คือ หยดฟาจแขวนลอยบนกริดทิ้งไว้ 5 นาที ใช้กระดาษกรองซับน้ำส่วนเกินออก หยดยูรานิลอะซิเตดเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (pH 4.3) จำนวน 5-10 หยดโดยหยดผ่านกริดทีละหยดอย่างช้าๆ ใช้กระดาษกรองซับสีส่วนเกินออก ใช้น้ำกลั่นหยดผ่านกริด 10-15 หยดเพื่อล้างสีส่วนเกินออก ใช้กระดาษกรองซับน้ำส่วนเกินออกอีกครั้ง วางกริดไว้จนกระทั่งกริดแห้ง นำกริดที่ได้ไปดูด้วยกล้อง TEM

ทั้งที่ Brenner and Horne (1959) รายงานว่าฟอสโฟทังสติคแอซิดเป็นสีย้อมที่ให้ผลดีในการศึกษา แต่ก็ไม่เข้าใจว่าเพราะเหตุใด ฟาจแขวนลอยที่ย้อมด้วยฟอสโฟทังสติคแอซิด จึงไม่สามารถตรวจพบฟาจได้ ต่อมาพบว่า เนื่องจากกริดที่ใช้เป็นที่รองรับตัวอย่างโดยทั่วไปเมื่อต้องการใช้จะนำไปฉาบคาร์บอน ซึ่งหลังการฉาบคาร์บอนแล้วคาร์บอนจะถูกหุ้มด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) อีกชั้น โดยพาราฟิล์มจะช่วยในการคงรูปของคาร์บอนที่ฉาบไว้ พาราฟิล์มนี้เองเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ฟอสโฟทังสติคแอซิดที่ย้อมไม่สามารถผ่านเข้าไปในส่วนคาร์บอนที่ฉาบอยู่ได้ จากคุณสมบัติที่ไม่รวมกันของโมเลกุลน้ำมันที่เป็นส่วนประกอบบนพาราฟิล์มกับฟอสโฟทังสติคแอซิดดังนั้นการแก้ปัญหาดังกล่าวทำได้โดยการนำเอากริดที่ฉาบคาร์บอน และถูกหุ้มด้วยพาราฟิล์ม ไปจุ่มใน อีเทอร์หรือ คลอโรฟอร์ม ก่อนใช้เตรียมตัวอย่าง เมื่อทดลองเตรียมตัวอย่างฟาจแขวนลอยด้วยวิธีดังกล่าวก็สามารถตรวจพบฟาจได้ (รูปที่ 154) นอกจากนี้มีข้อมูลแสดงให้เห็นว่าถ้าผสม 0.2 เปอร์เซ็นต์ซูโครส กับฟอสโฟทังสติคแอซิด จะมีผลให้ความคมชัดในรายละเอียด และความแตกต่างของส่วนหัวของฟาจที่มีดีเอ็นเอ และไม่มีดีเอ็นเอชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากซูโครสจะทำหน้าที่ช่วยให้ประสิทธิภาพการติดสีของฟอสโฟทังสติคแอซิดดียิ่งขึ้น (Coyette and Calber-bacq, 1967) เมื่อเปรียบเทียบภาพที่ได้จากการย้อมด้วยยูรานิลอะซิเตด กับฟอสโฟทังสติค แอซิด พบว่า การย้อมด้วยยูรานิลอะซิเตด ให้ความคมชัดในรายละเอียดที่มีขนาดเล็ก ได้ดีกว่าการย้อมด้วยฟอสโฟทังสติคแอซิด (รูปที่ 149 และ 154)

การวิจัยครั้งนี้ได้บรรลุตามวัสดุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ สามารถแยกเชื้อ *Actinomycetes* ได้ทั้งหมด 95 สายพันธุ์จากตัวอย่างดิน 31 ตัวอย่างที่เก็บมาจาก 10 จังหวัดของประเทศไทย จากเชื้อที่แยกได้เมื่อนำมาใช้เป็นโฮสท์เพื่อแยกฟาจ พบว่าสามารถแยกฟาจได้ 18 ชนิด โดยฟาจที่แยกได้ทั้งหมดมีโฮสท์อยู่ในจีนัส *Streptomyces* ฟาจที่แยกได้ส่วนใหญ่แยกได้จากดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง ยกเว้น ฟาจหมายเลข P4(2) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.6 ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการแยกฟาจในกลุ่ม *Streptomycetes* ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 มาก่อน การศึกษาลักษณะของฟาจที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีพสเตนนิ่ง พบว่าการย้อมสีด้วยยูรานิลอะซิเตดทำให้เห็นความแตกต่างและรายละเอียดในส่วนที่มีขนาดเล็กได้ดีกว่าการย้อมด้วยฟอสโฟทังสติคแอซิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจที่แยกได้พบว่าฟาจที่แยกได้ส่วนใหญ่จะมีส่วนหัวเป็นแบบหกเหลี่ยมลูกบาศก์ มีส่วนหางยาวแต่หดไม่ได้ ยกเว้น ฟาจหมายเลข P10(1) P26(4) P28(1) ที่มีส่วนหางแบบหดได้ อย่างไรก็ตามฟาจที่แยกได้จะมีความแตกต่างกันไปในรายละเอียดของส่วนหัว ขนาด ชนิดของส่วนหาง และชนิดของแผ่นฐาน ฟาจ 18 ชนิดที่แยกได้อาจมีบางชนิดเป็นฟาจชนิดใหม่ที่ยังมิได้เคยรายงานการแยกมาก่อน อย่างไรก็ตามก็ไม่มีข้อมูลยืนยันเนื่องจากไม่สามารถหาเอกสารการจัดจำแนกฟาจของ *Streptomycetes* ได้ งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกของประเทศที่รายงานการแยกและศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของฟาจจากดิน ซึ่งผลของการวิจัยได้มีการพัฒนาปรับปรุงวิธีการแยกฟาจ การทำฟาจให้บริสุทธิ์ การเพิ่มปริมาณของฟาจและการศึกษาลักษณะของฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน จากวิธีการที่อ้างอิงมาจากต่างประเทศเพื่อให้มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมในการดำเนินงานวิจัยในระดับขยายส่วนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย