รายการอ้างอิง

Ackermann, H. W. 1983. Current problems in bacterial virus taxonomy, pp.105-121. In Matthews,R.E.F.(ed.), A critrical appraisal of viral taxonomy. Florida, Boca Raton: CRC Press.

Ackermann, H. W. 1987. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol.Sci. 4: 214-218.

Ackermann, H. W., and Eisenstark, A. 1974. The present state of phage taxonomy. Intervirology. 3: 201-219.

Ackermann, H. W., and Nguyen,T. M. 1983. Sewage coliphages studies by electron microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1049-1059.

Adams, M. H. 1948. Surface incativation of bacterial viruses and of proteins. J. Gen. Physiol. 31: 417.

Adams, M. H. 1959. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers. Inc.

Alcamo, I. E. 1983. Fundamental of microbiology. Sydney, Australia : Addison-Wesley Publishing company.

Almeida, J. 1963. A classification of virus particle based on morphology. Can. Med. Assoc. J. 89: 787.

Anderson, T. F. 1949. The reaction of bacterial viruses with their host cells. Botan. Rev. 15: 464.

Anderson, T. F., Boggs, S., and Winters, B. S. 1948. The relative sensitivities of bacterial viruses to intense sonic vibration. Science. 108: 18.

Anderson, T. F., and Doermann, A. H. 1952. Sonic reactivation of antiserum neutralized bacteriophage T3. J. Bacteriol. 63: 291.

Anderson, T. F., Rappaport, C., and Muscatine, N. A. 1953. On the structure and osmotic properties of phage particles. Ann. Inst. Pasteur. 84: 5.

Andrewes, C. H. 1967. The Natural History of Viruses. London: Weideufeld and Nicolson Press.

Anson, M. L. 1946. Symposium of detergents properties by denaturing protein and cell membranes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 46: 347.

Baas, P. D., and Jansz, H. S. 1988. Single-stranded DNA phage origins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 136: 31-70.

Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. Bacteriol. Rev. 35: 235-241.

Bamford, D. H., Ramantschuk, M., and Somerharju, P.J. 1987. Membrane fusion in prokaryotes: bacteriophage ϕ6 membrane fuses with the *Pseudomonas syringae* outer membrane. EMBO J. 6: 1467-1473.

Barnet, Y. M. 1972. Bacteriophages of *Rhizobium trifolii*. 1. Morphology and host range. J. Gen. Virol. 15: 1-15.

Barziza, C. M., and Manso Soto, A. 1974. Microbiolgia. Argentina: Liberria Hachette S. A. Inc.

Bazinet, C., and King, J. 1985. The DNA translocation vertex of dsDNA bacteriophage. Ann. Rev. Microbiol. 39: 109-129.

Berg, G. 1978. The indicator system, pp. 1-13. In: G. Berg (ed.), Indicator of Viruses in Water and Food. Michigan: Ann. Arbor Science.

Bishai, W. R., and Murphy, J. R. 1988. Bacteriophage gene products that cause human disease, in: The Bacteriophages (Calendar, R., Ed.). Vol.2 pp.683-723, New York: Plenum Press.

Bitton, G. 1980. Introduction to Environmental Virology. New York: Wiley-Interscience.

Black, L. W. 1988. DNA packing in dsDNA bacteriophages, in: The Bacteriophages (Calendar, R., ED.). Vol.2, pp.321-373, New York : Plenum Press.

Black, L. W. 1989. DNA packing in dsDNA bacteriophages. Ann. Rev. Microbiol. 43: 267-292.

Boyd, R. F. 1984. General microbiology. Toronto, Canada: Time Mirror/Mosby College publishing.

Bradley, D. E. 1962. A study of the negative staining process. J. Gen. Microbiol. 29: 503-563.

Bradley, D. E. 1965. The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope. J. Roy Microscop. Soc. 84: 257.

Bradley, D. E. 1966. The structure and infective process of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage containing RNA. J. Gen. Microbiol. 45: 83-96

Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bact. Rev. 31: 230-314.

Bradley, D. E., and Kay, D. 1960. The fine structure of bacteriophages. J. Gen. Microbiol. 23: 553-563.

Bradley, S. G., Lee, B. E., and Jones, L. A. 1963. Preparation of Phage-Typing Reagent: Growth, Purification, and Concentration of Actinophages. Develp. Ind. Microbiol. 4: 288.

Brenner, S., and Horne, R. W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochem et Biophy ACTA 34: 103-110.

Brock, T. D. 1991. Biology of Microorganisms. (6th ed.) Englewood Cliffs: Prentice-Hall International, Inc.

Brodetsky, A. M., and Romig, W. 1966. Characterization of *Bacillus subtilis* bacteriophages. J. Bacteriol. 90: 1655-1663.

Bronfenbrenner, J. 1925. Effect of electrolytes on the rate of inactivition of bacteriophage during precipitation. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 23: 187.

Burnet, F. M. 1933a. Specific agglutination of bacteriophage particles. Brit. J. Exptl. Pathol. 14: 302.

Burnet, F. M. 1933b. Some of the agents used as aids to the classification of phage types. J. Pathol. Bacteriol. 37: 179.

Burnet, F. M., and Lush, D. 1940. Action of certain surface active agents on viruses. Australian J. Exptl. Biol. Med. 18: 141.

Burnet, F. M., and McKie, M. 1930. Effect of sodium and potassium salt to heat inactivation of phages. J. Pathol. Bacteriol. 33: 637.

Buzzell, A., and Lauffer, M. A. 1952. X-ray studies on T5 bacteriophage. Arch. Biochem. 39: 195.

Bystricky, V., Stotzky, G., and Schiffenbauer, M. 1975. Electron microscopy of T-1 bacteriophage adsorbed to clay minerals: Application of critical point drying method. Can. J. Microbiol. 21: 1278-1282.

Cameron, J. R., Panasenko, S. M., Lehman, I. R., and Davis, R. W. 1975. In vitro construction of bacteriophage lamda carrying segments of the E. coli. chromosome : selection of hybrids containing the gene for DNA ligase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 72: 3416-3420.

Campbell, A. 1988. Phage evolution and speciation,in: The Bacteriophages (Calendar, R., Ed.). Vol.1, pp. 1-14, NewYork: Plenum Press.

Campbell, A., and Botstein, D. 1983. Evolution of the lambdoid phages,in: LambdaII(Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W., Weisberg, R. A. ,Eds.) pp. 365-380, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Campbell-Reuton, M. L. 1937. Radiation of bacteriophage with ultraviolet light. J. Pathol. Bcateriol. 45: 237.

Campbell-Reuton, M. L. 1942. Experiment on shaking bacteriophage. J. Pathol. Bacteriol. 54: 235.

Casida, L. E., and Liu, K. C. 1974. Arthrobacter globiformis and its bacteriophage in soil. Appl. Microbiol. 28: 951-959.

Casjens, S., and Hendrix, R. W. 1988. Control mechanisms in dsDNA phages assembly,in: The Bacteriophages (Calendar, R., Ed.). Vol.1, pp.15-92. NewYork: Plenum Press.

Casper, D. L. D. 1965. Design principles in virus particle construction. In: Viral and Rickettsial Infection of Man. (Horstall, F. L., and Tamm, I., eds.) 4th ed., pp. 51-93. Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania.

Clair, J., and McCoy, E. 1959. Plaque morphology of certain streptomycetes phages. J. Bacteriol. 77: 131-135.

Clark, W. A. 1962. Comparision of several methods for preserving bacteriophage. Appl. Microbiol. 10: 466-471.

Clifton, C. E. 1931. Photodynamic action of certain dyes on the inactivation of staphylococcus bacteriophage. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 28: 745.

Cohen, S. S. 1974. The synthesis of bacterial viruses in infected cells. Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 12: 35.

Coyette, J., and Calberg-bacq, C. M. 1967. Morphological charactistics of three new actinophages. J. Gen. Virol. 1: 13-18.

Dabora, R. L., and Cooney, C. L. 1990. Intarcellular lytic enzyme systems and their use for disruption of *Escherichia coli*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 43: 11-30.

Davies, F. L., and Williams, S. T. 1970. Studies on the ecoloy of actinomycetes in soil. I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. Soil. Biol. Biochem. 2: 227.

d'He'relle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des baciles dysenteriques. C.R. Acad. Sci. (Paris) 165: 373-375.

d'He'relle, F. 1926. The Bacteriophage and Its Behavior. Baltimore: Williams & Wilkins Inc.

Dhillon, T. S., and Dhillon, E. K. S. 1976. Temperate coliphage HK022: Clear plaque mutants and preliminary vegetative map. Jap. J. Microbiol. 20: 385-396.

Dhillon, T. S., Dhillon, E. K. S., Chan, H. C., Li, W. K., and Tsang, H. C. 1976. Studies on bacteriophage distribution : Virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. Appl. Environ. Microbiol. 32: 68-74.

Dickey, G. D., and Bryden, C. L. 1946. Theory and practice of filtration. New York: Reinhold Publishing Corp.

Dimmock, N. J., and Primrose, S. B. 1994. Introduction to Modern Virology. New York: Blackwell Science Ltd.

Doermann, A. H. 1952. The intracellular growth of bacteriophages : I. Liberation of intracellular bacteriophages T4 by premature lysis with an other phage or with cyanide. J. Gen. Physiol. 35: 645.

Doskocil, J., Stokrova, J., Storchova, H., Forstova, J., Meyer, J. 1988. Correlation of physical maps and some genetic functions in the genomes of the Kappa-theta phage family of *Bacillus lichenniformis*. Mol. Gen. Genet. 214: 343-347.

Dowding, J. E., and Hopwood, D. A. 1973. Temperate bacteriophages for *Streptomyces coelicolor*. A3(2) isolated from soil. J. Gen. Microbiol. 78: 349-359.

Duboise, S. M., Moore, B. E., Sorber, C. A., and Sagik, B. P. 1979. Viruses in soil systems, pp.245-285. In Isenberg, H.D. (ed.), CRC Critical Reviews in Microbiology,vol.7. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Dulbecco, R. 1950. Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivation with ultraviolet radiation. J. Bacteriol. 59: 329.

El-Nekeeb, M. A., and Lechevalier, H. A. 1963. Selective islation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 11: 75.

Fiers, W. 1979. RNA bacteriophages. Compr. Virol. 13: 69-204.

Foster, R. A. C., Jonhson, F. H. and Miller, V. K. 1949. The influenece of hydrostatic pressure and uretane on the thermal inactivation of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 33: 1.

Fraenkel-Conrat, H. 1969. The Biochemistry and Bilology of Viruses. New York: Academic Press.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. (Eds.) 1991. Classification and Nomenclature of Viruses (Fifth Report of the International Committee on taxonomy of Viruses). Arch. Virol. Suppl. 2.

Fre'de'ricq, P. 1952. Emploi du chloroforme pour mesurer le taux de fixation des ente'robacte'riophages par les bacte'ries vivantes. Compt. rend. soc. biol. 146: 327.

Friedman, D. I. 1988. Regulation of phage gene expression by termination and antitermination of transcription, In: The Bacteriophages (Calendar, R., ed.), Vol. 2, pp. 263. NewYork: Plenum Press.

Germida, J. J., and Casida, L. E. 1981. Isolation of Arthrobacter bacteriophages from soil. Appl. Environ. Microbiol. 41: 1389-1393.

Gilmour,C.M., Noller,E.C. and Watkins,B. 1959. Studies of *Streptomyces griseus.* host-phage system. J. Bacteriol. 78: 186-192.

Goodgal, S. H., Rupert, C. S., and Herriott, R. M. 1957. Photoreactivation of *Hemophilus influenzae.* Transforming Facter for Streptomycin Resistance by an Extract of *Escherichia coli*, B. In: W. D. McElroy and B. Glass, eds., Symposium on the Chemical Basic of Heredity, pp. 341-43. Baltimore: John Hopkins Press.

Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. 1987. Phage Ecology. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Guelin, A. 1952. Application de la recherche des bacteriophages a l' etude des eaux polluecs. I. La survie des enterobcateriacecs dans les eaux. II. Bacteriophages des eaux a grandes et petites phages. Ann. Inst. Pasture, Paris. 82: 78-89.

Harshey, R. M. 1988. Phage Mu ,in: The Bacteriophages (Calenda, R., Ed.) Vol.2 , pp.193-234. NewYork: Plenum Press.

Havalaar, A. H., and Hogeboom, W. M. 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J. Appl. Bacteriol. 56: 439.

Hayakawa, M., and Nonomura, H. 1987. Humic Acid-Vitamin Agar, a New Medium for the Selective Isolation of Soil *Actinomycetes*. J. Ferment. Technol. 65(5): 501-509.

Hendrix, R. W. 1988. Tail length determination in double-stranded DNA bacteriophages. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 136: 21-29.

Herriott, R. M. 1948. Inactivation of viruses and cells by mustard gas. J. Gen. Physiol. 32: 221.

Herriott, R. M., and Barlow, J. L. 1952. Preparation, purification and properties of *E. coli.* virus T2. J. Gen. Physiol. 36: 17.

Herriott, R. M., and Price, W. M. 1948. The formation of bacterial virues in bacteria rendered non-viable by mustard gas. J. Gen. Physiol. 32: 63.

Hilton, M. C., and Stotzky, G. 1973. Use of coliphages as indicators of water pollution. Can. J. Microbiol. 19: 747-751.

Hollaeuder, A. 1954. Radiation Biology : Vol. I High Energy Radiation. New York: MaGraw-Hill, Inc.

Holmers, F. 1948. The Filtrable Viruses. Baltimore: Williams and Wikin, Inc.

Holt, J. G. 1974. The Shorter Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed., Baltimore: Williams and Wilkins, Inc.

Hongo, M., Oki, T., and Ogata, S. 1972. Phage contamination and control, pp. 67-90. In: K. Yamada (ed.), The Microbial Production of Amino acids. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc.

Hoopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., and Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces sp.* : a labolatory manual. Norwich: The John Innes Foundation.

Hotchin, J. E. 1954. The purification and electron microscopical examination of the structure of staphylococcal bacteriophage K. J. Gen. Microbiol. 10: 50.

Inouye, M., and Inouye, S. 1991. Retroelements in bacteria. Trends Biochem. Sci. 16: 18-21.

Inouye, S., Sunshine, M.G., Six, E.W., and Inouye, M. 1991. Retronphage ϕR73 : An E. coli phage that contains a retroelement and integrates into a tRNA gene. Science. 252: 969-971.

Jansen, H. L. 1930. *Actinomycetes* in Danish soil. Soil Sci. 30: 59-77.

Jones, D., and Sneath, P. H. A. 1970. Genetic transfer and bacterial taxonomy. Bacteriol. Rev. 34: 48-81.

Kalter, S. S., Mordaunt, V. D., and Chapman, O. D. 1946. Isolation of E. coli. phage by means of cationic deterigents. J. Bacteriol. 52: 237.

Kaneko, T., Iwano, S., and Kitahara, K. 1955. Bacteriophage phenomena in fermentative microorganimse. Part 2. Effect of temperature on a *Leuconostoc* phage. J. Agric. Chem. 29: 788-793.

Kenard, R. P., and Velentine, R. S. 1974. Rapid determination of the presence of enteric bacteria in water. Appl. Microbiol. 27: 484-487.

Keogh, B. P., and Pettingill, G. 1966. Long term strorage of bacteriophages of lactic streptococci. Appl. Microbiol. 14: 421-424.

Keppel, F., Fayet, O., and Georgopoulos, C. 1988. Strategies of bacteriophage DNA replication,in: The Bacteriophages (Calendar,R., Ed.). Vol.2, pp. 145-161. NewYork: Plenum Press.

Kerby, G.P., Gowdy, R. A., Dillon, E. S., Dillon, M. L., Csakay, T. Z., Sharp, D. G., and Beard, J. W. 1949. Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *E. coli.* J. Immunol. 63: 93.

Klaenhammer, T. R., 1984. Interaction of bacteriophages with lactic streptococci. Adv. Appl. Microbiol. 30: 1-29.

Klein, M., Kalter, S. S., and Mudd, S. 1945. The action of synthetic detergents upon certain strains of bacteriophage and virus. J. Immunol. 51: 389.

Kolstad, R. A., and Bradley, S. G. 1964. Purification of *Streptomyces venezuelae* phages. J. Bacteriol. 87: 1157-1161.

Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., and Betzer, N. 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. Water Res. 8: 165-171.

Krueger, A. P. 1932. The heat inactivation of an anti-stapphylococcus bacteriophage. J. Gen. Physiol. 15: 363.

Krueger, A. P., and Baldwin, D. M. 1934. The reversible inactivation bacteriophage by $HgCl_2$. J. Gen. Physiol. 17: 499.

Krueger, A. P., Scribner, E. J., and Mecracken, T. 1940. Photodynamic inactivation of phage precursor by methylene blue. J. Gen Physiol. 23: 705.

Kurup, U. P., and Heinzen, R. J. 1978. Isolation and characterization of actinophages of *Thermoactinomyces* and *Micropolyspora*. Can. J. Microbiol. 24: 794-797.

Kuhn, S. P., Lampel, J. S., and Strohl, W. R. 1987. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from *Streptomyces galilaeus*. Appl. and Environ. Microbiol. 53: 2708-2713.

Kuhn, M. R., and Williams, S. T. 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophile actinomycetes. Soil Biol. and Biochem. 7: 345-348.

Labaw, L. W., Mosely, V. M., and Wyckoff, R. W. G. 1949. Lysis of formalinized bacteria by phage. Science. 110: 275.

Lanning, S., and Williams, S. T. 1982. Methods for the direct isolation and enumeration of actinophages in soil. J. Gen. Microbiol. 128: 2063-2071.

Lark, K. G., and Adams, M. H. 1953. The stability of phages as a function of the ionic environment. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 18: 171.

Latarjet, R., and Ephrati, E. 1948. Influence protectrice de certainces substances contre l'inactivation d'um bacteriophage par les rayon-X. Compt. rend. Soc. Biol. 142.

Latarjet, R., and Wahl, R. 1945. Pre'cisions sur l'inactivation des bacte'riophage par les rayons ultraviolets. Ann. Inst. Pasteur. 71: 336.

Lea, D. E. 1946. Actions of Radiations on Living Cells. London: Cambridge Univ. Press.

Lewin, B. 1977. Gene Expression - 3. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc.

Lingappa, Y., and Lockwood, J. L. 1961. A chitin medium for isolation growth and maintenance of actinomycetes. Nature (London). 189: 158-159.

Luria, S. E., Darnell, J.E., Baltimore, D., and Campbell, A. 1978. General Virology. (3rd edn.) New York: Jonh Wiley and Sons, Inc.

Luria, S. E., and Delbruck, M. 1942. Interferenc between bacterial viruses: II. Interference between inactivated bacterial virus and active virus of the same strain and of a different strain. Arch. Biochem. 1: 207.

Luria, S. E., and Dulbecco, R. 1949. Genetic recombinations leading to production of active bacteriophage from ultraviolet inactivated bacteriophage particles. Genetics. 34: 93.

Mackie, T. J., and McCartney, J. E. 1950. Handbook of practical bacteriology. (8th ed.) Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Manchester, L. 1986. Modelling the interaction of Streptomycetes and their phage. Ph.D. thesis, pp.289. University of Liverpool, Liverpool,England.

Marshall, K. C. 1968. Intercation between colloidal montmorillonite and cells of Rhizobium spp. with different ionogenic surfaces. Biochem. Biophys. Acta. 156: 179-186.

Marshall, K. C. 1969. Studies by microelectro-phoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and montmorillonite to rhizobia. J. Gen. Microbiol. 56: 301-306.

Mayers, V. L., and Spizizen, J. 1954. The isolation of deoxyribonucleic acid from bacteriophages by an improve method. J. Biol. Chem. 210: 877.

Merchant, I. A. 1950. Verterinary Bacteriology and Virology. (4th ed.) Iowa: Iowa State College Press.

Michelle-Bacq, C., and Horne, R. W. 1963. Morphology of actinophages ϕ17. J. Gen. Microbiol. 32: 131-133.

Mindich, L., Bamford, D. H. 1988. Lipid containing Bacteriophages, In: The Bacteriophages (Calendar, R., Edn.) Vol. 2, pp. 475-519. New York: Plenum Press.

Mudd, S. 1928. Filters and filtration. In: Filterable viruses. (Rivers,T. M., Edn.) Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Nanavutty, S. H. 1930. The thermal death rate of bacteriophage. J. Pathol. Bacteriol. 33: 203.

Nes, I. F., and Sorheim, O. 1984. Effect of infective of a bacteriophage in a starter culture during the production of salami dry sausage: a model study. J. Food. Sci. 49: 337-340.

Norris, J. R., and Richmond, M. H. 1978. Essays in Microbiology. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc.

Ogata, S., Hongo, M. 1979. Bacteriophages of the genus *Clostridium*. Adv. Appl. Microbiol. 25: 241-273.

Ogata, S., Suenaga, H., and Hayaashida, S. 1982. Lysogenic phages and defective phage particles of antibiotic- producing actinomycetes., p. 174. Internat. Union Microbiol. Soc. 13th Intern. Congr. Microbiol. Boston.

Orlicek, A. F. 1956. Les principes physiques de la filtration. Ge'nie chim. 76: 65-74.

Ostle, A. G., and Holt, J. G. 1979. Elution and inactivation of bacteriophage on soil and cation-exchange resin. Appl. Environ. Microbiol. 38: 59-65.

Painter,B.G. and Bradley,S.G. 1965. Electron microscopic observation on actinophages for *Streptomyces venezuelae*. J. Bacteriol.89:240-244.

Pato, M. L. 1989. Bacteriophage Mu,in: Mobile DNA (Berg, D.E., Howe, M.M.,Eds.). pp. 23-52. Washington,DC: American Society for Microbiology.

Pelczar, Jr. M. J., Chan, E. C. S., and Krieg, N. R. 1993. Microbiology Concepts and Applications. New York: McGraw-Hill, Inc.

Primrose, S. B., and Dimmock, N. J. 1980. Introduction to Modern Virology. Oxford, England: Blackwell Scientific, Inc.

Ptashne, M. 1992. A Genetic Switch, Palo Alto: Blackwell Sci. Publ. & Cell Press.

Putnam, F. W., Kozloff, L. M., and Neil, J. C. 1949. Biochemical studies of virus reproduction : I. Purification and properties of *E. coli*. bacteriophage T6 . J. Biol. Chem. 179: 303.

Putnam, F. W., Miller, D., Palm, L., and Evans, Jr. E. A. 1952. Biochemical studies of bacteriophage reproduction: X. Precursor of bacteriophage T7. J. Biol. Chem. 199: 177.

Reanney, D. C., and Marsh, S. C. N. 1973. The ecology of viruses attacking *Bacillus stearothermophilus* in soil. Soil Biol. 5: 339-408.

Reanney, D. C., Gowland, P. C., and Slater, J. H. 1983. Genetic interactions among microbial communities, pp. 379-422. In Slater, J.H., Whittenbury, R. and Wimpenny, J.W.T. (eds.), Microbes in thier Environments. Cambridge University Press, Cambridge.

Reed, A., and Cummings, S. 1945. Soil reaction-glass electrode and colorimetric methods for determining pH values of soil. Soil. Sci. 59: 97-104.

Roper, M. M., and Marshall, K. C. 1974. Modification of the interaction between *Escherichia coli* and bacteriophage in saline sediment. Microbiol. Ecol. 1: 1-13.

Roper, M. M., and Marshall, K. C. 1978. Effect of clay particle size on clay-*Escherichia coli*-bacteriophage interactions. J. Gen. Microbiol. 106: 187-189.

Rovozzo, G. C., and Burke, C. N. 1973. A Manual of Basic Virological Techniques. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc. .

Ruddick, S. M., and Williams, S. T. 1972. Syudies on the ecology of actinomycetes in soil. V. some factors influencing the dispersal and adsorption of spores in soil. Soil Biol. Biochem. 4: 93-103.

Salle, A. J. 1954. Fundamental Priciples of Bacteriology. 4th ed. New York: McGraw-Hill Book Co., Inc.

Santoro, T., and Stozky, G. 1967. Effect of electrolyte composition and pH on the particle size distribution of microorganisms and clay minerals as determined by electrical sensing zone method. Arch. Biochem. Biophys. 122: 664-669.

Sannders, G. F., and Campbell, L. L. 1966. Characterization of a thermophilic bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 91: 340-348.

Schulz, E. W., and Gebhardt, L. P. 1935. Nature of formation inactivation of bacteriophage. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 32: 1111.

Seeley, N. D., and Primrose, S. B. 1980. The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. J. Gen. Virol. 46: 87-95.

Setlow, R., Robbins, S., and Pollard, E. 1955. Action spectrum for latent period extension of T1 bacteriophage. Radiation Research. 2: 262.

Sharp, D. G., Hook, A. E., Taylor, A. R., Beard, D., Beard, J. W. 1946. Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of E. coli. J. Biol. Chem. 165: 259.

Shropshire, R. F. 1947. Bacterial dispersion by sonic energy. J. Bacteriol. 54: 325.

Simon, L. D., and Anderson, T.F. 1967. A Study of phage attack cell wall process. Virology. 32: 279-297.

Sozzi, T., Hose, H., Amico, D., and Gnaegi, F. 1982. Bacteriophage of *Leuconostoc oenos*. p. 174. Internat. Union Microbiol. Soc. 13th Intern. Congr. Microbiol. Boston, Massachusette.

Stock, C. C., and Francis, Jr. T. 1940. Studies on the effects of soap on influenza virus. J. Immunol. 47: 303.

Stouthamer, A. H., Daems, W. T. H., and Eigner, J. 1963. Electron microscope studies of bacteriophage adsorption with negative and positive staining. Virology 20: 246-250.

Stuttard, C., and Dwyer, M. 1981. A new temperate phage of *Streptomyces venezuelae*: Morphology, DNA molecular weight and host range of SWZ. Can. J. Microbiol. 2: 496-499.

Sykes, I. K., Lanning, S., and Williams, S. T. 1981. The effect of pH on soil actinophage. J. Gen. Microbiol. 122: 271-280.

Sykes, I. K., and Williams, S. T. 1978. Interactions of actinophage and clays. J. Gen. Microbiol. 108: 97-102.

Symonds, N., Toussaint, A., Van de Putte, P., and Howe, M. M.(Eds.) 1987. Phage Mu, Cold spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Takahashi, J. 1916. Genetic transduction in *Bacillus subtilis* Biochem. Biophys. Res. Commun. 5: 171..

Tan, J. S. H., and Reanney, D. C. 1976. Interactions between bacteriophages and bacteria in siol. Soil. Biol. Biochem. 8: 145-150.

Thomas, T. D., and Lowrie, R. J. 1975a. Starters and bacteriophages in lactic acid casein manufacture. I. Mixed strain starters. J. Milk Food Technol. 38: 269.

Thomas, T. D., and Lowrie, R. J. 1975b. Starters and bacteriophages in lactic acid casein manufacture II. Development of a controlled starter system. J. Milk Food Technol. 38: 275.

Tikhonenko, A. S. 1970. Ultrastructure of Bacterial Viruses. New York: Plenum Press.

Torvik, T., and Dundas, I. D. 1974. Bcateriophage of *Halobacterium salinarium* Nature (London). 248: 680.

Twort, F.W. 1915. An investigation on the nature of ultra microscopic viruses. Lancet II. 1241-1243.

Van duin, J. 1988. The single-stranded RNA bacteriophages, in: The Bacteriophages (Calendar,R.,Ed.). Vol.2 , pp.117-168. NewYork: Plenum Press.

Wahl, R., and Latarjet, R. 1947. Inactivation de bacte'riophages par des radiations de grande longeur d'onde (3,400-6,000 Å). Ann. Inst. Pasteur. 73: 957.

Watson, J. D. 1950. The properties of X-ray inactivated bacteriophage: I. Inactivation by direct effect. J. Bacteriol. 60: 697.

Watson, J. D. 1952. The properties of X-ray inactivated bacteriophage: II. Inactivation by indirect effects. J. Bacteriol. 63: 473.

Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., Weiner, A.M. 1987. Molecular Biology of gene, Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc.

Wentsel, R. S., O'Neil, P. E., and Kitchens, J. F. 1982. Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. Appl. Environ. Microbiol. 43: 430-434.

Wickner, S. 1992. DNA replication of plasmids and phages. Ann. Rev. Genet. 26.

Williams, S. T., and Lanning, S. 1984. Studies of the ecology of streptomycete phage in soil, pp. 473-483. In Ortiz-Ortiz,L.,Bojalil, L.F.and Yalcoleff, V. (eds.), Biochemical and Biomedical Aspects of *Actinomycetes*. London: Academic Press.

Williams, S. T., Mortimer, A. M., and Manchester, L. 1987. Ecology of soil Bacteriophages, pp. 157-176. In Goyal, M.S., Gerba, P.C., and Bitton, G. Phage Ecology. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H., and Tipler, L. S. 1980. The taxonomic implications of the reaction of representative *Nocardia* strains to actinophage. J. Gen. Microbiol. 119: 173-178.

Williams, S. T., Davies, F. L., Mayfield, C., and Khan, M. R. 1971. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. II. The pH requirement of streptomycetes from two acid soil. Soil Biol. and Biochem. 3: 187-195.

Williams, S. T., and Davies, F. L. 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. J. Gen. Microbiol. 38: 251.

Willoughby, L. G., Smith, S. M., and Bradshaw, R. M. 1972. *Actinomycetes* virus in freshwater. Fresh. Biol. 2: 19-26.

Yamamoto, N., and Anderson, T. 1961. Genomic masking and recombination between serologically unrelated phages P22 and P221. Virol. 14: 430.

Young, R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol. Rev. 56: 430-481.

Zachary, A. 1974. Isolation of bacteriophage to the marine bacterium *Beneckea natriegens* from coastal salt marshes. Appl. Microbiol. 27: 980-982.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ฮิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ มีเดียม (Humic Acid Vitamin Agar Medium, HV agar)

ฮิวมิค แอซิด (Humic acid) *	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.5	กรัม
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	1.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	0.02	กรัม
วิตามินบี (B-vitamin) **		
ไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide)	50.0	มิลลิกรัม
วุ้นผง (agar)	18.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.2	

* ฮิวมิคแอซิดต้องละลายใน 0.2 นอร์มอล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ก่อน

** วิตามินบี ประกอบด้วย

ไทอามิน-ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
ไรโบเฟลวิน (riboflavin)	0.5	มิลลิกรัม
ไนอะซีน (niacin)	0.5	มิลลิกรัม
ไพริดรอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโธทีเนท (Ca-pantothenate)	0.5	มิลลิกรัม
ไอโนซิทอล (inositol)	0.5	มิลลิกรัม
พารา-อะมิโนเบนโซอิค (p-aminobenzoic acid)	0.5	มิลลิกรัม
ไบโอติน (biotin)	0.5	มิลลิกรัม

ไซโคลเฮกซิมิดและวิตามินบี ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานเรียบร้อยแล้วก่อนใช้

2. แมนนิทอล มังบีน อการ์ มีเดียม (Mannitol Mungbean Agar Medium, MM medium)

แมนนิทอล (mannitol)	20.0	กรัม
ถั่วเขียวบดละเอียด	20.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	18.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	500.0	มิลลิลิตร
น้ำประปา (tap water)	500.0	มิลลิลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

3. นิวเตรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto-peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

4. นิวเตรียนท์ บร์อท (Nutrient Broth)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto-peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

<u>กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน</u> (Transmission Electron Microscope: TEM)

TEM จะประกอบด้วยระบบที่สำคัญ 4 ระบบคือ

1. ระบบสูญญากาศ (vacuum system)

ประกอบด้วยเครื่องดูดอากาศ 2 ชนิด ทำหน้าที่ประสานกันคือ เครื่องดูดอากาศออกชนิดกล (machanical pump) และเครื่องดูดอากาศชนิดน้ำมัน (diffusion pump) ซึ่งจะทำให้ภายในคอลัมน์เป็นสูญญากาศ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตอิเลคตรอน ซึ่งสภาวะสูญญากาศนี้เทียบได้เป็นความดันประมาณ 10^{-3} ถึง 10^{-8} ทอร์ (1 ทอร์ = 1/1000 บรรยากาศ) ซึ่งอิเลคตรอนสามารถเคลื่อนที่ไปได้ 2.5 เมตร การที่ภายในคอลัมน์จะต้องเป็นสูญญากาศ และต้องกำจัดโมเลกุลของกาซและอากาศออกก็เพราะ

1.1 โมเลกุลของกาซจะกั้นลำแสงอิเลคตรอน ทำให้ประจุอิเลคตรอนกระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบ ทำให้ภาพไม่ชัด คอนทราส(contrast) ของภาพไม่ดี

1.2 หากมีโมเลกุลของกาซในคอลัมน์ จะเกิดปฏิกริยาการแผ่รังสี (ionization) และจะไปกระทบกับลำแสงอิเลคตรอน ทำให้ลำแสงไม่คงที่หรือเคลื่อนที่ไปจากทิศทางเดิม

1.3กาซจะไปรวมตัวกับไส้ทังสเตนซึ่งเป็นไส้ของปืนอิเลคตรอน ทำให้เกิดการเผาไหม้ทำให้ไส้ขาดได้

1.4 กาซอาจไปจับบนตัวอย่าง ทำให้เกิดการปนเปื้อนบนตัวอย่างได้ ทำให้ตัวอย่างนั้นใช้ศึกษาต่อไม่ได้

2. ระบบแสงสว่าง (illuminating system)

ประกอบด้วยปืนอิเลคตรอน และ คอนเดนเซอร์เลนส์ เป็นแหล่งผลิตอิเลคตรอนจากไส้ทังสเตนที่อยู่ภายใน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าแรงสูงเข้าไปจะเกิดความร้อนมากจนมีการแผ่กระจายของอิเลคตรอน ส่วนคอนเดนเซอร์เลนส์ เป็นระบบรวบรวมประจุอิเลคตรอนโดยใช้สนามแม่เหล็ก เพื่อส่องไปยังตัวอย่าง ถ้าใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูงมากขึ้น คลื่นของอิเลคตรอนจะ

สั้นลง และการแจกแจงรายละเอียดจะดีขึ้น นั่นคือสามารถปรับเปลี่ยนความยาวโฟกัสของเลนส์นี้ได้โดยการควบคุมกระแสไฟฟ้า

คอนเดนเซอร์เลนส์ อาจมีได้มากกว่าหนึ่ง เพื่อควบคุมให้ลำแสงอิเลคตรอนมีความเข้ม และขนาดเล็กลง เพื่อจะได้ความสว่างมากขึ้น และเป็นการป้องกันไม่ให้ตัวอย่างถูกทำลายด้วยความร้อนที่เกิดจากอิเลคตรอน

ในเลนส์ระบบนี้ จะมีแผ่นไมลิบเดนัม อยู่ในช่องว่างซึ่งจะมีรูกลมๆ ขนาดเล็ก เรียกว่า aperture เพื่อควบคุมลำแสงอิเลคตรอน ให้เป็นจุดกลมที่สมบูรณ์ และป้องกันการกระจายของอิเลคตรอน ซึ่งจะทำให้ภาพไม่ชัดเจน aperture ซึ่งเล็กจะทำให้การแจกแจงรายละเอียดของภาพดีกว่า aperture ขนาดใหญ่ แต่คอนทราสจะเลวกว่า

3. ระบบภาพ (imaging system)

ประกอบด้วย เลนส์สนามแม่เหล็กไฟฟ้า 3 ตัว คือ objective lens intermediate lens และ projector lens

Objective lens จะอยู่ใต้ช้องใส่ตัวอย่าง (specimen chamber) ซึ่งอยู่ใต้คอนเดนเซอร์เลนส์ projector lens อยู่ส่วนล่างคอลัมน์ ลำแสงอิเลคตรอนจะฉายลงบนตัวอย่าง และผ่านตัวอย่างไปยัง objective lens จะได้ภาพขยาย เมื่อผ่าน intermediate lens ก็จะได้ภาพที่ขยายขึ้นอีก และสุดท้าย projector lens จะทำให้ภาพถูกขยาย และฉายไปปรากฏบนจอ หรือแผ่นรับภาพเรืองแสง (fluorescent screen) ทำให้ตาเรามองเห็นผ่านหน้าต่างมองภาพ (viewing window)

4. ระบบบันทึกภาพ หรือ ถ่ายภาพ (photographic system)

ประกอบด้วย ชัตเตอร์และมิเตอร์วัดแสงซึ่งอยู่ใต้ projector lens ชัตเตอร์จะทำหน้าที่ปิด หรือเปิดให้ลำแสงอิเลคตรอน ตกกระทบลงบนแผ่นรับภาพเรืองแสง ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนนี้ยังสามารถขยายให้ได้ภาพขนาดใหญ่ ได้อีก 7-10 เท่า

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย TEM

1. เทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันทั่วไป (conventional TEM techniques) ทำเป็นขั้นตอนดังนี้

1.1 การเก็บตัวอย่าง (specimen collection)

1.2 การคอง (fixation)

เก็บตัวอย่างในน้ำยาหรือสารเคมี (fixative) ที่นิยมใช้คือ อัลดีไฮด์ และออสเมียม ฟิกเซทีฟ ใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 การขจัดน้ำออก (dehydration)

โดยการใช้ เอธิลแอลกอฮอล์ ที่มีความเข้มข้น เริ่มต้นจากเจือจาง (30%) ไปจนถึงเข้มข้น (absolute) และแทนที่น้ำด้วยเรซิน

1.4 การฝังตัวอย่าง (embedding)

ในตัวกลาง (embedding media) นิยมใช้ epoxy polyester (Epon 812) เพราะสะดวกในการผสม มีความคงทนซึมเข้าสู่ตัวอย่างได้รวดเร็ว แล้วทำให้แข็ง (polymenze)

1.5 การตัด (ultra-thin sectioning)

ด้วยเครื่องอัลตราไมโครโตม หนาประมาณ 60-100 นาโนเมตร วางตัวอย่างบนแผ่นวางตัวอย่าง (grid) ซึ่งทำด้วยแผ่นทองแดงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3.05 ม.ม.

1.6 การย้อม (staining)

เพื่อเป็นการเพิ่มคอนทราส โดยย้อมในสารละลายของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว ยูเรเนี่ยม ทำให้ส่วนต่างๆ ของตัวอย่างมีลักณะทึบต่อลำแสงอิเลคตรอน

2. เทคนิคพิเศษเพื่อการศึกษาด้วย TEM

เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อการศึกษาเฉพาะด้าน ในที่นี้จะกล่าวเพียงหัวข้อเท่านั้น หากสนใจอาจหาความรู้เพิ่มเติมได้

2.1 Freeze-etching technique and replication technique

2.2 Autoradiography

2.3 EM immunochemistry

2.4 EM histochemistry

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

1. เปิดระบบไฟฟ้าของกล้อง แล้วเริ่มดำเนินการเปิดสวิทช์ของระบบสูญญากาศจนได้สูญญากาศที่ต้องการ

2. เปิดระบบไฟฟ้าแรงสูง (high voltage)

3. เปิดสวิทช์สำหรับ electron gun เพื่อทำให้มีลำแสงอิเลคตรอน

4.ปรับลำแสงอิเลคตรอนให้เป็นลำแสงตรงหรือเรียกว่า electron beam alignment โดยปรับ electron gun, condenser lens และ condenser aperture ให้อยู่ในแนวเดียวกัน กระบวนการนี้ทำตามขั้นตอนที่แนะนำไว้ในหนังสือคู่มือประจำเครื่อง

5. วางตัวอย่าง (grid) ใน specimen holder แล้วนำเข้าสู่ specimen chamber ตรวจสอบอย่างคร่าวๆ โดยใช้กำลังขยายต่ำ

6. ใช้ objective aperture ขนาดกลางเพื่อเพิ่มคอนทราส และศึกษาตัวอย่าง พร้อมทั้งปรับ aperture ให้ตรง และโฟกัส

7. เพิ่มกำลังขยายให้สูงเท่าที่จะเป็นไปได้ หรือให้สูงกว่าที่จำเป็นจะต้องถ่ายภาพ เช่น ต้องการจะศึกษาในกำลังขยายประมาณ 80,000 เท่า ก็ควรปรับกำลังขยายให้เป็น 100,000 เท่าก่อน เพื่อ :-

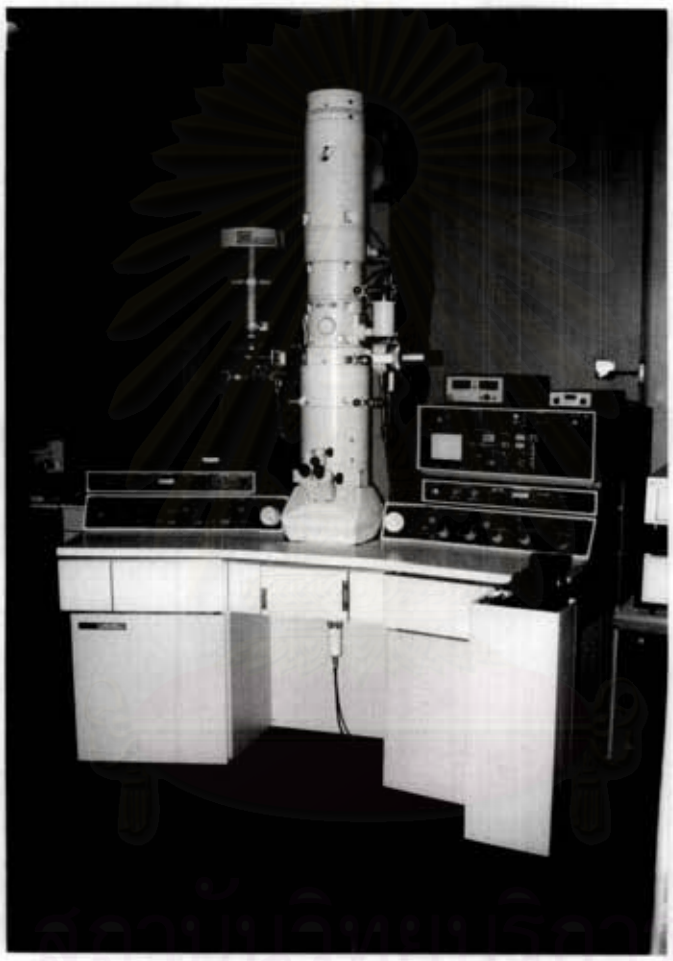
8. แก้ไขการบิดเบี้ยวของภาพ โดยใช้ stigmator และพยายามโฟกัส จนภาพไม่มีการเคลื่อนไหวไปในทิศทางใดทิศทางหนึ่ง จึงเป็นอันว่าใช้ได้ให้ลดกำลังขยายลงมาตามที่ต้องการเพื่อตรวจสอบ หรือศึกษาตัวอย่าง

9. หาบริเวณ หรือส่วนของตัวอย่างที่สนใจ และทำการโฟกัสเพื่อถ่ายภาพ

10. เมื่อโฟกัสอย่างละเอียดจนเป็นที่พอใจ (ดูผ่านหน้าต่างโดยใช้ binocular head ที่ติดมากับกล้อง) แล้วจึงทำการถ่ายภาพ

11. เมื่อต้องการศึกษาตัวอย่างต่อไปก็เริ่มขั้นตอนที่ 5

ภายหลังจากการเสร็จการใช้แล้ว ผู้ใช้จำเป็นต้องเก็บตัวอย่าง คืน objective aperture กลับสู่ที่เดิม ปิด electron beam และ high voltage และปิดเครื่อง หรือหากจะมีผู้ใช้เครื่องต่อไป ก็ปล่อยเครื่องทิ้งไว้ในสภาพที่เตรียมพร้อม คือ ขั้นตอนที่ 1-4 ดังข้างต้น



รูปที่ 156 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-200CX

กล้องจุลทรรศน์คาร์คฟิลด์ (Dark field microscopy)

กล้องชนิดนี้จะมีคอนเดนเซอร์พิเศษ ให้แสงเป็นลำกลวงโคนแสงนี้เมื่อโฟกัสไปบนวัตถุจะแยกออกเป็นมุมกว้างมากจนไม่มีแสงเข้าไปยังเลนส์วัตถุเลย เมื่อมุมของโคนแสงไปกระทบวัตถุแสงจะสะท้อนเข้าไปยังเลนส์วัตถุ ดังนั้นจะเห็นวัตถุสว่างท่ามกลางพื้นหลังมืด กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้มีประโยชน์ในการศึกษาเซลล์ที่มีชีวิต โดยการใช้กล้องนี้จะทำให้มองเห็นวัตถุซึ่งมีขนาดเล็กเกินกว่าที่จะเห็นด้วยอำนาจการแยกภาพของกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

เนกาทีฟ สเตนนิ่ง (Negative staining)

การย้อมสีแบบนี้เป็นการย้อมสีพื้นหลัง (background) สีจะไม่พอกหรือติดกับวัตถุที่ต้องการศึกษา เหมาะสำหรับการศึกษาที่ไม่ต้องการให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เช่น การศึกษาลักษณะรูปร่างโครงสร้างภายนอก การวัดขนาดของเซลล์ นอกจากนี้การย้อมสีแบบนี้จะให้ค่าอำนาจในการแยกภาพของวัตถุที่อยู่ใกล้กัน (resolving power) มีค่ามาก

ยูรานิล อะซิเตด (Uranyl acetate)

ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วงที่เป็นกรด ยูรานิล อะซิเตด จะไม่เข้าไปรวมตัวกับโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิค แต่ภายหลังที่มันแห้งแล้วจะทำหน้าที่เป็นพื้นฉากทึบแสงเนื่องจากลำแสงอิเลคตรอนไม่สามารถผ่านได้ ทำให้เห็นรายละเอียดของอนุภาคไวรัส นอกจากนี้ ยูรานิล อะซิเตด ก็จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างช่องว่าง (interstice) ของไมเลกุลที่อยู่ใกล้กัน ฉะนั้นเมื่อใช้กำลังขยายมากๆ ก็จะเห็นรายละเอียดขาดเล็กของอนุภาคไวรัสได้ดี อย่างไรก็ตามยูรานิล อะซิเตดจะเกิดการตกตะกอนเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าสูงกว่า 6.0

ฟอสโฟทังสติคแอซิด (Phosphotungstic acid)

ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วงที่เป็นกลาง ฟอสโฟทังสติคแอซิดจะไม่เข้าไปรวมตัวกับโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิค แต่ภายกลังเมื่อแห้งแล้วจะทำหน้าที่เป็นพื้นฉากทึบแสง ทำให้เห็นรายละเอียดของอนุภาคไวรัสได้ เนื่องจากฟอสโฟทังสติคไม่รวมตัวกับอนุภาคของน้ำมัน-ดังนั้นกริดที่ใช้เตรียมตัวอย่างควรนำไปจุ่มลงในอีเทอร์หรือคลอโรฟอร์มก่อนเพื่อขจัดอนุภาคน้ำมัน

ภาคผนวก ค.

อุปกรณ์อื่นๆ

1. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป

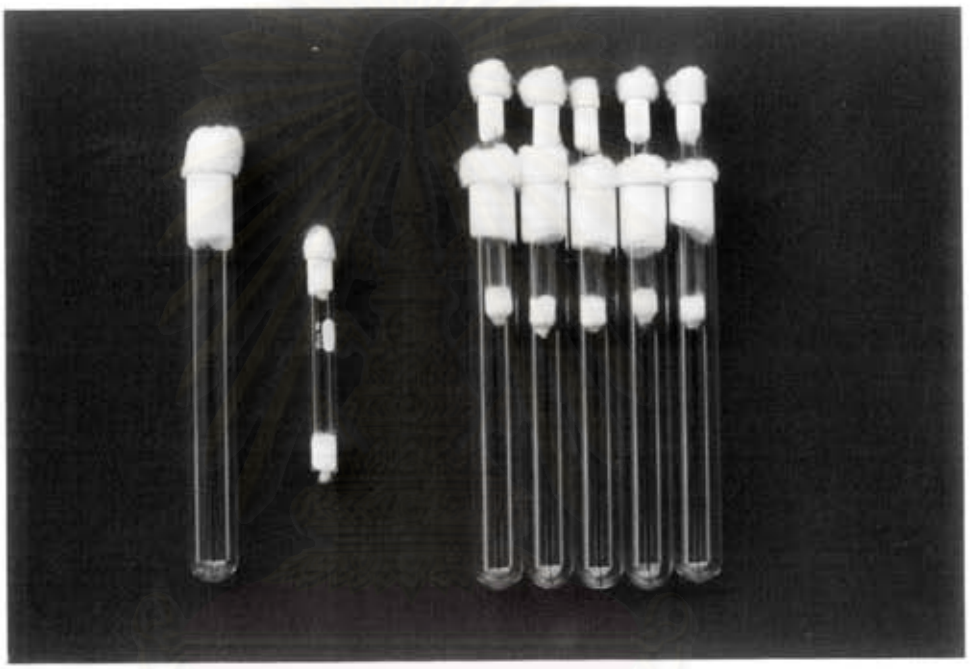
รูปที่ 157 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป ยี่ห้อ โอลิมปัส รุ่น SZH-10

2. กล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป

รูปที่ 158 กล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป ยี่ห้อ นิคอน รุ่น Lobopot + UFX-II

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ชุดกรองสปอร์ของ ***Actinomycetes*** (Hoopwood *et al.*, 1985)



รูปที่ 159 ชุดกรองสปอร์ของ *Actinomycetes*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

วิธีการเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป

1. เตรียมเชื้อที่ต้องการศึกษาโดยการเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อแบบ spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด แมนนิทอล มังบีน อการ์ บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 10-14 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่

2. เตรียมสไลด์ โดยใช้สไลด์ใหม่ (เนื่องจากสไลด์ใหม่มักจะมีไขมันฉาบอยู่จะทำให้ง่ายต่อการที่สปอร์และไมซีเลียมจะติดกับสไลด์)

3. นำสไลด์ใหม่ที่เตรียมไว้ มาผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์พอให้สไลด์อุ่น(ระวังอย่าให้สไลด์ร้อนเกินไปจะส่งผลต่อสปอร์และไมซีเลียมโดยทำให้เสียรูปตามสภาพธรรมชาติไป)

4. นำสไลด์ที่ผ่านเปลวไฟแล้ว (ใช้ด้านที่ถูกเปลวไฟ) วางลงบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการศึกษาซึ่งเจริญและสร้างสปอร์เต็มที่แล้ว ใช้ปากคีบกดบนสไลด์เบาๆ

5. จากนั้นก็ใช้ปากคีบ หยิบสไลด์ขึ้นมา

6.สไลด์ที่ได้จะเต็มไปด้วยสปอร์และไมซีเลียม โดยแต่ละบริเวณของสไลด์จะมีความหนาแน่นของสปอร์และไมซีเลียมไม่เท่ากัน เลือกบริเวณที่มีสปอร์และไมซีเลียมหนาแน่นที่สุด บริเวณปลายข้างใดข้างหนึ่งของสไลด์ ใช้บริเวณดังกล่าวเป็นที่ติดสติกเกอร์สำหรับเขียนบรรยาย (label) รายละเอียดโดยทั่วไปของสไลด์ โดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% เช็ดลงในบริเวณดังกล่าวให้มีพื้นที่ว่างพอสำหรับติดสติกเกอร์สำหรับ label

7. เก็บสไลด์ที่เตรียมได้ลงในกล่องเก็บสไลด์ โดยวางให้ส่วนที่ติดสปอร์และไมซีเลียมอยู่ด้านบนเวลาเก็บก็ให้ตั้งกล่องเก็บสไลด์ให้สไลด์ที่อยู่ภายในกล่องหันส่วนที่ติดสปอร์และไมซีเลียมอยู่ด้านบน

วิธีการศึกษาด้วยกล้อง

1. นำสไลด์ที่เก็บอยู่ในกล่องเก็บ มาวางบนแท่นรองรับตัวอย่างบนกล้องจุลทรรศน์

2. ใช้กำลังขยาย 10X ของ objective lens เพื่อดูแบบประมาณการ ว่าบริเวณใดในสไลด์มีการจัดเรียงตัวของสปอร์และไมซีเลียมดี

3. เปลี่ยนกำลังขยายของ objective lens เป็น 40X โฟกัสภาพให้ชัดเจนที่สุด

4. จากนั้นจึงถ่ายภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ควรใช้กำลังขยายในการถ่ายภาพ ที่ 40X เท่านั้น เนื่องจากการถ่ายภาพ ที่ 100X บริเวณที่เห็นจะแคบ ยากต่อการพิจารณารูปแบบการจัดเรียงตัวของสปอร์และไมซีเลียม และเนื่องจากสไลด์ที่เตรียมเป็นสไลด์สด การดูด้วยกำลังขยาย 100X ต้องใช้ oil emulsion ด้วยจะทำให้สไลด์ที่เตรียมเสียหาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ.

1. <u>การคำนวนปริมาณน้ำในดิน</u>

การคำนวนปริมาณน้ำในดินคำนวนได้จากสูตร

$$\frac{B - A}{C - A} \times 100 = \text{------- \% of water content}$$

โดย A = น้ำหนักของถ้วยฟอยล์

B = น้ำหนักของดินเปียก

C = น้ำหนักของดินแห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมสปอร์แขวนลอยเข้มข้น 10^7 เซลล์/มล.

- ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ (sterile technique) ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. จนกระทั่งน้ำกลั่นมีลักษณะขุ่น

- ใช้ปิเปตดูดสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มล. (เจือจาง 10^{-1}) จากนั้นก็เจือจางต่อระดับละสิบเท่าเป็น 10^{-2} , 10^{-3}

- นำสารละลายเจือจางระดับ 10^{-1} , 10^{-2} มานับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายประมาณ 100-150 เท่า

วิธีทำ

- ใช้ลูปแตะสปอร์แขวนลอยมาแตะที่ haemacytometer ปิด coverslip นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (10X objective) นับจำนวนสปอร์โดยนับในตารางสี่เหลี่ยมที่มุมทั้ง 4 และตรงกลางตารางตรงกลางอีก 1 ช่อง รวมเป็น 5 ช่อง

- เนื่องจากปริมาตรของ haemacytometer = กว้าง 1 มม. X ยาว 1 มม. X ลึก 1 มม.

$$= 1 \times 10^{4}$$

- haemacytometer ประกอบด้วยช่องเล็ก 25 ช่อง

ดังนั้น จำนวนที่นับได้ ใน 5 ช่อง X 5 X 10^4 = จำนวนเซลล์/ มล. ------ (M1)

จากนั้นคำนวนหาจำนวนสปอร์ใน 1 มล. โดยใช้สูตร

$$M1\ V1 = M2\ V2$$

โดย M1 = ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ยังไม่เจือจาง

V1 = ปริมาตรของสปอร์แขวนลอยที่ยังไม่เจือจาง

M2 = ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ต้องการ (10^7 เซลล์/มล.)

V2 = ปริมาตรของสปอร์แขวนลอยที่ต้องการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารเคมีและวิธีเตรียม

3.1 **วิธีเตรียมแอมโมเนียม อะซิเตด บัฟเฟอร์** (Ammonium acetate buffer) pH 7.0 เข้มข้น 0.1 โมล่าร์

Ammonium acetate ($C_2H_7NO_2$); MW 77.08 ; Assay 97 %

ต้องการ 1 M ชั่ง 77.08 กรัม

ต้องการ 0.1 M ชั่ง 7.708 กรัม/ลิตร

ต้องการ 100 มล. ชั่ง 0.7708 กรัม

Assay 97 %

ต้องการ 97 กรัม ชั่ง 100 กรัม

ต้องการ 0.7708 กรัม ชั่ง 0.7946 กรัม / 100 มล. = 0.1 M

ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 N NaOH

3.2 **วิธีเตรียมซูโครส** (Sucrose) เข้มข้น 0.2 %

Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ; MW 342.30

0.2 % ซูโครส (100 มล. ใช้ 0.2)

10 มล. ใช้ 0.02 กรัม = 20 มิลลิกรัม

1 มล. ใช้ 0.002 กรัม = 2 มิลลิกรัม

- ต้องการ 1 มิลลิลิตร = 20 มิลลิกรัม

100 ไมโครลิตร = 20 มิลลิกรัม

3000 ไมโครลิตร = 600 มิลลิกรัม = 0.6 กรัม

(ชั่งซูโครส 0.6 กรัม + น้ำ 3 มล.) ----- (M1)

- ต้องการเตรียม 2 % PTA + 0.2 % Sucrose

PTA 1 มล. ใช้ 100 ไมโครลิตรของ (M1)

ประวัติผู้เขียน

นายเตชินท์ ตรีวิโรจน์ เกิดวันที่ 9 กันยายน พ.ศ. 2512 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2537

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย