

ลักษณะเฉพาะของแอคติโนฟาจที่แยกจากสเตรปโตมัยซีทีสในดิน

นางสาว เจนจิรา เดชรักษา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-718-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20508463

CHARACTERIZATION OF ACTINOPHAGES ISOLATED FROM  
STREPTOMYCETES IN SOIL

Miss Janejira Deatraksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

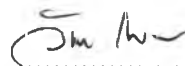
Academic Year 2000

ISBN 974-346-718-1

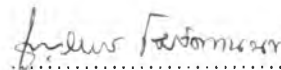
หัวข้อวิทยานิพนธ์      ลักษณะเฉพาะของแอคติโนฟาจที่แยกจากสเตรปโตมัยซีทีสในดิน  
โดย                              นางสาว เจนจิรา เดชรักษา  
ภาควิชา                              จุลชีววิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์

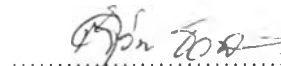
---

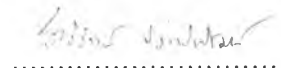
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


 ..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจริต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาตวิทย์ ไชยदानนท์)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

 ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

 ..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวนิชย์)

เจนจิรา เดชรักษา : ลักษณะเฉพาะของแอกติโนฟาจที่แยกจากสเตรปโตมัยซิทีสในดิน  
(CHARACTERIZATION OF ACTINOPHAGES ISOLATED FROM STREPTOMYCETES  
IN SOIL) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุรีนา ชวนิชย์, 92 หน้า, ISBN 974-346-718-1.

จากการศึกษาลักษณะของแอกติโนฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในสเตรปโตมัยซิทีสจากดิน 18 ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย พบว่าสามารถแยกและศึกษาลักษณะบางประการของสเตรปโตมัยซิทีสได้จำนวน 50 สายพันธุ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิก แอซิด วิตามิน อการ์ เมื่อทำการแยกแอกติโนฟาจจากดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ และตรวจสอบการติดเชื้อในสเตรปโตมัยซิทีส โดยดูจากการเกิดปลาคบนลอนของสเตรปโตมัยซิทีสด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าสามารถแยกแอกติโนฟาจได้จำนวน 12 ชนิด คือ Ac1 ถึง Ac12 แอกติโนฟาจทุกชนิดยกเว้น Ac3 มีสมบัติเป็นไวรัสเลนต์ฟาจกับสเตรปโตมัยซิทีสสายพันธุ์จำเพาะที่แยกแอกติโนฟาจชนิดนั้นๆได้ โดยให้พลาไคที่มีลักษณะใส ส่วน Ac3 มีสมบัติเป็นเทมเพอเรตฟาจ โดยให้พลาไคที่มีลักษณะขุ่น แอกติโนฟาจแต่ละชนิดจะให้พลาไคที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ มีขนาดตั้งแต่ 0.5 ถึง 8.0 มิลลิเมตร

ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโดยวิธีเนกาทีฟ สเตนนิ่ง พบว่าอนุภาคของแอกติโนฟาจทุกชนิดมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมที่มีขนาดต่างๆกัน ส่วนหางยาวแต่ไม่สามารถหดตัวได้ แอกติโนฟาจ Ac1 และ Ac5 มีโครงสร้างแผ่นฐานบริเวณปลายของส่วนหางด้วย เมื่อนำอนุภาคแอกติโนฟาจทั้งหมดมาทำการจัดจำแนกตามวิธีการจัดจำแนกของ Bradley พบว่าแอกติโนฟาจทุกชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม B จากการศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของแอกติโนฟาจแต่ละชนิดพบว่ามีความแตกต่างกัน แอกติโนฟาจ Ac3 มีโฮสต์-เรนจ์กว้างที่สุด คือ สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมัยซิทีสสายพันธุ์ต่างๆ ได้ 17 สายพันธุ์ แอกติโนฟาจ Ac5 มีโฮสต์-เรนจ์แคบมาก คือ สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมัยซิทีสได้ 1 สายพันธุ์เท่านั้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา 2543.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# 4072236823 : Major INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD ; ACTINOPHAGE / STREPTOMYCETES / CHARACTERIZATION / PLAQUE /  
HOST RANGE

JANEJIRA DEATRAKSA ; CHARACTERIZATION OF ACTINOPHAGES  
ISOLATED FROM STREPTOMYCETES IN SOIL. THESIS ADVISOR ; ASSOC.  
PROF. SURINA CHAVANICH, Ph.D. 92 pp. ISBN 974-346-718-1.

Eighteen soil samples collected from different sources of Thailand were used for isolation and characterization of actinophages infecting streptomycetes. Fifty strains of streptomycetes were isolated from soils by using humic acid vitamin agar medium, and they were partially characterized. An enrichment method was applied for actinophage isolation. Plaque formation, an appearance of phage infecting on host cells of streptomycetes, was detected by double agar layer technique. Twelve actinophages were designated as Ac1 to Ac12. All actinophages except Ac3 which produced clear plaques on lawns of streptomycetes, were virulent phages. The actinophage Ac3 producing turbid plaques was a temperate phage. Plaques formed by the actinophages were different in size, with diameter from 0.5 to 8.0 mm.

Phage morphology was examined by transmission electron microscopy using negative staining technique. Most of detected actinophage particles were different in size of hexagonal heads but having similar long and non-contractile tails. Ac1 and Ac5 each had a baseplate at the end of the tail. All of the phages were morphological similarly and belonging to group B according to Bradley's classification. Each actinophage displayed different host range. The Ac3 had a broad host range, it could infect 17 strains of tested streptomycete, while the Ac5 had a narrow host range, it could infect only one strain of tested streptomycete.

Department      Microbiology..... Student's signature..... Janejira Deatraksa  
Field of study    Industrial Microbiology..... Advisor's signature..... Surina Chavanich  
Academic year    2000..... Coadvisor's signature.....



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอด และยังได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โสมจิตานนท์ ที่กรุณารับเป็น ประธานกรรมการสอบ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีวะวิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ในการศึกษาระดับ บัณฑิตศึกษานี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณอรอนงค์ พริ้งสุลกะ ที่เป็นที่ปรึกษาและช่วยให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้และขอขอบคุณ คุณธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ คุณวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร คุณอุรัจฉวี อุณหเลขกะ และคุณสุวีรัตน์ ยาทิพย์ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดี ตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีวะวิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดหลักสูตรการศึกษานี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังสำคัญ ที่สุดที่ช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ณ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทรรศน์.....	4
3. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	29
4. ผลการวิจัย.....	37
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	72
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	92

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างของแอกติโนฟาจที่เกิดการติดเชื้อมีแบคทีเรียที่ไม่อยู่ในกลุ่มแอกติโนมัยซีทีส	20
4.1 แหล่งที่มา ลักษณะทั่วไปและค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน.....	37
4.2 หมายเลขของสายพันธุ์สเตรปโตมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 18 ตัวอย่าง.....	39
4.3 สีของโคโลนีและสปอร์ และการสร้างรงควัตถุของสเตรปโตมัยซีทีสที่แยกจากดิน.....	41
4.4 แอกติโนฟาจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อมีสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากดิน.....	43
4.5 ค่าความสามารถในการเกิดพ্লা็คและลักษณะของพ্লা็คของแอกติโนฟาจ Ac1 ถึง Ac12.....	44
4.6 ขนาดของแอกติโนฟาจ (นาโนเมตร).....	48
4.7 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. luteus</i> และ <i>Ps. fluorescens</i> ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ทำการแยกแอกติโนฟาจได้	62
4.8 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> และ <i>A. niger</i> ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ทำการแยกแอกติโนฟาจได้.....	63
4.9 การก่อกำเนิดการติดเชื้อมีของแอกติโนฟาจ Ac1 ถึง Ac12 กับสเตรปโตมัยซีทีส สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกจากดิน.....	64
4.10 การก่อกำเนิดการติดเชื้อมีของแอกติโนฟาจ Ac1 ถึง Ac12 กับสเตรปโตมัยซีทีส สายพันธุ์อ้างอิง.....	67
4.11 จำนวนสายพันธุ์สเตรปโตมัยซีทีสที่ถูกทำให้ติดเชื้อมีด้วยแอกติโนฟาจแต่ละชนิด.....	69



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	โครงสร้างและการเรียงตัวของแคปซิดรูปทรงไอโคซาฮีดรัล (a) และรูปร่างสายยาว (b)	6
2.2	ส่วนประกอบต่างๆของอนุภาคฟาจ.....	6
2.3	รูปร่างอนุภาคพื้นฐาน 3 แบบของฟาจ รูปทรงไอโคซาฮีดรัลและไม่มีส่วนหางของฟาจ $\phi$ X174 (a1), รูปทรงไอโคซาฮีดรัลและมีส่วนหางของฟาจ T4 (b1), และรูปร่างสายยาวของฟาจ M13 (c1) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและรูปไดอะแกรมแสดงรูปร่างอนุภาคฟาจทั้ง 3 แบบ (a2), (b2) และ (c2).....	7
2.4	การจำแนกฟาจด้วยวิธีการของ Bradley โดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก	10
2.5	การจัดจำแนกและเรียกชื่อฟาจในระดับแฟมิลี.....	10
2.6	ไลติก ไซเคิลของ T-even phage.....	13
2.6	ไลโซเจนิค ไซเคิลของแลมดาฟาจ.....	15
2.7	การเพาะเลี้ยงฟาจด้วยวิธีการทำอาหารร่วนสองชั้น (double agar layer method).....	16
2.8	ลักษณะของพลาัค รูปบน : ลักษณะพลาัคใสของฟาจ T <sub>2</sub> และ T <sub>4</sub> รูปล่าง : ลักษณะพลาัคขุ่นของแลมดาฟาจ.....	17
2.10	การสร้างโคนิเดียของสเตรปโตมัยซีทีส.....	21
2.11	โครงสร้างการเรียงตัวของสายสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีส.....	22
4.1	ลักษณะของพลาัคของแอกติโนฟาจ Ac1 และ Ac2.....	45
4.2	ลักษณะของพลาัคของแอกติโนฟาจ Ac3 และ Ac4.....	45
4.3	ลักษณะของพลาัคของแอกติโนฟาจ Ac5 และ Ac6.....	46
4.4	ลักษณะของพลาัคของแอกติโนฟาจ Ac7 และ Ac8.....	46
4.5	ลักษณะของพลาัคของแอกติโนฟาจ Ac9 และ Ac10.....	47
4.6	ลักษณะของพลาัคของแอกติโนฟาจ Ac11 และ Ac12.....	47
4.7	รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac1 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกำลังขยาย 150,000 เท่า.....	49
4.8	รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac2 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกำลังขยาย 150,000 เท่า.....	49
4.9	รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac3 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกำลังขยาย 150,000 เท่า.....	50

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac4 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	50
4.11 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac5 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	51
4.12 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac6 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	51
4.13 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac7 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	52
4.14 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac8 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	52
4.15 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac9 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	53
4.16 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac10 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	53
4.17 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac11 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	54
4.18 รูปร่างอนุภาคของแอกติโนฟาจ Ac12 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	54
4.19 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ S5-1 กำลังขยาย 400 เท่า.....	55
4.20 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ S5-2 กำลังขยาย 400 เท่า.....	56
4.21 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ S6-2 กำลังขยาย 400 เท่า.....	56
4.22 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ S7-1 กำลังขยาย 400 เท่า.....	57
4.23 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยซีเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์ S7-3 กำลังขยาย 400 เท่า.....	57

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S9-1 กำลังขยาย 400 เท่า.....	58
4.25 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียม และการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S9-2 กำลังขยาย 400 เท่า.....	58
4.26 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S9-3 กำลังขยาย 400 เท่า.....	59
4.27 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S9-4 กำลังขยาย 400 เท่า.....	59
4.28 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S9-7 กำลังขยาย 400 เท่า.....	60
4.29 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S10-1 กำลังขยาย 400 เท่า.....	60
4.30 ลักษณะของโคโลนี (a) รูปร่างมัยชิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์ (b) ของสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S11-3 กำลังขยาย 400 เท่า.....	61
4.31 ลักษณะของพลาัคที่ เกิดจากการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ Ac4, Ac5, Ac6, Ac7, Ac8, Ac9 และ Ac11 กับสเตรปโตมัยชิทีสสายพันธุ์ S6-2.....	71