บทที่ 1

บทนำ

แบคเทอริโอฟาจ (Bacteriophages)

1. คำจำกัดความ

ไวรัส (virus) ของแบคทีเรีย (bacteria) เรียกว่า "แบคเทอริโอฟาจ" (bacteriophages) หรือ "ฟาจ" (phages) เป็นจุลชีพที่มีอนุภาคขนาดเล็กมาก มีกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) เพียงชนิดเดียวโดยอาจเป็นดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) อย่างใดอย่างหนึ่ง ภายในอนุภาคของฟาจไม่มีไรโบโซม (ribosome) ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) หรือองค์ประกอบย่อยของเซลล์ (organelles) อื่นๆ ดังนั้นฟาจจำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบภายในโฮสท์เซลล์ (host cell) ที่ฟาจเข้าไปเจริญสำหรับสร้างสิ่งต่างๆ ที่ฟาจต้องการขึ้นมา เช่น การสร้างโปรตีน การเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิค เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ฟาจจึงจัดอยู่ในพวกพาราสิตภายในเซลล์ (obligate intracellular parasites) ชนิดหนึ่ง (Andrewes, 1967; Lewin,1977; Luria *et al.*, 1978; Primrose and Dimmock, 1980)

2. ประวัติและการค้นพบ

ประมาณ 20 ปีหลังการค้นพบไวรัสพืช (plant virus) และไวรัสสัตว์ (animal virus) ไวรัสที่เข้าไปเจริญภายในเซลล์หรือก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในเซลล์ (infecting) ของแบคทีเรียก็ถูกค้นพบโดย F.W. Twort (1915) และ d'He'relle (1917) โดยขณะที่ Twort กำลังศึกษา การส่งถ่ายสารพันธุกรรมด้วยวิธีทรานฟอร์เมชั่น (transformation) ในโคโลนี (colony) ของไมโครคอคไค (*Micrococci sp.*) ที่ถูกไวรัสเข้าไปเจริญภายในเซลล์อยู่นั้น d'He'relle ก็กำลังศึกษาการแตกของเซลล์ในเชื้อชิกเกลล่า (*Shigella sp.*) อยู่เช่นกัน ต่อมา d'He'relle ได้ตั้งชื่อเรียกไวรัสที่เข้าไปเจริญภายในเซลล์ของแบคทีเรียว่า "แบคเทอริโอฟาจ" (bacteriophages) ซึ่งแปลว่า "ผู้กินแบคทีเรีย" (bacteria eater)

3. โครงสร้างและส่วนประกอบพื้นฐาน

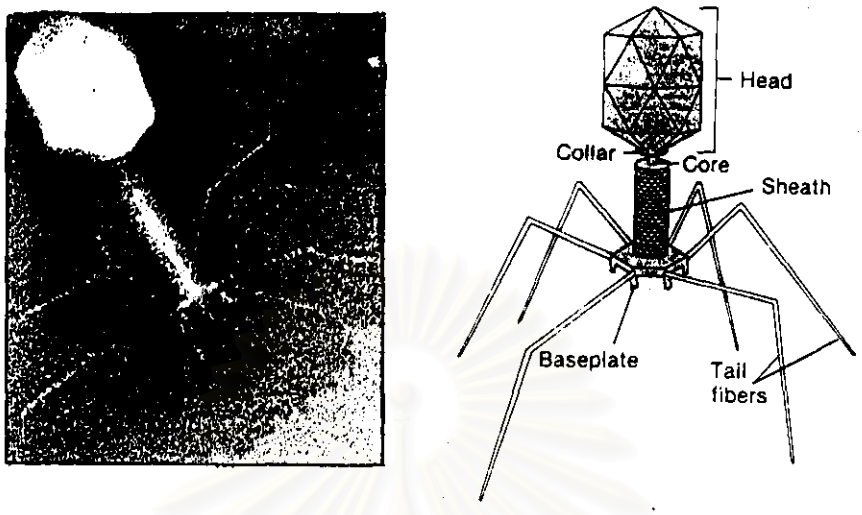
โครงสร้างทั่วไปของฟาจประกอบด้วยส่วนหัว (head) ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรม และส่วนหาง (tail) ซึ่งมีหน้าที่ในการยึดเกาะกับโฮสท์เซลล์และส่งถ่ายสารพันธุกรรมของฟาจไปสู่โฮสท์ นอกจากนั้นฟาจยังประกอบด้วยส่วนปลอกคอ (collar) ส่วนแกนกลาง (core) ส่วนปลอกหุ้ม (sheath) ส่วนแผ่นฐาน (baseplate) และส่วนขา (tail fibers) ซึ่งจะมีลักษณะต่างกันไปในฟาจแต่ละสายพันธุ์ (รูปที่ 1)

อนุภาคที่ครบสมบูรณ์ของฟาจ (virion) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิคที่ถูกหุ้มด้วยโปรตีนที่เรียกว่า แคพสิด (capsid) ส่วนแคพสิดและกรดนิวคลีอิคที่ถูกหุ้มไว้รวม เรียกว่า นิวคลีโอแคพสิด (nucleocapsid) ฟาจบางชนิดมีส่วนประกอบเพิ่มขึ้นมานอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วคือ ฟาจบางกลุ่มมีส่วนประกอบลักษณะเป็นแผ่นบางคล้ายเปลือกหุ้ม มาหุ้มแคพสิดอีกทีเรียกว่า เอนเวลโลป (envelope) (รูปที่ 2) นอกจากนั้นฟาจบางชนิดมีเอนไซม์ (enzyme) อยู่ภายในแคพสิดด้วย โมเลกุลย่อยๆ ของโปรตีนที่มาประกอบกันเป็นแคพสิด เรียกว่า แคพโซเมอร์ (capsomers) การจัดเรียงตัวหรือประกอบกันของแคพโซเมอร์เป็นแคพสิด ที่ทำให้มีลักษณะรูปร่างต่างๆ ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของกรดนิวคลีอิคด้วย จากการจัดเรียงตัวของแคพโซเมอร์ ทำให้ฟาจมีรูปร่างลักษณะดังนี้ คือ (Casper, 1965; Norris and Richmond, 1978; Alcamo *et al.*, 1983; Boyd *et al.*, 1984)

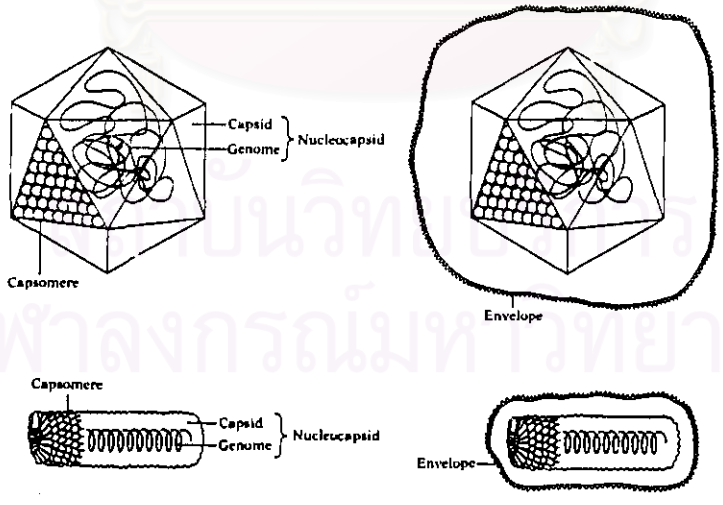
3.1 รูปร่างแบบเหลี่ยมลูกบาศก์ (cubical structure)

การจัดเรียงตัวของแคพสิดโปรตีนแบบเหลี่ยมลูกบาศก์(icosahedral symmetry) จะมีรูปร่างโครงสร้างและขนาดขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะของแคพโซเมอร์ที่มารวมกันซึ่งขนาดและลักษณะของแคพโซเมอร์นั้นขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะของโปรโตเมอร์ (protomer) โดยโปรโตเมอร์จะรวมกลุ่มกันกลุ่มละห้าหรือหกอันประกอบเป็นแคพโซเมอร์ เมื่อมีหลายๆ แคพโซเมอร์รวมกันเป็นแคพสิด เนื่องจากลักษณะและขนาดของโปรโตเมอร์ขึ้นอยู่กับลักษณะและขนาดของสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) ซึ่งถูกควบคุมและสังเคราะห์จากยีน (gene) ของฟาจ ดังนั้นลักษณะและขนาดของแคพสิดจึงถูกกำหนดโดยยีนของฟาจ

แคพสิดรูปร่างแบบเหลี่ยมลูกบาศก์มีอยู่ 12 ยอดหรือมุม (corner) แต่ละมุมจะเป็นแคพโซเมอร์ซึ่งประกอบด้วยโปรโตเมอร์ที่ประกอบกันขึ้นมีลักษณะเป็นหน้าสามเหลี่ยม (triangular face) ที่เหมือนกัน 5 หน้า ในแคพสิดหนึ่งอันจะมีสามเหลี่ยมอยู่ 20 หน้า



รูปที่ 1 โครงสร้างโดยทั่วไปของแบคเทอริโอฟาจ (Boyd et al., 1984)



รูปที่ 2 ส่วนประกอบโดยทั่วไปของแบคเทอริโอฟาจ (Alcamo et al., 1983)

ในสามเหลี่ยมหน้าหนึ่งๆ จะมีแคพโซเมอร์จำนวนเท่ากัน ถ้าหากโปรโตเมอร์มารวมกันเป็นกลุ่ม กลุ่มละหกอัน เรียกว่า เฮกซอน (hexon) ถ้าหากรวมกันเป็นกลุ่มๆ ละห้าอัน เรียกว่า เพนตอน (penton)ในฟาจแต่ละชนิดจำนวนเฮกซอนและเพนตอนในแคพสิดจะมีจำนวนไม่เท่ากัน (รูปที่ 3)

3.2 รูปร่างแบบทรงกระบอก (cylindrical structure)

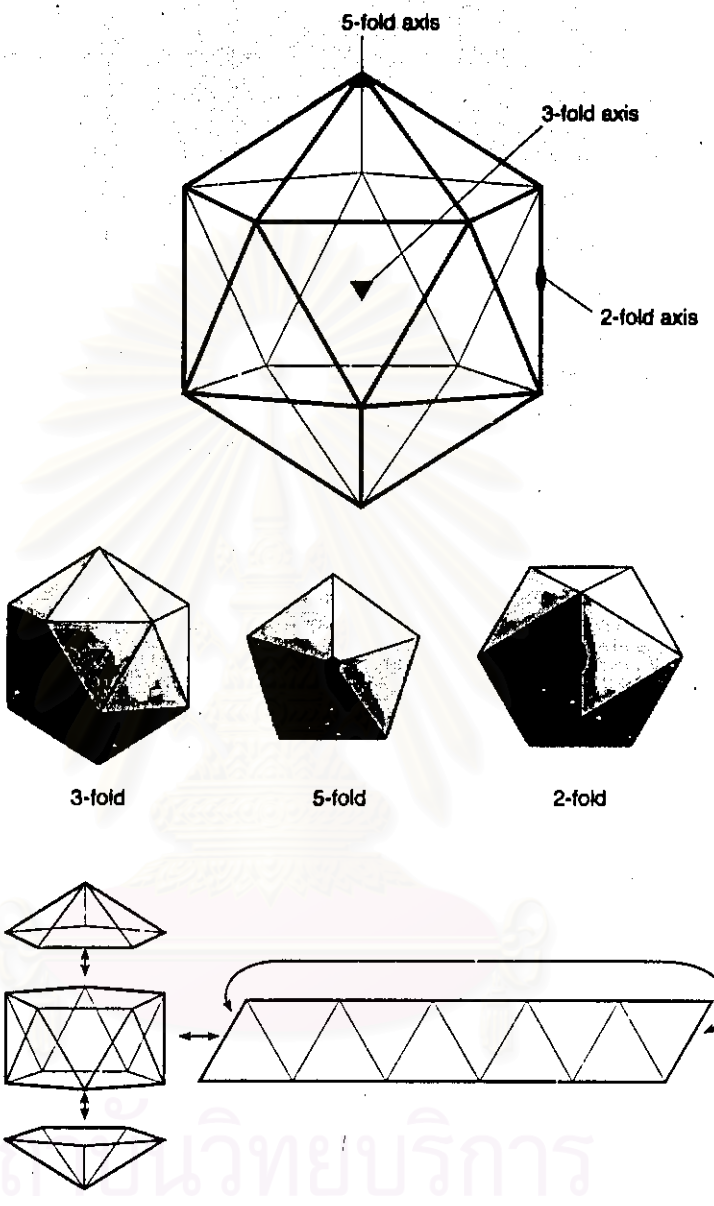
การจัดเรียงตัวของแคพสิดโปรตีนแบบทรงกระบอก (helical symmetry) นี้โปรโตเมอร์จะจัดเรียงตัวเป็นเกลียวหมุนทางเดียว (single rotational axes) คล้ายๆ เกลียวสว่านแบบเดียวกับที่เราหมุนแกนรูปทรงกระบอก โปรโตเมอร์แต่ละอันที่เรียงตัวในลักษณะเป็นเกลียวจะไม่เรียงตัวเหมือนกันทีเดียว แต่ละโปรโตเมอร์จะติดเชื่อมต่อกันกับโปรโตเมอร์ที่อยู่ข้างๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของทรงกระบอกหรือแคพสิดก็ขึ้นอยู่กับลักษณะและขนาดของโปรโตเมอร์ ส่วนความยาวของรูปทรงกระบอกขึ้นอยู่กับความยาวของกรดนิวคลีอิค

3.2 รูปร่างแบบเชิงซ้อน (complex structure)

การจัดเรียงตัวของแคพสิดโปรตีนแบบนี้ จะมีรูปร่างผสมกันทั้งสองรูปแบบที่กล่าวมาแล้ว คือมีทั้งแบบ ก. ปนกับแบบ ข. เช่นที่พบในฟาจพวก ทีแฟมิลี (T family)ที่มีรูปร่างแบบไบเนอร์ ซิมมิทรี (biner symmetry) เป็นต้น

ฟาจบางชนิดมีแผ่นบางๆ หุ้มรอบแคพสิดโปรตีนอีกชั้นหนึ่ง เรียก เอนเวลโลป (Mindich and Bamford, 1988) ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนรวมอยู่กับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นสารที่เรียกว่า กลัยโคโปรตีน (glycoprotein) บางทีอาจพบลิปิด (lipids) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยปกติโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) จะจับกับลิปิดเป็นชั้นหุ้มอยู่บางๆ ดังนั้นน้ำย่อยที่ย่อยโปรตีนจึงไม่สามารถที่จะผ่านเข้าไปทำอันตรายโปรตีนที่อยู่ข้างในซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเอนเวลโลปที่มีส่วนประกอบเป็นลิปิดได้ ยกเว้นใช้น้ำยาที่ละลายลิปิด เช่น อีเธอร์ (ether) หรือ คลอโรฟอร์ม (chloroform) พบว่าการที่ฟาจมีเอนเวลโลปทำให้เกิดความแตกต่างของแอนติเจน (antigen) ที่อยู่บนผิวของเอนเวลโลป ซึ่งมีความสำคัญในการชักนำให้โฮสท์เกิดการเปลี่ยนแปลง (host-induce modification) โดยฟาจบางชนิดอาจจะได้แอนติเจนจากเมมเบรนของโฮสท์ นอกจากนั้นเอนเวลโลปยังมีส่วนช่วยในการงอกหลุดออกมา (budding) ของแคพสิดจากเซลล์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 การจัดเรียงตัวของแคพสิดโปรตีนแบบเหลี่ยมถูกบาศก์ (Primrose and Dimmock, 1980)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนประกอบที่พบได้ในอนุภาคฟาจ นอกจาก กรดนิวคลีอิค แคพสิดโปรตีน และเอนเวลโลป ดังที่กล่าวแล้ว ในอนุภาคฟาจบางชนิดพบสารประกอบประเภทโปรตีนทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่พบเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการจำลองตัวเองของกรดนิวคลีอิคของฟาจซึ่งจะแตกต่างกันไปในฟาจแต่ละชนิด การที่ฟาจบางชนิดต้องมีเอนไซม์ด้วยเพราะว่า ในโฮสท์เซลล์ไม่มีเอนไซม์เหล่านี้ เนื่องจากกรดนิวคลีอิคของฟาจบางชนิดมีลักษณะพิเศษ ขบวนการจำลองตัวเองจึงแตกต่างไปจากโฮสท์จำเป็นต้องมีเอนไซม์พิเศษทำหน้าที่กระตุ้นการเริ่มต้นขบวนการจำลองตัวของกรดนิวคลีอิค (Fraenkel-Conrat, 1969)

4. การจัดจำแนกกลุ่มและการกำหนดชื่อ

รูปแบบการจัดจำแนกฟาจถูกพัฒนาขึ้นโดย Bradley (1967) และได้รับการปรับปรุงให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นโดย Ackermann and Eisenstark (1974) ซึ่งเป็นพื้นฐานการจัดจำแนกฟาจโดยอาศัยรูปร่างและคุณสมบัติของกรดนิวคลีอิค คณะกรรมการแห่งชาติของการจัดจำแนกหมวดหมู่ไวรัส (ICTV = The International Committee on Taxonomy of Viruses) ได้สรุปถึงหลักเกณฑ์สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกฟาจ ซึ่งได้ผลการจัดจำแนกแบ่งออกเป็น 12 วงศ์ (families) กับอีก 16 ตระกูล (genera) รวมทั้งอีกหลายร้อยชนิด (species) (Francki *et al.*, 1991) ปัญหาที่เกิดขึ้นในการจัดจำแนกดังกล่าวคือ ประการแรก ไม่สามารถตกลงกันในระดับการจัดจำแนกชนิดได้ ประการที่สอง ฟาจที่มีรูปร่างต่างกันอาจมีสารพันธุกรรมอย่างเดียวกัน ซึ่งรูปร่างที่แตกต่างกันนั้นอาจเกิดขึ้นจากลักษณะของถูกผสม

Baltimore (1971) ได้จัดจำแนกไวรัสโดยพิจารณาจากสารพันธุกรรม เช่น ขบวนการจำลองตัวเองของกรดนิวคลีอิคของไวรัส และ ขบวนการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ดัง(ตารางที่ 1) ออกเป็น 6 กลุ่ม ไวรัสในกลุ่มแรก มีสารพันธุกรรมเป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA, dsDNA) พบว่าขบวนการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอจากดีเอ็นเอสายคู่เกิดขึ้นได้จากทั้งสองสาย ซึ่งพบได้ในฟาจที่มีสารพันธุกรรมเป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ทุกชนิด

สารพันธุกรรมในไวรัสกลุ่มที่สองเป็นสารพันธุกรรมแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA, ssDNA) ซึ่งต้องเปลี่ยนไปเป็นดีเอ็นเอสายคู่ก่อนที่จะมีการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ ฟาจเพียงชนิดเดียวที่มีสารพันธุกรรมแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เข้าคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอ ตัวอย่างคือ ฟาจที่มีสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบโพสิทีพ ((+) single-stranded DNA, (+) ssDNA) ตัวอย่างฟาจที่มีสารพันธุกรรมชนิดนี้ได้แก่ ฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาวที่เรียกว่า ฟิลาเมนตัสฟาจ (filamentous phages)

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกไวรัสโดยอาศัยความแตกต่างของขบวนการถ่ายรหัสเป็นเกณฑ์ (Baltimore, 1971)

Class	Characteristics
I.	Viruses have a double-stranded DNA genome. In this class the designation of (+) and (-) is not meaningful, since differrent mRNA species may be synthesized from either strand.
IIa.	Viruses have a single-stranded DNA genome of the same sequence as mRNA.
IIb.	Viruses have DNA complementary to mRNA. Before the synthesis of mRNA. can proceed, the DNA must be converted to a double-stranded form.
III.	Viruses have a double-stranded RNA genome. All known viruses of this type have segmented genome, but mRNA is synthesized on only one strand of each segment.
IV.	Viruses have a single-stranded RNA genome of the same sequence as mRNA. Synthesis of a complementary strand proceedes synthesis of mRNA.
V.	Viruses have a single-stranded RNA genome which is complementary in base sequence to the mRNA.
VI.	Viruses have a single-stranded RNA genome and have a DNA intermediate during replication.

ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอสายคู่ (double stranded RNA, dsRNA)จัดอยู่ในกลุ่มที่สาม ฟาจเพียงชนิดเดียวที่รู้จักกันในกลุ่มนี้คือ ฟาจ $\phi 6$ สารพันธุกรรมของฟาจชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นท่อน ๆ เอ็มอาร์เอ็นเอจะสร้างจากอาร์เอ็นเอสายคู่เพียงสายเดียวในแต่ละท่อนโดยอาศัยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส อาร์เอ็นเอ โพลีเมอเรส (endonuclease RNA polymerase) ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวโพสิทีพ ((+) single stranded RNA, (+)ssRNA) จัดอยู่ในกลุ่มที่สี่ โดยฟาจในกลุ่มนี้จะมีลำดับเบสในสายเหมือนกับเอ็มอาร์เอ็นเอ และถูกจำลองโดยอาศัยเอนไซม์เรพพลิเคส (replicase) ของฟาจ ไวรัสในกลุ่มที่ห้า มีสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเนกาทีพ ((-)single stranded RNA, (-)ssRNA) มีลำดับเบสในสายเข้าคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอ ซึ่งยังไม่พบในฟาจสายพันธุ์ใดเลย ไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่มที่หก มีสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA, ssRNA) แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนผ่านดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediate)

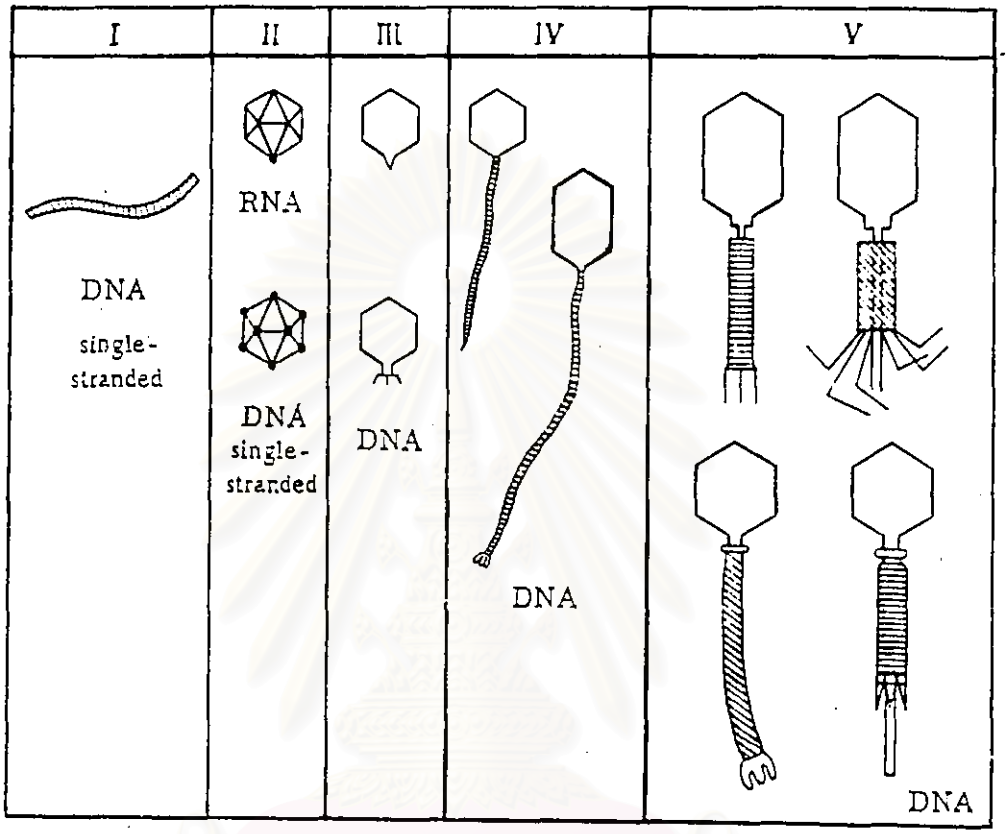
ความสัมพันธ์ของฟาจกับเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริพเตส ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนเอ็มอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ในขบวนการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ เมื่อไม่นานมานี้ตำแหน่งของยีนที่กำหนดการสังเคราะห์ เอนไซม์รีเวอร์ส ทรานสคริพเตส ได้ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต และพบอยู่หนึ่งตำแหน่งบนสารพันธุกรรมของฟาจที่อยู่ใน *E. coli.* (Inouye *et al.*, 1991 ; Inouye and Inouye, 1991) อย่างไรก็ตาม หน้าที่และรายละเอียดในขบวนการจำลองตัวเองของฟาจยังต้องรอการอธิบายโดยละเอียดต่อไป โดยปกติฟาจที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายกันมักจะอยู่ในโฮสท์ชนิดเดียวกัน ลักษณะของวงจรชีวิต สารพันธุกรรม และขบวนการต่างๆ จะมีลักษณะที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด Campbell and Botstein (1983) ได้รายงานเกี่ยวกับความสามารถในการเปลี่ยนข้อมูลทางพันธุกรรม ที่เกิดขึ้นระหว่างขบวนการรวมสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน (homologous recombination) ของฟาจ ดังนั้นการจัดจำแนกฟาจในระดับวงศ์ที่เกิดขึ้นนั้นฟาจที่มีโครงสร้างต่างกันอาจกลับกลายมาเหมือนกันได้ (Doskocil *et al.*, 1988)

หลักเกณฑ์ประการหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปในการจัดจำแนกฟาจ คือการจัดจำแนกฟาจตามรูปร่างลักษณะ (morphology) (Tikhonenko, 1970) การพัฒนาของกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ก่อให้เกิดความเป็นไปได้ในการจัดจำแนกฟาจโดยอาศัยคุณสมบัติในด้านรูปร่างลักษณะ (Ackermann, 1987) Bradley and Kay (1960) ได้ศึกษารูปร่างลักษณะและคุณสมบัติทางโครงสร้างของฟาจที่แตกต่างกัน 22 ชนิด จากการศึกษาสามารถแบ่งฟาจออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามลักษณะรูปร่างดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ฟาจที่มีส่วนหางสั้น กลุ่มที่ 2 ได้แก่ฟาจที่ส่วนหางไม่สามารถหดได้ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ฟาจที่ส่วนหางหดได้ ต่อมา Almeida (1963) เสนอ

เกณฑ์การจัดจำแนกเพิ่มเติมโดยเพิ่มความสัมพันธ์เกี่ยวกับชนิดการสมมาตรของฟาจว่ามีลักษณะเป็นเหลี่ยมถูกบาศก์ เป็นทรงกระบอก หรือเป็นแบบผสม และชนิดของกรดนิวคลีอิคที่เป็นองค์ประกอบของฟาจนั้น Bradley (1965) ได้จัดแบ่งกลุ่มของฟาจใหม่เป็น 6 กลุ่มตามรูปร่างลักษณะดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ฟาจที่ส่วนหางประกอบด้วยปลอกที่หดได้ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ฟาจที่มีส่วนหางยาวแต่หดไม่ได้ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ฟาจที่มีส่วนหางสั้น กลุ่มที่ 4 ได้แก่ฟาจที่ไม่มีส่วนหางมีขนาดแคพโซเมอร์ใหญ่ กลุ่มที่ 5 ได้แก่ฟาจที่ไม่มีส่วนหางมีขนาดแคพโซเมอร์เล็ก กลุ่มที่ 6 ได้แก่ฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาว อย่างไรก็ตามต่อมา Bradley (1967)ได้ทำการปรับปรุงการจัดจำแนกฟาจตามรูปร่างลักษณะใหม่เป็น 5 กลุ่มใหญ่ (รูปที่ 4) โดยลดการจัดจำแนกตามความแตกต่างในเรื่องขนาดแคพโซเมอร์ออก เนื่องจากพิจารณาความแตกต่างได้ยาก ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาว กลุ่มที่ 2 ได้แก่ฟาจที่ไม่มีส่วนหาง กลุ่มที่ 3 ได้แก่ฟาจที่มีส่วนหางขนาดสั้น กลุ่มที่ 4 ได้แก่ฟาจที่มีส่วนหางขนาดยาวและไม่สามารถหดได้ กลุ่มที่ 5 ได้แก่ฟาจที่ส่วนหางมีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบเชิงซ้อนมีปลอกที่หดได้

การกำหนดชื่อที่ใช้เรียกฟาจนั้น Takahashi (1916) เสนอให้กำหนดชื่อเรียกเฉพาะขึ้นเช่นเดียวกับฟาจของบาซิลัส ซับติลิส (*Bacillus subtilis*) อย่างไรก็ตามชื่อดังกล่าวที่ตั้งขึ้นไม่เป็นสากลไม่สามารถใช้กับฟาจโดยทั่วไปได้ Holmers (1948) เสนอระบบการเรียกชื่อแบบไบโนเมียล ซิสเต็ม (binomial system) ของลินเนียส (Linnaeus) ในการเรียกชื่อฟาจ ซึ่งระบบดังกล่าวจะกำหนดชื่อฟาจเป็นสองส่วนตามชื่อจีนัส (genus) และ สปีชีส์ (species) อย่างไรก็ตามเกณฑ์ที่ใช้เรียกชื่อฟาจตามระบบดังกล่าวยังไม่ถูกพัฒนาขึ้นใช้

Yamamoto and Anderson (1961) เสนอว่าชื่อที่เหมาะสมที่สุดของฟาจควรมีพื้นฐานที่สัมพันธ์โดยเฉพาะกับสปีชีส์ของจุลินทรีย์ ที่ฟาจเข้าไปเจริญภายในเซลล์ โดยปกติความแตกต่างในการจัดจำแนกเกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มของผู้วิจัยอย่างไรก็ตามส่วนหนึ่งของความไม่จำเพาะเกิดจากฟาจบางชนิดสามารถที่จะเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้หลายชนิดเช่นเดียวกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถถูกฟาจเข้าไปเจริญภายในเซลล์ได้หลายชนิด ฟาจแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไป ฟาจบางชนิดมีความสามารถในการทำกิจกรรมต่อสปีชีส์ต่างๆของจุลินทรีย์จีนัสเดียวกันต่างกันไป



รูปที่ 4 การจัดจำแนกแบคเทอริโอฟาจตามรูปร่างลักษณะภายนอก (Bradley, 1967)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การเจริญเพิ่มจำนวน

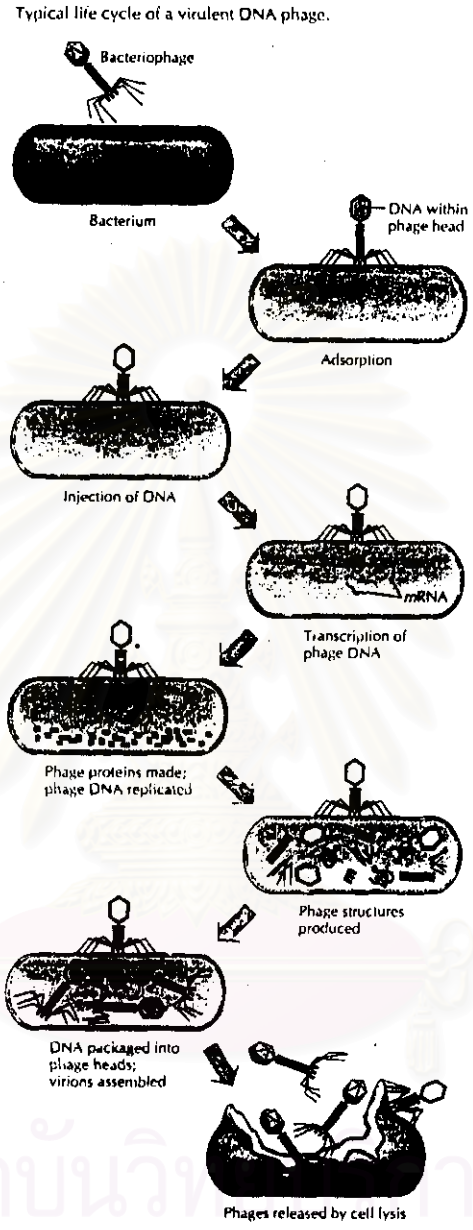
การเจริญเพิ่มจำนวนของฟาจแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ การเจริญเพิ่มจำนวนของฟาจที่ก่อให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์ เรียกไลติค ไซเคิล (lytic cycle) เรียกฟาจที่มีวงจรชีวิตดังกล่าวว่า ไวรูเลนท์ฟาจ (virulent phages) อีกแบบเป็นการเจริญเพิ่มจำนวนของฟาจที่ไม่ก่อให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์(lysogeny)เรียกฟาจที่มีวงจรชีวิตดังกล่าวว่า เทมเปอร์เรทฟาจ (temperate phages) อย่างไรก็ตามเทมเปอร์เรทฟาจอาจมีวงชีวิตแบบไลติคได้ถ้าถูกกระตุ้นด้วยสารบางชนิด เช่น รังสี หรือ สารปฏิชีวนะ เป็นต้น

5.1 ไวรูเลนท์ฟาจ (virulent phages)

ฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้จะก่อให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์ในขั้นตอนสุดท้ายของขบวนการเพิ่มจำนวน โดยขบวนการเพิ่มจำนวนจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆที่สำคัญดังนี้ (รูปที่ 5)

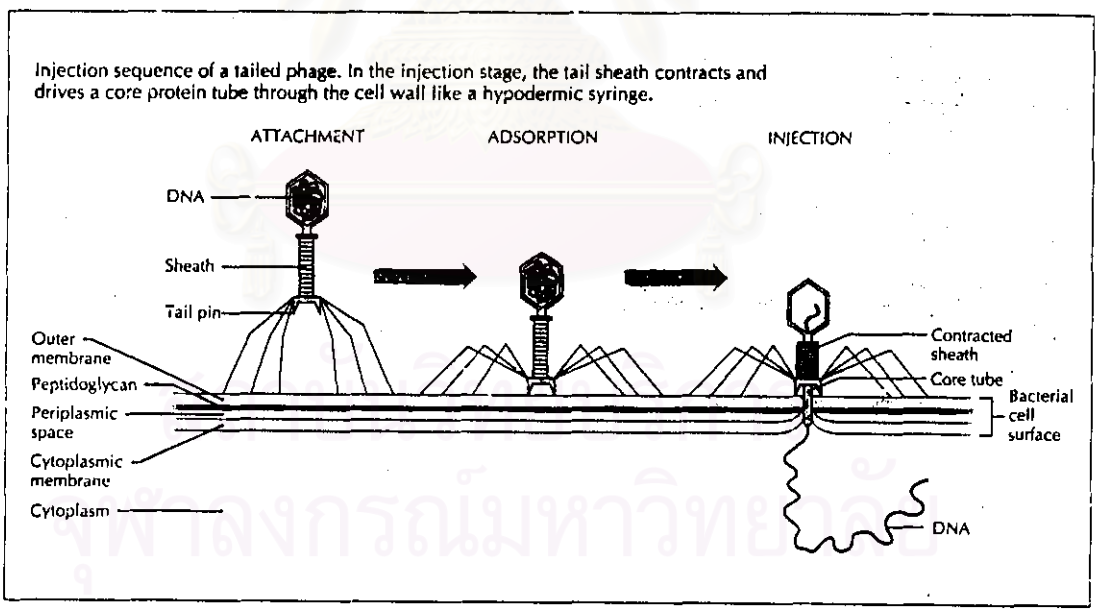
5.1.1 การจับอย่างจำเพาะและการส่งผ่านกรดนิวคลีอิคของฟาจ

การเชื่อมต่อของตัวรับสัญญาณของโฮสท์เซลล์กับโครงสร้างที่เข้าคู่กันของฟาจ ซึ่งโดยปกติจะเป็นส่วนหางในฟาจขนาดใหญ่ที่มีดีเอ็นเอสายคู่แสดงให้เห็นถึงการเชื่อมต่อแบบจำเพาะมาก ขบวนการย้อนกลับจะไม่เกิดขึ้นในขบวนการจับกันของฟาจกับโฮสท์เซลล์ ในสภาพธรรมชาติความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มของอนุมูลอิออน และอิออนประจุบวกบางชนิดนั้นมีผลต่อขบวนการจับกันของฟาจกับโฮสท์เซลล์ หลังการเกาะ กรดนิวคลีอิคของฟาจจะถูกเคลื่อนย้ายผ่านแกนกลางไปยังไซโตพลาสซึมของโฮสท์เซลล์ ในฟาจที่มีหางแบบหดได้ การเชื่อมต่อจะเกิดตรงฐานของเพลต ทริกเกอร์(plate triggers) ที่เชื่อมต่อกับปลอกหาง (sheath) และการส่งถ่ายจะเกิดบริเวณส่วนกลางของหางที่เป็นท่อ (core) (รูปที่ 6ก., 6ข.) โฮสท์เซลล์จะนำดีเอ็นเอของฟาจเข้าไปโดยอาศัยปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีบริเวณ ไซโตพลาสมิค เมมเบรน (cytoplasmic membrane) ฟาจบางชนิดจะมีโปรตีนมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอและนำกรดนิวคลีอิคเหล่านั้นเข้าสู่เซลล์ ในคอลิฟาจทีไฟว์ (coliphages T5) พบว่าจะมีเพียง 8% ของดีเอ็นเอสายคู่เส้นตรง (linear dsDNA) เท่านั้นที่สามารถถ่ายเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้



รูปที่ 5 วงจรชีวิตแบบไลติค (lytic cycle) ของแบคเทอริโอฟาจ (Pelczar et al., 1993)

รูปที่ 6 ก. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของฟาจ (Simon and Anderson, 1967)



รูปที่ 6 ข. ขั้นตอนการจับกันอย่างจำเพาะและการส่งถ่ายสารพันธุกรรมจากฟาจไปสู่โฮสท์เซลล์

(Pelczar et al., 1993)

นอกจากสารพันธุกรรมที่ต้องการสามารถผ่านเข้าไปได้แล้วสารพันธุกรรมที่ส่งถ่ายเข้าไปต้องสามารถที่จะทำงานได้ด้วย ขั้นตอนแรกของการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์เป็นขั้นตอนที่มีความเข้าใจกันน้อยและมีการศึกษาในฟาจไม่กี่ชนิดเท่านั้น แบคเทอริโอฟาจบางชนิดประกอบด้วยปลอกไขมัน (sheath) หุ้มอยู่ซึ่งอาจจะใช้ลักษณะดังกล่าวในการผ่านเข้าไปในโฮสท์เซลล์ได้ การผ่านเข้าไปในโฮสท์เซลล์ด้วยวิธีนี้ส่วนใหญ่พบในไวรัสของสัตว์โดยเรียกว่าขบวนการเมมเบรนฟิวชั่น (membrane fusion) อย่างไรก็ตามสามารถพบได้ในฟาจบางชนิด เช่นที่พบใน ฟาจ ϕ6 กับแบคทีเรียซูโดโมเนส ไซริงอี (*Pseudomonas syringae*) ที่เป็นโฮสท์ (Bamford *et al.*,1987 ; Mindich and Bamford, 1988)

สารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอของฟาจสามารถเข้าสู่โฮสท์เซลล์ได้ด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น ระหว่างขบวนการคอนจูเกชั่น (conjugation) ซึ่งไม่เพียงแต่พลาสมิดและโครโมโซมเท่านั้นที่ถูกส่งถ่ายไปแต่พบว่าดีเอ็นเอของฟาจก็สามารถถูกส่งถ่ายไปยังเซลล์นั้นๆ ได้ด้วย โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ที่มีความสามารถสูงในการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ ขบวนการส่งถ่ายสารพันธุกรรมของฟาจโดยขบวนการทรานเฟคชั่น (transfection) มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการส่งถ่ายสารพันธุกรรมขนาดใหญ่

5.1.2 การเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจ

ฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาวมีดีเอ็นเอสายเดี่ยว (filamentous ssDNA phages) จะเพิ่มจำนวนโดยเกาะติดเยื่อหุ้มโฮสท์เซลล์ และปล่อยดีเอ็นเอเข้าเซลล์อย่างต่อเนื่อง โดยประสิทธิภาพของขบวนการเมตาบอลิซึมของโฮสท์จะไม่เกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจชนิดนี้ ส่วนในฟาจชนิดอื่นพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างเมตาบอลิซึมของโฮสท์กับขบวนการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ของฟาจ โดยฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่ขนาดใหญ่จะมีสารพันธุกรรมที่มีรหัสคล้ายกับของโฮสท์เซลล์ (phages-encoded analogs) ทำหน้าที่กำหนดให้โฮสท์เซลล์สร้างเอนไซม์และโปรตีนที่ฟาจต้องการขึ้นมาทำให้เกิดการย่อยสลายสารพันธุกรรมของโฮสท์โดยเอนไซม์ซึ่งสังเคราะห์จากฟาจ นอกจากนั้นยังทำให้เกิดการยับยั้งขบวนการทรานสคริพชั่น และ ทรานสเลชั่น ของโฮสท์

การเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจ มีบ่อยครั้งที่ถูกขัดขวางโดยฟาจชนิดเดียวกันหรือบางครั้งเกิดจากฟาจต่างชนิดกัน ซึ่งขบวนการดังกล่าวเรียกว่า มูชัว เอกซ์คลูชั่น (mutual exclusion) ขบวนการนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการรับสัญญาณของฟาจ ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการส่งผ่านดีเอ็นเอของฟาจบริเวณ เพอริพลาสมิค สเปรช

(periplasmic space) บนโฮสท์เซลล์ ขบวนการดังกล่าวต่างจากขบวนการซุปเปอร์อินเฟคชั่น อิมมูนนิตี้ (superinfection immunity) ในไลโซจีนิค เซลล์ (lysogenic cell) (Bishai and Murphy, 1988)

5.1.3 ขบวนการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมของฟาจ

ดีเอ็นเอสายคู่ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงอยู่ในส่วนหัวของฟาจ การที่สารพันธุกรรมเกิดการสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างปลาย 5' กับเทอร์มินอลโปรตีน (terminal protein) แสดงให้ทราบว่าขบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอกำลังเกิดขึ้น ต่อมาดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นสายของฟาจจะเริ่มจำลองตัวเองจากบริเวณส่วนปลาย การจำลองตัวของฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่ จะเริ่มจากตำแหน่งที่จำเพาะภายในโมเลกุลที่เป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการจำลองตัวเอง (Keppel *et al*,. 1988 ; Wickner, 1992)

จากจุดเริ่มต้นขบวนการจำลองตัวจะเกิดขึ้นในแต่ละสายในแบบหนึ่งทิศทาง (unidirectional replication) หรือแบบสองทิศทาง (bidirectional replication) โดยหนึ่งรอบของการจำลองตัวจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อจุดแยกตัวของดีเอ็นเอสายคู่ที่เรียกว่า เรบพลิเคชั่นฟอร์ค (replication forks) เคลื่อนที่มาถึงจุดสิ้นสุดของดีเอ็นเอสายคู่ หรือเมื่อ ฟอร์ค (forks) พบกันเองในดีเอ็นเอสายคู่แบบวงแหวน (circular dsDNA) พบว่าฟาจหลายชนิดที่มีดีเอ็นเอแบบสายตรงจะเปลี่ยนเป็นแบบวงแหวนภายหลังการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจ โดยการเชื่อมกันระหว่างปลายทั้งสองข้างหรือเกิดจากการจับคู่กันของสายเดี่ยวบริเวณโคฮีซีพเอ็น (cohesive end) ขบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอแบบวงแหวนจะมีตัวควบคุมชนิดของขบวนการจำลองตัวว่าจะเป็นแบบใดในสองแบบคือ ถ้าตัวควบคุมเป็นชนิดทีต้า(θ) การจำลองตัวเองจะเป็นแบบสองทิศทาง แต่ถ้าตัวควบคุมเป็นชนิดซิกม่า (σ) การจำลองตัวเองจะเป็นแบบ รอลลิงเซอร์เคิล (rolling circle replication) (Watson *et al*., 1987) ขบวนการจำลองตัวเองที่ตัวควบคุมเป็นชนิดทีต้า การจำลองตัวจะเริ่มขึ้นจากการแยกตัวของดีเอ็นเอสายคู่แบบวงแหวนบริเวณตำแหน่งที่จำเพาะที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง โดยทิศของการจำลองตัวเองจะมีทิศจากปลาย 5' ไป 3' ในแต่ละสาย การจำลองตัวเองในลักษณะนี้พบได้ในฟาจ Mu และ ฟาจของ *Pseudomonas sp.* บางชนิด ขบวนการจำลองตัวที่ตัวควบคุมเป็นชนิดซิกม่า การจำลองตัวเองจะเริ่มขึ้นจากการตัดที่จุดจำเพาะในสายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเอสายคู่แบบวงแหวน โดยปลาย 3' จะทำหน้าที่ในการจับกับไพร์เมอร์ (primer) ส่วนปลาย 5' เป็นแม่พิมพ์สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่

การจำลองตัวเองแบบนี้มักประกอบด้วยสารพันธุกรรมหลายหน่วยย่อยเชื่อมต่อกันโดยต่อไปในทิศทางเดียวกัน (Symond *et al*,. 1987 ; Harshey, 1988 ; Pato, 1989)

ขบวนการจำลองตัวเองของฟาจหลายชนิดที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีลักษณะเป็น 2 ขั้นตอน (Baas and Jansz,1988) โดยขั้นตอนแรกดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวงแหวน (circular (+)ssDNA) จะเปลี่ยนตัวเองเป็นดีเอ็นเอสายคู่แบบวงแหวน (circular dsDNA)จากนั้นจะทำการเพิ่มจำนวนด้วยขบวนการจำลองตัวแบบรอลลิง เซอร์เคิล โดยสายเนกาทีพ จะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในขบวนการสังเคราะห์สายโพสิทีพ ส่วนอาร์เอ็นเอฟาจขบวนการจำลองตัวเองจะเริ่มจากการสังเคราะห์เอนไซม์อาร์เอ็นเอ เรบพลิเคส (RNA replicase) ที่จะใช้ในขบวนการจำลองตัวเอง เนื่องจากเซลลูลาร์ เอนไซม์ (cellular enzyme) ของโฮสท์จะใช้ไม่ได้ในการสร้างสายใหม่จากสายเดิมที่ใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ ในฟาจที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ เช่น ฟาจ ϕ6 พบว่าสารพันธุกรรมของฟาจและ เอนไซม์เรบพลิเคส จะมีความสัมพันธ์กันและถูกส่งถ่ายไปด้วยกัน (Mindich and Bamford,1988) ฟาจที่มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบโพสิทีพ พบว่า ยีนจะแปลรหัสเพื่อสร้างเอนไซม์เรบพลิเคสเป็นลำดับแรก ก่อนที่ขบวนการจำลองตัวเองของฟาจจะเริ่มขึ้น โดยส่วนหนึ่งของสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบโพสิทีพ จะทำหน้าที่สังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ และอีกส่วนจะเก็บอยู่ในวิริออน (Fiers, 1979 ; Van Duin, 1988)

5.1.4 การแสดงออกทางพันธุกรรมของฟาจ

การแสดงออกทางพันธุกรรมในโปรคาริโอตถูกควบคุมในระดับการถ่ายรหัส (transcription level) ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก ฟาจหลายชนิดมีการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาศัยยีนอื่นๆเป็นองค์ประกอบที่ทำหน้าเช่นเดียวกันกับโอเปอรอน (operon) ฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่ขนาดใหญ่นั้น ส่วนใหญ่ลักษณะที่แสดงออกจะถูกควบคุมด้วยยีนสองกลุ่ม ซึ่งเกิดขึ้นในระยะแรกก่อนการจำลองตัวของดีเอ็นเอและระยะสุดท้ายของขบวนการจำลองตัว ในระยะแรกของขบวนการจำลองตัวเองพบว่ามียีนเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ทำงานได้ ซึ่งปกติอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ (promotor) จะทำงานได้โดยอาศัยเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอร์เรส (RNA polymerase) ของโฮสท์ ผลิตภัณฑ์ที่ยีนสร้างขึ้นในช่วงแรกมักจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเริ่มขบวนการจำลองตัวเองของฟาจ การควบคุมการถ่ายรหัสในขั้นตอนสุดท้ายขึ้นกับ

สภาวะเมตาบอลิซึมของโฮสท์เซลล์ ซึ่งพบได้ใน เทมเปอเรท ฟาจ (temperate phages) ทุกชนิด การที่ฟาจจะมีวงจรชีวิตเป็นไลโซจีนิค หรือ ไลติค ยีนส่วนท้ายๆ จะเป็นตัวกำหนดรูปแบบของวงจรชีวิตและการแตกของโฮสท์เซลล์

ขบวนการจำลองตัวเองของฟาจดีเอ็นเออาศัยเอนไซม์ที่ได้จากการสังเคราะห์ของโฮสท์ภายใต้การควบคุมโดยยีนของฟาจ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่ขนาดใหญ่ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลิเมอร์เรส ของโฮสท์ก็ควบคุมโดยหนึ่งหรือหลายๆ รหัสของฟาจบริเวณซิกม่า เฟคเตอร์ (sigma-factor) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเอนไซม์จะเกิดตรงบริเวณที่ฟาจโปรโมเตอร์จำได้ (regconize site) ซึ่งจะแตกต่างกันกับลำดับของโปรโมเตอร์ของโฮสท์ การควบคุมอื่นๆ เช่น การควบคุมการไม่แสดงออกซึ่งทำได้โดยการยับยั้งการทำงานของขบวนการถ่ายรหัสของโฮสท์ด้วยฟาจเอ็นโคดริเพรสเซอร์ (phages-encoded repressor) (Ptashne, 1992; Friedman, 1988)

เช่นเดียวกับการควบคุมการถ่ายรหัส การแปลรหัสก็มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนของฟาจ ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการแปลรหัสคือ ลำดับเบส Shine-Dalgarno ที่เป็นลำดับเบสของรหัสเริ่มต้นในการรวมกัน ของไรโบโซม (ribosome) กับเอ็มอาร์เอ็นเอ และโครงสร้างในขั้นที่สองของเอ็มอาร์เอ็นเอ

5.1.5 การเกิดรูปร่างและขบวนการบรรจุดีเอ็นเอในส่วนหัวของฟาจ

ฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่มักจะถูกใช้เป็นรูปแบบสำหรับศึกษาการรวมกันเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนจากหน่วยย่อยของสารประกอบโมเลกุลใหญ่ (Casjens and Hendrix, 1988) การที่จะเข้าใจในขบวนการรวมกันเป็นโครงสร้างของรีคอมบีเนนท์ดีเอ็นเอ (recombenant DNA) ในห้องปฏิบัติการยังต้องอาศัยการศึกษาอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปขบวนการเกิดรูปร่างของฟาจชนิดดีเอ็นเอสายคู่ที่มีส่วนหาง (tailed dsDNA phages) รหัสควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนของโฮสท์อาจจะแสดงความสำคัญในขบวนการเกิดรูปร่างของฟาจ แต่อย่างไรก็ตามไม่ได้เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทั้งหมดที่มีอยู่ของฟาจ เช่น จำนวนหน่วยโปรตีนประมาณ 100 หน่วยของฟาจจะถูกควบคุม โดยยีนของโฮสท์จำนวน 6 หน่วยในฟาจ ϕ29 และมากกว่า 40 หน่วยในฟาจ T4 ขบวนการเกิดรูปร่างของแคพสิดเริ่มขึ้นจากการเชื่อมต่อกันของส่วนหัวและส่วนหาง หรือเกิดจากขึ้นการเชื่อมต่อกันของแคพสิดโปรตีนหลัก(major capsid protein) รอบๆ โครงของโปรตีน ในขั้นตอนต่อมาโครงโปรตีนจะเคลื่อนที่ออกจากแคพสิดโปรตีนทำให้แคพสิดโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในลักษณะที่เหมาะสม ขั้นตอนนี้จะเป็นการตรวจวัดขนาดและความสมมาตรของรูปแบบไอโคซาฮีดรัลเฮด (icosahedral head) ในส่วนหัวที่ว่างเปล่าเมื่อถูกเติม

ด้วยดีเอ็นเอจะทำให้ความเสถียรของแคพสิดมีค่าเพิ่มขึ้นมาก เรียกว่า เดคอเรชั่นโปรตีน (decoration protein)

บางครั้งดีเอ็นเอจะถูกบรรจุอยู่ภายในส่วนหัวของฟาจที่เพิ่งสร้างเสร็จ ในรูปแบบที่แน่นมาก (ประมาณ 20 - 50 เท่าเมื่อเทียบกับสภาพของดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์) พลังงานจะได้มาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ของ ATP ซึ่งนำไปใช้ในการเปิดช่องทางให้ดีเอ็นเอผ่านเข้าไปภายในส่วนแคพสิด (Bazinet and King, 1985 ; Black, 1988; 1989) ดีเอ็นเอที่จำลองขึ้นจากสายตรงหรือจากวงแหวนที่มีความยาวเท่ากับ 1 อีโนมจะถูกบรรจุในส่วนหัวของฟาจได้โดยตรง ส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากขบวนการจำลองตัวเองแบบรอลลิง เซอร์เคิลซึ่งมีลักษณะเป็นสายยาว จำเป็นต้องตัดให้เป็นท่อนๆ ซึ่งทำได้สองวิธีคือ วิธีแรกจะตัดที่จุดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอซึ่งจะมีอยู่เพียงหนึ่งจุดบนความยาวของอีโนมให้มีลักษณะเป็นโคฮีซีพ เอ็น เช่น COS ในแลมด้าฟาจ วิธีที่สองจะตัดครั้งแรกตรง pac-site ในฟาจ P1 หรือที่ตำแหน่งที่ตรวจไม่พบ (undetermine site) ใน ฟาจ T4 ดีเอ็นเอจะถูกบรรจุในส่วนหัวของฟาจจนกระทั่งเต็ม การตัดครั้งที่สองจะเกิดขึ้น เรียกว่า เฮดฟูล เมคานิคซั่ม (headful machanism) ส่วนหัวของฟาจสามารถที่จะเติมดีเอ็นเอให้เต็มได้จากดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นสายยาว 1 สาย ซึ่งพบว่า การบรรจุดีเอ็นเอแบบนี้จะทำให้ฟาจมีอีโนมที่มากกว่าเดิม (112 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวของอีโนมสำหรับ ฟาจ P1 และ 102 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ ฟาจ T4) การบรรจุสารพันธุกรรมจะเป็นเครื่องหมายแสดงถึงความสมบูรณ์ของฟาจ ส่วนระยางค์ของฟาจ (ส่วนหาง ส่วนแผ่นฐาน ส่วนขา ส่วนปลอกหุ้ม) จะมีรูปแบบแตกต่างกันไป ซึ่งตอนแรกจะแยกกันกับส่วนหัวต่อมาก็จะเชื่อมกันกับส่วนหัว การเชื่อมต่อกันของท่อในส่วนหางและส่วนปลอกหุ้มที่หดได้ หรือส่วนปลอกหุ้มที่หดไม่ได้ จะเริ่มขึ้นในส่วนแผ่นฐาน (Hendrix, 1988) โดยทั่วไปส่วนแผ่นฐานจะมีสมมาตรเป็น 6 เหลี่ยม ซึ่งใช้เป็นตำแหน่งสำหรับจับกับส่วนขา ฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่ เช่นแลมด้าฟาจ จะมีส่วนแผ่นฐานที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) หนึ่งสาย ส่วนฟาจ ϕ29 ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 12 สาย สำหรับส่วนขาปกติจะประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 1 สาย หรือน้อยกว่า ส่วนแผ่นฐานและส่วนขาของฟาจจะมีความจำเพาะกับผิวของโฮสท์เซลล์ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ที่อยู่บนผิวของโฮสท์เซลล์

5.1.6 การปล่อย (release) ฟาจที่สร้างขึ้นใหม่

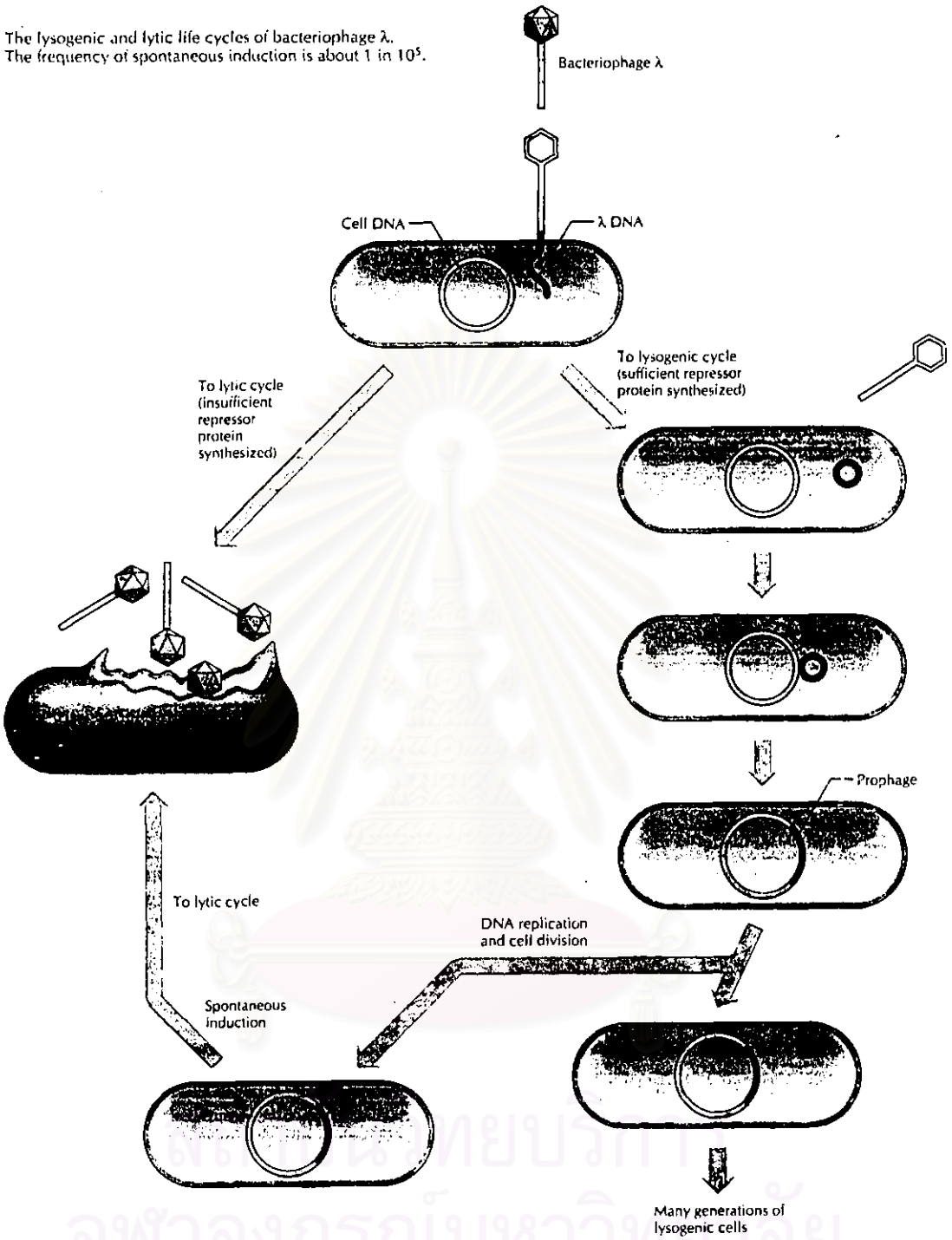
ในกรณีของฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาว ฟาจที่สร้างขึ้นใหม่จะรวมกันกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสท์ก่อนที่จะถูกปล่อยออกมา การเกิดรูปร่างของฟาจเกิดขึ้นภายในโฮสท์เซลล์ ฟาจที่สร้างเสร็จสมบูรณ์จะถูกปล่อยออกมาด้วยการทำให้โฮสท์เซลล์แตก ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นจากยีนของฟาจ (Young, 1992) หรือระบบทำลายตัวเองของโฮสท์ที่ทำให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์ (Dabora and Cooney, 1990)

5.2 เทมเปอร์เรทฟาจ (temperate phages)

พวกไวรูเลนท์ฟาจเมื่อเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ ก็พร้อมที่จะสร้างฟาจขึ้นใหม่และก่อให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์ ส่วนในเทมเปอร์เรทฟาจที่มีดีเอ็นเอสายคู่นั้น หลังการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์จะสามารถดำเนินวิถีวงจรชีวิตไปได้สองแบบคือ แบบแรกจะสร้างฟาจใหม่และในที่สุดก็จะทำให้โฮสท์เซลล์แตก ส่วนอีกแบบ หน้าที่ในการเพิ่มจำนวนของฟาจจะถูกยับยั้งไว้โดย รีเพรสเซอร์ โปรตีน(repressor protein) ซึ่งทำให้โฮสท์สามารถมีชีวิตอยู่ได้หลังฟาจเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ (รูปที่ 7)

ฟาจที่อีโนมเข้าไปรวมกับโครโมโซมของโฮสท์ เรียกว่า โปรฟาจ (prophage) ซึ่งการทำงานของยีนที่ควบคุมรหัสการทำให้โฮสท์เซลล์แตกจะถูกยับยั้ง ฟาจประเภทนี้สามารถที่จะดำรงอยู่ในไลโซจีนิคเซลล์ ซึ่งคือ โฮสท์เซลล์ที่ถูกโปรฟาจเข้าไปเจริญภายในเซลล์ได้นานหลายรุ่น โปรฟาจสามารถที่จะเข้าสู่วิถีวงจรชีวิตที่ทำให้โฮสท์เซลล์แตก ได้โดยเกิดขึ้นเองหรือเกิดจากการชักนำ เช่น การกระตุ้นด้วยสารเคมีที่มีผลในการทำลายดีเอ็นเอ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต (UV-light) รังสีเอกซ์ (X-ray) ไมโตมัยซินซี (mitomycin C) เป็นต้น

โปรฟาจสามารถย้ายไปอยู่ในโฮสท์เซลล์ใหม่ได้ โดยอาศัยขบวนการคอนจูเกชั่น ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดขบวนการดังกล่าวได้ในเซลล์ที่มีการส่งถ่าย สารพันธุกรรมด้วยขบวนการคอนจูเกชั่น ถ้าในโฮสท์เซลล์ใหม่มีโมเลกุลที่ทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่นำรหัสการทำให้โฮสท์เซลล์แตกพบว่าสารพันธุกรรมของฟาจจะเกิดการเข้าไปรวมกับโครโมโซมของโฮสท์ และเกิดขบวนการจำลองตัวเองไปพร้อมกัน การรวมกันในลักษณะนี้โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นระหว่างตำแหน่ง specific attP ของฟาจยีโนมและในตำแหน่ง attB site บนโครโมโซมของโฮสท์ ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของฟาจกับโฮสท์เซลล์



รูปที่ 7 วงจรชีวิตแบบเทมเปอร์เรท (temperate cycle) ของแบคเทอริโอฟาจ

(Pelczar et al., 1993)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในฟาจบางชนิด เช่น ฟาจ P1 ขบวนการจำลองตัวเอง เกิดขึ้นโดยขบวนการจำลองตัวแบบอัตโนมัติ โดยทั่วไปแล้วการแสดงออกของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกบนโอเปอเรเตอร์ (operator site) จะทำให้เกิดการยับยั้งขบวนการถ่ายรหัส ซึ่งเป็นหน้าที่ปกติของฟาจ (Ptashne, 1992) ที่รีเพรสเซอร์ โปรตีน ของซูเปอร์อินเฟคติง ฟาจ (superinfecting phages) จะทำหน้าที่บนโอเปอเรเตอร์ที่เหมือนหรือคล้ายกันกับฟาจตัวอื่นที่จะเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ ด้วยลักษณะที่คล้ายกันของโอเปอเรเตอร์ ทำให้เกิดการยับยั้งการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจตัวอื่น ดังนั้นสภาพไลโซเจนจะเป็นภูมิคุ้มกัน (homoimmunity) การเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจจากฟาจตัวอื่น

นอกจากลักษณะของฟาจที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีฟาจบางชนิดซึ่งสามารถเข้าไปเจริญภายในเซลล์ไลโซเจนได้ ด้วยเหตุนี้เองทำให้เซลล์สามารถที่จะรองรับโปรฟาจหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน แบคทีเรียบางชนิดอาจจะมีลักษณะภายนอกชนิดใหม่เกิดขึ้นโดยได้รับอิทธิพลของยีนที่ได้รับมาจากฟาจ เช่น ฟาจ SPβ ของ *Bacillus subtilis.* ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างบีตาซิน (betacin) ได้ และในกรณีฟาจของ *Corynebacterium diphtheriae.* ที่ทำให้ *C. diphtheriae.*สังเคราะห์สารพิษดิพเทอร์เรีย (diphtheria toxin)ได้ (Bishai and Murphy,1988)

โปรฟาจเป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาปรากฏการณ์ผ่าเหล่า ซึ่งอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปของรูปร่าง หรือเกิดการไม่ทำงานตามหน้าที่อย่างสมบูรณ์ การผิดปกติของโฮสท์เซลล์เนื่องจากโปรฟาจจะมีผลต่อลักษณะภายนอกที่แสดงออก เช่น ในกรณีที่เกิดมีการรวมกันของสารพันธุกรรมก็จะส่งเสริมวิวัฒนาการของฟาจ ส่วนในกรณีของซูโดไลโซจีนิคแบคทีเรีย (pseudolysogenic bacteria) สามารถเป็นโฮสท์ของฟาจได้หลายรุ่น โดยปราศจากการแตกของเซลล์ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าสภาวะพาหะ (carrier state) ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและสภาวะที่ไม่มีการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ สามารถทำให้ซูโดไลโซจีนิคแบคทีเรียปราศจากฟาจได้โดยการใช้แอนติฟาจ ซีรั่ม (antiphage serum) (Campbell, 1988)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์และความเสถียรของฟาจ

ปกติการศึกษาฟาจจะกระทำภายใต้สภาวะที่เหมาะสม มิฉะนั้นแล้วการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจจะมีค่าลดลงในอัตราหนึ่งเปอร์เซ็นต์ต่อวัน หรือมากกว่านี้ อย่างไรก็ตามไม่สามารถบอกได้ว่าความเสถียรของฟาจขึ้นอยู่กับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมชนิดใดเนื่องจากมีปัจจัยอยู่หลายชนิดและปัจจัยแต่ละชนิดมีผลกระทบต่างกันไปในฟาจแต่ละชนิด ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ มากขึ้นในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของฟาจ การทำให้ฟาจบริสุทธิ์

และการเก็บรักษาฟาจ ฟาจที่บริสุทธิ์จะมีความเสถียรที่สภาวะเป็นกลางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจากน้ำกลั่นที่ประกอบด้วย 0.1 โมล่าร์โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) 0.001 โมล่าร์แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride, $MgCl_2$) และถ้าฟาจมีความเข้มข้นต่ำอาจเติมเจลลาติน (gelatin) ปริมาณเล็กน้อยลงไปด้วย ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำความเสถียรของฟาจจะดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อฟาจอยู่ในสภาพที่สภาวะอื่นๆ ไม่เหมาะสม (Adams, 1959) สารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อความเสถียรของฟาจ สามารถใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของฟาจได้ ทั้งนี้ผลการทดลองที่ได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ความบริสุทธิ์ของฟาจ และปริมาณของฟาจที่ใช้ในการทดลอง (Burnet, 1933b)

6.1 ปัจจัยด้านเคมี

6.1.1 ความเป็นกรด-ด่าง

ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH)ต่อความเสถียรของฟาจได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น คอลิฟาจ T2 (coliphages T2) (Sharp *et al.*, 1946) คอลิฟาจ T6 (Putnam *et al.*, 1949) และคอลิฟาจ T7 (Kerby *et al.*, 1949) ฟาจปกติจะอยู่ในสภาพที่เสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ช่วง 5 - 8 แต่ที่อุณหภูมิต่ำช่วงดังกล่าวจะขยายออกไปโดยมีค่าอยู่ในช่วง 4 - 9 หรือ 10 ในฟาจ T2 สามารถตกตะกอนที่ pH 4 โดยปราศจาก การสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ (Herriott and Barlow, 1952)

6.1.2 ยูเรีย (urea) และ ยูรีเทน (urethan)

ทั้งยูเรีย และ ยูรีเทน นอกจากทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยาแล้ว ยังทำให้ฟาจสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ด้วย Burnet (1933a) ได้จัดจำแนกคอลิฟาจ โดยใช้คุณสมบัติของความไวในการทำให้ฟาจสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ต่อสารละลายยูเรียและจัดจำแนกตามความแตกต่างด้านลักษณะโดยทั่วไปด้วย ผลการศึกษาการแปรปริมาณความเข้มข้นของยูเรียพบว่ามีความแตกต่างเกิดขึ้นอย่างมากในอัตราที่ก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ ยูเรียนอกจากทำให้ฟาจสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์แล้ว ยังสามารถใช้สกัดกรดนิวคลีอิคจากฟาจ T2 ได้ด้วย (Cohen, 1947)

Foster *et al.* (1949) ศึกษาผลของยูรีเทนต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของคอลิฟาจ T5 ว่ามีความสัมพันธ์กับสภาวะอุณหภูมิสูงหรือไม่ การทดลองพบว่าอัตราการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิโดยการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ยูรีเทนในความเข้มข้นที่มีค่ามากกว่า 0.05 โมล่าร์

6.1.3 ดีเทอร์เจน (detergen)

เนื่องจากว่าสบู่หรือดีเทอร์เจนบางชนิดมีผลในการทำลายแบคทีเรีย ดังนั้นสารในกลุ่มนี้จึงถูกใช้ทดสอบผลในการทำลายไวรัสด้วย ไวรัสหนองฝี (vaccinia virus) และไวรัสไข้หวัดใหญ่(influenza virus) จะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วในขณะที่ ไวรัสโปลิโอ (poliomyelitis virus) จะมีความต้านทานต่อดีเทอร์เจน Stock and Francis (1940) รายงานการศึกษาผลของสบู่ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่จะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็ว เมื่อทดสอบด้วยสบู่ที่ทำจากกรดโอเลอิค (olaic acid) กรดลิโนเลอิค (linolaic acid)และกรดลิโนเลนิค (linolanic acid) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 โดยที่ความสามารถของการเป็นแอนติเจนมิได้ลดลง

Burnet and Lush (1940) ทดลองใช้ โดเดซิล โซเดียม ซัลเฟต (dodecyl sodium sulfate) โซเดียม ดีออกซีโซเลต (sodium deoxycholate) และ เซปโปนิน (saponin) กับไวรัสของสัตว์ (animal virus) ฟาจ C16 ฟาจ D6 ฟาจ D44 ซัลโมเนลล่าฟาจ (salmonella phages) สองชนิด และ สแตฟฟิโลคอคคัสฟาจ (staphylococcus phages) ผลการทดสอบพบว่า ฟาจทุกชนิดมีความต้านทานต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ต่อดีเทอร์เจนทั้งสามชนิด ในขณะที่ไวรัสของสัตว์เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วเมื่อถูกทดสอบด้วยดีเทอร์เจนทั้งสามชนิด Klein *et al.* (1945) ทดสอบผลของแคตไอออนิค (cationic) และ แอนไอออนิค (anionic) ดีเทอร์เจน ต่อ ไวรัสหนองฝี ฟาจ T2 ชิเกลล่าฟาจ (shigella phages) และ สแตฟฟิโลคอคคัสฟาจ จากผลการทดลองพบว่าฟาจ T2 มีความต้านทานต่อดีเทอร์เจนทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ ส่วนไวรัสชนิดอื่นพบว่า มีความไวต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ ต่อดีเทอร์เจนบางชนิด

แบคทีเรียมีคุณสมบัติที่ไวต่อดีเทอร์เจนมากกว่าฟาจจึงสามารถใช้ดีเทอร์เจนในการแยกฟาจจากแบคทีเรียได้ (Kalter *et al.*, 1946) ดีเทอร์เจนทำให้โปรตีนและเซลล์เมมเบรนเสียสภาพธรรมชาติคุณสมบัติของดีเทอร์เจนรวบรวมไว้ในการประชุมสัมมนาของ Anson (1946)

ฟาจ T6 จะเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ เมื่อทดสอบด้วย เบนซิล โดเดซิล ไดเมทธิล แอมโมเนียม คลอไรด์ (benzyl dodecyl dimethyl ammonium chloride) และผลที่เกิดขึ้นจะมีความรุนแรงลดลงเมื่อทดสอบด้วย อะเซตทิล ไตรเมทธิล แอมโมเนียม โบรไมด์ (acetyl trimethyl ammonium bromide) และ โดเดซิล โซเดียม ซัลเฟต (dodecyl sodium sulfate) (Putman *et al*., 1949) Putnum *et al*. (1952) รายงานว่าฟาจ T7 จะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วเมื่อทดสอบด้วยแคตไอออนิคดีเทอร์เจน ที่ชื่อ โดเดซิล ไตรเมทธิล แอมโมเนียม คลอไรด์ (dodecyl trimethyl ammonium chloride) Mayers and Spizizen (1954) ใช้ โดเดซิล โซเดียม ซัลเฟต ในการแยกกรดนิวคลีอิคของฟาจ T2

6.1.4 คีเลทิงเอเจนท์ (chelating agents)

คีเลทิงเอเจนท์ เป็นสารเคมีที่ไม่รวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับอิออนของโลหะ (metal ions) Lark and Adams (1953) พบว่า ซิเตรท (citrate) , เอทธิลีน ไดเอมีน เตตระอะซิเตด (ethylene diamine tetraacetate) และ เอทธิลีน ไดเอมีน ไตรฟอสเฟต (ethlene diamine triphosphate) นั้นทำให้ฟาจ T5 สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วที่ค่าความเข้มข้นของเกลือต่ำ ซึ่งสารดังกล่าวอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปมีลักษณะเป็นสารประกอบเชิงซ้อน หรือประจุบวกของสารดังกล่าวเกิดการจับกันกับอนุภาคของฟาจ ฟาจ T5 ที่มีลักษณะเป็นเฮทเทอโรจีเนียส (heterogeneous) เมื่อนำไปทดสอบความไวต่อสารคีเลทิงเอเจนท์ พบว่ากราฟแสดงอัตราการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ต่อเวลา มีลักษณะของการเพิ่มไม่เป็นเอกซ์โปเนนเชียล (exponential) (Adams, 1959)

6.1.5 แกสมัสตาร์ด (mustard gas)

แกสชนิดนี้ นอกจากทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ ทำลายไวรัส และจุลินทรีย์ได้แล้ว ยังมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) อีกด้วย Herriott (1948) พบว่าแกสมัสตาร์ดสามารถทำลายแบคทีเรีย และมีผลช่วยเสริมประสิทธิภาพของรังสีในการทำลายแบคทีเรียด้วย ต่อมา Herriott and Price (1948) ได้ทดสอบแกสมัสตาร์ดกับกับคอลิฟาจ T2 และ สแตฟฟิโลคอคคัสฟาจ พบว่าฟาจทั้งสองชนิดเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็ว Luria and Dulbecco (1949) ได้รายงานความสัมพันธ์ของรังสีและแกสมัสตาร์ดที่มีผลต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์

เซลล์ของฟาจ T2 และ ฟาจ T6 ซึ่งการวิเคราะห์ผลของแกสมัสตาร์ดต่อฟาจจะช่วยอธิบายถึงลักษณะของ เรดิโอไมมิติค แอคชั่น (radiomimetic action) ของแกสมัสตาร์ดด้วย

6.1.6 แอลกอฮอล์

Bronfenbrenner (1925) ศึกษาผลของเกลือต่อความเสถียรของฟาจระหว่างขบวนการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol) และ อะซีโตน (acetone) รวมถึงความเหมาะสมของโมโนวาเลนท์ (monovalent) และไดวาเลนท์ (divalent) แคตอิออน ของเกลือในการทำให้ฟาจเกิดความเสถียร พบว่าสารละลายที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่น กลีเซอรีน (glycerine) และ เอทธิลแอลกอฮอล์ (ethylalcohol) ไม่ก่อให้เกิดผลต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามกลีเซอรอล และ เอทธานอล ที่ไม่ได้เจือจางมีผลทำให้ฟาจสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็ว (d'He'relle, 1926) นอกจากนั้นแอลกอฮอล์ 30 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าเท่ากับ 5.4 ยังใช้ในการตกตะกอนฟาจ T6 ในขั้นตอนแรกของขบวนการทำฟาจให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ (Putnam *et al.*, 1949) Hotchin (1954) ใช้อะซีโตนในการตกตะกอนฟาจ K

6.1.7 สารเคมีอื่นๆ

Krueger and Baldwin (1934) พบว่าการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของสแตฟฟิโลคอคคัสฟาจโดยเมอร์คูริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) ถ้าใช้เมอร์คูริคคลอไรด์เข้มข้น 2.8 เปอร์เซ็นต์ ฟาจที่มีปริมาณ 5×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างสมบูรณ์ด้วยเวลาไม่กี่วัน อย่างไรก็ตามการทดสอบฟาจดังกล่าวด้วยไฮโดรเจน ซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) ตามด้วยการปั่นแยก มีผลทำให้ฟาจกลับมามีความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อีกครั้ง Schulz and Gebhardt (1935) รายงานว่า ฟอร์มาลีน (formalin) ก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของ สแตฟฟิโลคอคคัสฟาจ อย่างไรก็ตามสามารถทำให้ฟาจกลับมามีความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ได้อีกครั้งเมื่อเจือจางความเข้มข้นของฟอร์มาลีน

Labaw *et al.* (1949) ศึกษาความไวของคอลิฟาจ T1 ฟาจ T2 และฟาจ T4 ต่อฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมาก นอกจากนั้นยังศึกษาผลของเมอร์คูริคอิออน (mercuric ion) ในการทำให้ฟาจสูญเสียความสามารถในการเข้า

ไปเจริญในไซสท์เซลล์ด้วย เอนไซม์ (enzyme) ไซยาไนด์ (cyanide) และ ฟลูออไรด์ (fluoride) ไม่ก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในไซสท์เซลล์ของฟาจแต่กลับมีผลในการทำลายแบคทีเรีย ไซยาไนด์ใช้ในการยับยั้งการเจริญพัฒนาของฟาจโดยไม่ก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในไซสท์เซลล์ของฟาจ (Doermann, 1952) ไธมอล (thymol) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นสารเคมีที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรียแต่ไม่ก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในไซสท์เซลล์ของฟาจ (Fre'de'ricq, 1952)

6.2 ปัจจัยด้านฟิสิกส์

6.2.1 คลื่นเสียงโซนิคไวบราชั่น (sonic vibration)

คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเมื่อผ่านไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสามารถก่อให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนและทำลายแบคทีเรียด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถใช้ในการแยกเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้โดยการทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตก (Shropshire, 1947) Anderson *et. al.* (1948)ศึกษาผลของคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงต่อคอลิฟาจเจ็ดชนิดในกลุ่มทีฟาจและต่อไซสท์ *E. coli.* สายพันธุ์บี ผลการศึกษาพบว่า คอลิฟาจขนาดเล็กได้แก่ฟาจ T1 ฟาจ T3 และฟาจ T7 จะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในไซสท์เซลล์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 60 นาที ส่วนคอลิฟาจขนาดใหญ่ซึ่งได้แก่ฟาจ T2 ฟาจ T4 ฟาจ T5 และฟาจ T6 จะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในไซสท์เซลล์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 5 นาที สำหรับไซสท์ *E. coli.* พบว่ามีความต้านทานต่อคลื่นเสียงสูงได้ดีกว่าคอลิฟาจขนาดใหญ่ แต่น้อยกว่าคอลิฟาจขนาดเล็ก Anderson and Doermann (1952) ศึกษาผลของคลื่นเสียงความถี่สูงต่อฟาจ T3 ซึ่งสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในไซสท์เซลล์ด้วยแอนติบอดี (antibody) โดยฟาจ T3 จะถูกทรีท (treat) ด้วยแอนติซีรั่มนำสารละลายของฟาจที่รอดชีวิตซึ่งมีค่าเท่ากับ 10^{-4} มาผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงพบว่าจำนวนของฟาจจะมีค่าเพิ่มขึ้น 40 เท่า ทั้งนี้คิดว่าอาจเนื่องมาจากการแตกออกของพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของแอนติบอดีกับอนุภาคของฟาจ

6.2.2 การเสียสภาพธรรมชาติของพื้นผิว (surface denaturation)

โปรตีนจะเสียสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อแรงระหว่างสถานะกาซกับสถานะของเหลว หรือ สถานะของเหลวกับสถานะของเหลวขาดความสมดุลย์

Campbell-Reuton (1942) รายงานว่าฟาจทุกชนิดที่ใช้ทดสอบเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วเมื่อสารละลายของฟาจถูกเขย่าอย่างแรงในอากาศ ผลการทดลองพบว่าเมื่อเขย่าฟาจที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างแรงจะเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็วโดยมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 10^{-4} ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเปปโตน (peptone) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจจะมีค่าลดลงอย่างมากถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเปปโตน แต่จะมีค่าเพิ่มมากขึ้นถ้าปราศจากเปปโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Adams (1948) ศึกษาคอลิฟาจเจ็ดชนิดในกลุ่มที พบว่าการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วบริเวณผิวสัมผัสของสถานะก๊าซกับสถานะของเหลว ที่เกิดจากฟองอากาศ หรือการเขย่า ในสารละลายที่มีค่าความเจือจางสูงภายใต้สภาวะการเขย่าอย่างรุนแรงอัตราการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจจะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายด้วย

Hotchin (1954) รายงานการศึกษาฟาจ K ที่เขย่าด้วยสารละลายผสมระหว่าง ไอโซบิวทานอล (isobutanol) กับ คลอโรฟอร์ม พบว่าไม่ก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ ดังนั้นสารผสมดังกล่าวจึงถูกใช้ในการทำให้ฟาจบริสุทธิ์ได้ การนำวิธีนี้มาใช้ต้องพิจารณาความเข้มข้นของฟาจกับโปรตีนอื่นๆ ด้วย

6.2.3 อุณหภูมิ

d'He'relle (1926) รายงานว่าฟาจหลายชนิดสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ผลของอุณหภูมิต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจมีลักษณะเฉพาะในฟาจแต่ละชนิด Nanavutty (1930) รายงานว่าสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับความไวต่ออุณหภูมิของฟาจโดยพบว่าคอลิฟาจจะสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าในสารละลายเกลือเมื่อเปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Burnet and McKie (1930) พบว่าฟาจหลายชนิดจะมีความไวต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ด้วยความร้อนมากขึ้นเมื่อฟาจอยู่ในสารละลาย 0.1 นอร์มัลของเกลือโซเดียมหรือโปแตสเซียมเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว นอกจากนั้นพบว่าการเติมเกลือแมกนีเซียมหรือ แคลเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะมีผลให้ความเสถียรของฟาจมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย

6.2.4 ไฮโดรสเตติค เพรสเซอร์ (hydrostatic pressure)

Foster *et al.* (1949) ศึกษาผลของความดันสูงที่มีต่อความเสถียรของฟาจ โดยได้ทำการศึกษากับฟาจในกลุ่มคอลิฟาจสี่ชนิดได้แก่ฟาจ T1 ฟาจ T2 ฟาจ T5 และฟาจ T7 ผลการทดลองพบว่าที่ค่าความดันหมื่นปอนด์ต่อตารางนิ้ว ฟาจ T1 ฟาจ T2 และฟาจ T5 มีค่าความเสถียรเพิ่มขึ้น แต่สำหรับฟาจ T7 จะเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างรวดเร็ว การเปลี่ยนแปลงความดันมีผลทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ T5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความดันที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น มีผลในการเพิ่มผลของอุณหภูมิให้มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งผลเช่นนี้พบได้ในกรณีการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนด้วยความร้อนภายใต้ความดันสูง

6.2.5 ออสโมติค ชอค (osmotic shock)

ขบวนการทำให้ฟาจ T2 ฟาจ T4 ฟาจ T6 และฟาจ K ปราศจากดีเอ็นเอ โดยใช้ออสโมติค ชอค ศึกษาโดย Anderson (1949) ซึ่งในขั้นตอนการปฏิบัติพบว่าสามารถที่จะแยกดีเอ็นเอจากฟาจได้อย่างรวดเร็ว ด้วยการใช้อิเลคโตรไลท์ธรรมดา เช่น กลีเซอรอล น้ำตาลซูโครส และน้ำกลั่น ทันทีที่ลดความเข้มข้นของเกลือ น้ำจะผ่านเข้าสู่ภายในอนุภาคของฟาจจนกระทั่งเกิดการแตก ส่งผลให้ส่วนประกอบที่อยู่ภายในไหลออกมาภายนอกเกือบสมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอิเลคโตรไลท์แบบทีละน้อยจะไม่ก่อให้เกิดผลดังกล่าวข้างต้น (Anderson *et al.*, 1953)

6.3 ปัจจัยด้านรังสี

6.3.1 วิซิเบิ้ล ไลท์ (visible light)

Clifton (1931) ศึกษาผลของแสงที่มีต่อสีที่ใช้ย้อมฟาจ จากการศึกษาพบว่า การเติม 0.01 เปอร์เซ็นต์ของเมทธิลีนบูล (methylene blue) ในสารแขวนลอยของสแตฟฟิโลคอคคัสฟาจ นั้นจะไม่ก่อให้เกิดผลต่ออนุภาคฟาจเลยตราบใดที่สารละลายแขวนลอยนั้นเก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสง แต่จะก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์อย่างสมบูรณ์ ถ้านำสารละลายดังกล่าวไปไว้ในที่ที่มีแสงเป็นเวลา 5 นาที นอกจากนั้นยังพบว่า

การเติม 0.01 เปอร์เซ็นต์ของซีสเตอีน (cysteine) จะป้องกันผลของแสงที่มีต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจได้อย่างสมบูรณ์ การป้องกันผลของแสงต่ออนุภาคของฟาจนอกจากทำได้โดยการเติมซีสเตอีนแล้วสามารถทำได้อีกวิธีคือวางสารละลายฟาจในสภาวะที่มีแสงภายใต้บรรยากาศที่ปกคลุมด้วยกาซไนโตรเจน

Krueger *et al.* (1940) รายงานว่าแสงมีผลก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจโดยพบว่าหลังจากการนำแบคทีเรียที่เป็นโฮสท์ที่อยู่ในเมทธิลีนบูลเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ไว้ในสภาพที่มีแสงระยะเวลาหนึ่งปริมาณของฟาจจะมีจำนวนลดลง อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของแบคทีเรียไม่ได้ลดลงแต่อย่างใด

Wahl and Latarjet (1947) ศึกษาผลของคลื่นแสงที่มีต่อฟาจ S13 ผลการทดลองพบว่าแสงที่มีความยาวคลื่นสูงกว่า 5,500 อังสตรอม ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใดๆ ต่อฟาจ ค่าการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจจะเพิ่มขึ้น เมื่อความยาวคลื่นแสงมีค่าต่ำกว่า 3,500 อังสตรอม ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวฟาจ S13 จะมีความไวต่อรังสีมากกว่าฟาจ C16 ช่วงความยาวคลื่นแสงระหว่าง 3,130 ถึง 3,650 อังสตรอม ฟาจทั้งสองสายพันธุ์จะมีความไวต่อรังสีใกล้เคียงกัน ส่วนในช่วงความยาวคลื่นแสงน้อย เช่นในช่วงอัลตราไวโอเลต พบว่าฟาจ C 16 จะมีความไวต่อรังสีมากกว่าฟาจ S13 การสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ S13 โดยแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 3,650 ถึง 4,500 อังสตรอม แสดงค่าการทำลายอนุภาคฟาจประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ทราบได้จากกราฟแสดงฟาจที่รอดชีวิต ซึ่งความชันของเส้นกราฟที่แสดงการรอดชีวิตของฟาจมีค่ามากกว่าความชันของเส้นกราฟที่แสดงอัตราการก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจาก 17 ถึง 37 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ S13 ที่ความยาวคลื่น 4,500 อังสตรอม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการทำลายดังกล่าวเกิดจากปฏิกิริยาของแสงโดยตรง ผลของพลังงานแสงที่มีต่อฟาจในช่วงความยาวคลื่น 4,500 อังสตรอมจะมีค่าเพียง 10^{-4} ของแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 2,537 อังสตรอม ความแตกต่างของความไวของฟาจต่อวิชิเบิ้ล ไลท์ มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของฟาจ ในส่วนของการดูดซับพลังงานที่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆ

6.3.2 แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light)

Campbell-Reuton(1937) ศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลต ต่อฟาจจำนวนห้าสายพันธุ์ พบว่าก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ มีค่าแตกต่างกันไปในฟาจแต่ละสายพันธุ์ซึ่งวัดได้จากความชันของกราฟการรอดชีวิต Latarjet and Wahl (1945) ศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลตต่อการสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ของฟาจ C16 และ ฟาจ S13 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของฟาจ S13 มีค่าเพียงหนึ่งในสามของฟาจ C16 Hollaender (1954) พบว่าปริมาณฟาจ T1 และ ฟาจ T2 จะเหลือประมาณ 3×10^{-4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่น 2,200 ถึง 3,000 อังสตรอม ซึ่งเป็นแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต Setlow *et al.* (1955) ศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลตในการยับยั้งการเจริญของฟาจ T1 พบว่าแสงที่ช่วงความยาวคลื่นใกล้กับ 2,600 อังสตรอม ให้ผลในการยับยั้งสูงสุดซึ่งในช่วงคลื่นแสงดังกล่าวเป็นช่วงที่กรดนิวคลีอิคดูดซับพลังงานได้สูงสุด

Luria and Delbruck (1942) พบว่าฟาจ T2 ที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ เนื่องมาจากแสงอัลตราไวโอเลต จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้และมีผลชักนำให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์ ซึ่งสามารถวัดได้จากการรอดชีวิตของแบคทีเรียหลังขบวนการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต นอกจากนั้นยังพบว่าฟาจ T2 ซึ่งสูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่เจริญภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลรบกวนความสามารถในการทำกิจกรรมของฟาจ T1 ที่จะเพิ่มจำนวนในเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวด้วย แต่ในทางกลับกันฟาจ T1 ที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ไม่มีผลใดๆ ต่อขบวนการเพิ่มจำนวนของฟาจ T2 การทดลองพบว่าฟาจที่ส่งผลรบกวนความสามารถในการเพิ่มจำนวนของฟาจอีกชนิด เนื่องมาจากฟาจดังกล่าวกระตุ้นให้โฮสท์สร้างโปรตีนบางชนิดออกมาเช่นเดียวกับสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยฟาจปกติ

Dulbecco (1950) ศึกษาการกลับคืนสภาพปกติของฟาจที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ ด้วยแสงในช่วงวิซิเบิ้ล ไลท์ พบว่าการกลับคืนสภาพปกติโดยแสงจะเกิดขึ้นกับฟาจที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ที่อยู่ภายในโฮสท์เซลล์เท่านั้น อัตราการกลับคืนสู่สภาพปกติโดยแสง ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ เอนไซม์ที่อยู่ภายในโฮสท์เซลล์เป็นต้น Goodgal *et al.* (1957) พบว่าการคืนกลับสู่สภาพปกติของฟาจที่อยู่ ภายในโฮสท์เซลล์จะไม่ถูกยับยั้งโดยไซยาไนด์ (cyanide) หรือสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) อัตราการกลับคืนสู่สภาพปกติจะมีลักษณะเป็นเส้นตรงโดยสัมพันธ์กับความ

เข้มของแสงที่ทำให้เกิดการคืนสู่สภาพปกติ ซึ่งพบว่าแสงที่มีความยาวคลื่นใกล้กับ 3,650 อังสตรอมจะให้ประสิทธิภาพในการทำให้ฟาจกลับคืนสู่สภาพปกติได้ดีที่สุด

6.3.3 อิออนไนซิ่ง เรดิเอชั่น (ionizing radiations)

Lea (1946) และ Hollaender (1954) ได้ศึกษาผลของรังสีเอกซ์ที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออนต่อฟาจจากการทดลองในหลายๆสภาวะพบว่าผลของรังสีเอกซ์ที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออน สามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ ๆ คือ ผลทางตรง และผลทางอ้อม สำหรับผลทางตรงนั้นเกิดจากผลของรังสีที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออนโดยตรง ส่วนผลทางอ้อมเกิดจากสารเคมีที่ถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ขึ้นโดยรังสีที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออน การผ่านรังสีที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออนในน้ำบริสุทธิ์จะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุมูลอิสระของ ไฮดรอกไซด์ (OH) ไฮโดรเจน (H) เปอร์ออกไซด์ (HO_2) และออกซิเจน (O_2) เพิ่มขึ้นมาก ซึ่งการเพิ่มขึ้นของอนุมูลดังกล่าว ก่อให้เกิดความเป็นพิษและการผ่าเหล่าต่อเซลล์

Latarjet and Ephrati (1948) ศึกษาการป้องกันผลทางอ้อมของรังสีที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออน โดยใช้สารเคมีหลายชนิด พบว่า กลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) อะลานีน (alanine) และ ฮีสติดีน (histidine) ให้ผลน้อย หรือไม่ให้ผลเลย ขณะที่ ไธโอไกลโคลิค แอซิด (thioglycolec acid) ทริฟโตเฟน (tryptophan) ซีสเตอีน (cystein) ซีสทีน (cystine) กลูตาไธโอน (glutathione) แอสคอบิค แอซิด (ascobic acid) และฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) สามารถป้องกันผลที่เกิดขึ้นจากรังสีที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออนทางอ้อมได้สูง

Watson (1950) ศึกษาผลของรังสีเอกซ์ (X-ray) ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพสรีรวิทยาของฟาจ โดยทางตรงและทางอ้อม การศึกษาผลทางตรงทำการศึกษากับฟาจที่เตรียมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยพบว่าฟาจ T2 ที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ โดยผลทางตรงยังคงความสามารถในการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ได้เหมือนฟาจ T2 ปกติ อย่างไรก็ตามฟาจที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์ที่อยู่ภายในโฮสท์เซลล์ไม่ก่อให้เกิดผลในการทำลายโฮสท์เซลล์แต่อย่างใด นอกจากนั้นพบว่า ฟาจ T2 ที่สูญเสียความสามารถในการเข้าไปเจริญในโฮสท์เซลล์จากผลของรังสีเอกซ์จะส่งผลรบกวนการเพิ่มจำนวนของฟาจ T1 ที่อยู่ในสภาพปกติด้วย Watson (1952) เรียกผลทางอ้อมของรังสีที่ทำให้สารตัวกลางแตกตัวเป็นอิออนว่าผลภายหลัง(after effect) คุณสมบัติการทำลายอนุภาคฟาจที่เกิด

ขึ้นโดยผลภายหลังศึกษาโดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวไปฉายรังสีเอกซ์ก่อนนำมาเจือจางฟาจ ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะทำให้ผลภายหลังเกิดขึ้นโดยปราศจากผลที่เกิดจากจากรังสีเอกซ์โดยตรง Buzzel and Lauffer (1952) ศึกษาผลของรังสีเอ็กซ์ต่อฟาจ T5 ภายใต้สภาวะทั้งผลทางตรงและทางอ้อม พบว่าการรอดชีวิตจากผลทางตรงของรังสี มีระยะเวลาการแสดงออกของผลมีค่าเท่ากับผลของอุณหภูมิในสภาพปราศจากรังสี ขณะที่การรอดชีวิตจากผลทางอ้อมของรังสีจะมีระยะเวลาการแสดงออกของผลยาวนานกว่าผลของอุณหภูมิมาก

7. การศึกษาฟาจในดิน

ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่ดีของแบคเทอริโอฟาจหรือฟาจ โดยสิ่งแวดล้อมที่เป็นดินนั้นเป็นแหล่งของฟาจซึ่งก่อให้เกิดการเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของแบคทีเรียพวกที่สร้างสปอร์และแบคทีเรียกลุ่มอื่น (Rovozzo and Burke,1973)

ฟาจแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในกลุ่มของแบคทีเรียแต่ส่วนใหญ่ฟาจจะถูกแยกออกมาจากกลุ่มของแบคทีเรียที่มีการศึกษาอย่างดีไม่กี่กลุ่ม พบว่าฟาจประมาณ 3,000 ชนิดถูกแยกและถูกจัดกลุ่มโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Ackermann, 1983) อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับฟาจที่อาศัยอยู่ในดิน ยังคงมีอยู่น้อยกว่าโฮสท์ของมัน เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเทคนิคที่ใช้ศึกษาฟาจในสภาพแวดล้อมของดินมีอยู่น้อยและยุ่งยาก แต่อุปสรรคดังกล่าวก็ไม่ได้ส่งผลให้ความสนใจต่อฟาจที่อาศัยอยู่ในดินลดลง ตรงกันข้ามการศึกษาเกี่ยวกับฟาจในดินกลับแพร่หลายมากยิ่งขึ้น รายละเอียดของข้อมูลส่วนใหญ่ที่ได้ เช่น โครงสร้างและส่วนประกอบ การจัดจำแนกฟาจตามอนุกรมวิธาน มาจากการใช้ดินเป็นแหล่งในการแยกฟาจ (Williams *et al.*, 1987)

7.1 การแยกฟาจจากดิน

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบและแยกฟาจจากดินมี 2 วิธี วิธีแรกคือ การนับจำนวนโดยตรง (direct count method) วิธีนี้จะช่วยประมาณการจำนวนของฟาจที่มีชีวิตต่อปริมาณน้ำหนักของดิน ส่วนวิธีที่สองคือ การส่งเสริมการเจริญ (enrichment method) ซึ่งช่วยแสดงให้เห็นถึงปริมาณฟาจที่มีอยู่จำนวนน้อยในตัวอย่างทั้งสองวิธีตรวจหาฟาจโดยอาศัยการแตกของโฮสท์เซลล์บนอาหารแข็งสองชั้น ซึ่งพบว่าค่าที่ได้จากการใช้วิธีนับจำนวนโดยตรงจะมีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากการใช้วิธีส่งเสริมการเจริญ

7.1.1 การแยกฟาจด้วยวิธีนับจำนวนโดยตรง

วิธีการนี้สามารถวัดจำนวนของฟาจที่ถูกแยกได้โดยต้องทราบน้ำหนักของดินที่ใช้ทดสอบและค่าการเจือจางแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบอย่างไรก็ตามจำนวนของฟาจในดินจะเป็นตัวจำกัดความสามารถของการศึกษาด้วยวิธีนับจำนวนโดยตรง ตัวอย่างเช่น Reanney and Marsh (1973) พบว่ามีความจำเป็นในการส่งเสริมความสมบูรณ์ของตัวอย่างดินด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการบ่มในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงสำหรับการนับจำนวนฟาจของ *Bacillus stearothermophilus* ที่มีค่าอยู่ในช่วง 2.0×10^{1} ถึง 4.0×10^{4} เซลล์ต่อกรัมของดินแห้ง Casida and Liu (1974) รายงานว่าฟาจของ *A. globiformis* ถูกตรวจพบน้อยมาก นอกจากดินที่ใช้ทดสอบจะได้รับการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสารอาหารและสภาวะการบ่ม พบว่าเป็นการยากที่จะศึกษาฟาจโดยวิธีการนับจำนวนโดยตรงจากดินที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงเพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของฟาจ Lanning and Williams (1982) และ Williams and Lanning (1984) ได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนับจำนวนฟาจที่มีปริมาณต่ำ ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการนับจำนวนของ *Streptomycetes* ฟาจโดยตรงจากดินซึ่งประสิทธิภาพของวิธีการ ดังกล่าวขึ้นอยู่กับแต่ละขั้นตอนของการแยกฟาจนั้นจะต้องทำการวัดปริมาณของฟาจที่เก็บเกี่ยวได้ของ *Streptomycetes* จากดินปลอดเชื้อที่ทราบปริมาณแน่นอน บางสภาวะที่ต้องการความรวดเร็ว การแยกฟาจโดยวิธีนับจำนวนโดยตรงจัดได้ว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดอย่างไรก็ตามวิธีการนับจำนวนโดยตรงที่ใช้นั้นจะให้ค่าปริมาณของฟาจไม่เที่ยงตรงนัก Hilton and Stotzky (1973) ไม่สามารถแยกคอลิฟาจ (coliphages) จากแม่น้ำด้วยการนำตัวอย่างน้ำมาทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น 6 เท่าโดยใช้การปั่นด้วยความเร็วสูงหรือโดยวิธีการนับจำนวนโดยตรงได้ แต่เมื่อใช้วิธีส่งเสริมการเจริญก็สามารถที่จะตรวจพบฟาจจากตัวอย่างดังกล่าวได้

7.1.2 การแยกฟาจด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ

รายละเอียดของวิธีการและขั้นตอนการบ่ม ปกติจะเลือกจากลักษณะการเจริญของโฮสท์ หลังการบ่ม ชิ้นส่วนของดินและแบคทีเรียที่ไม่ต้องการจะถูกแยกออกมาโดยการปั่น และการกรอง จากนั้นสามารถทำให้ของเหลวที่ได้จากการกรอง (supernatant) ปลอดเชื้อด้วยสารเคมี เช่น คลอโรฟอร์ม แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพของฟาจที่แยกได้ซ้ำอีกครั้งกับโฮสท์บนอาหารแข็งสองชั้น วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพในการแยกฟาจชนิดที่มีโฮสท์อยู่ในช่วงกว้าง และมีสายพันธุ์ของโฮสท์หลากหลาย (Williams *et al.*, 1987) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างโฮสท์ของฟาจที่แยกได้จากดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ

Propagation species	Referrences
Arthrobacter globiformis	Casida and Liu (1974)
Bacillus stearothermophilus	Reanney and Marsh (1973)
Bacillus subtilis	Brodetsky and Romig (1966)
Bacillus spp.	Tan and Reanney (1976)
Nocardia spp.	Williams *et al.* (1980)
Pseodomonas aeruginosa	Bradley (1966)
Rhizobium trifolii	Barnet (1972)
Streptomycetes spp.	Sykes *et al.* (1981)
Streptomyces griseus	Clair and McCoy (1959)

Guelin (1952) เป็นคนแรกที่ใช้วิธีส่งเสริมการเจริญของฟาจ เพื่อตรวจหาฟาจปริมาณต่ำๆ ที่เข้าไปเจริญภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นโฮสท์ที่จำเพาะ ต่อมาวิธีนี้ก็เป็นที่นิยมกันมากขึ้น Casida and Liu (1974) ได้รายงานการแยกฟาจของ *Arthrobacter sp.* ด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ ต่อมา Germida and Casida (1981) ได้มีการปรับปรุงวิธีการดังกล่าว ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Arthrobacter sp.* กับฟาจในดินตามธรรมชาติ

7.2 สภาพของฟาจที่อาศัยอยู่ในดิน

มีเหตุผลที่ทำให้เชื่อได้ว่าฟาจอาจจะอยู่ในสภาพที่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกหรือไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกในโฮสท์ที่อยู่ในดินอย่างไรก็ตามวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบันไม่สามารถที่จะบอกได้ว่าสภาพของฟาจในแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาตินั้นเป็นอย่างไร ดังนั้น Reanney *et al.* (1983) จึงได้เสนอว่าปริมาณของฟาจที่นับได้ไม่ได้มีความสัมพันธ์หรือบ่งบอกถึงปริมาณที่แท้จริงของฟาจ การแยกและตรวจวัดปริมาณของฟาจชนิดที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกไม่ว่าจะใช้วิธีการนับจำนวนโดยตรงหรือวิธีส่งเสริมการเจริญก็ล้วนเป็นเครื่องชี้บ่งว่าการแตกของโฮสท์เซลล์มีสภาพอย่างไร แต่ก็เป็นไปได้เสมอที่ฟาจในสภาพที่ไม่ก่อให้เกิดการแตกของเซลล์โฮสท์ตามธรรมชาติจะเกิดการเปลี่ยนสภาพไปในโฮสท์เซลล์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ฟาจที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกมักจะแยกได้จากดิน มีรายงานพบฟาจสามชนิดที่แยกได้จากดินในบริเวณต่างกันจะสร้าง

พล๊าคที่เกิดจากการแตกของเซลล์โฮสท์ที่มีลักษณะขุ่น (turbid plaque) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะอย่างหนึ่งเมื่อฟาจเข้าไปเจริญภายในเซลล์ *S. coelicolor* (Dowding and Hopwood, 1973) พล๊าคที่มีลักษณะขุ่นจะเป็นพล๊าคของฟาจที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตก ลักษณะของพล๊าคดังกล่าวจะป้องกันการแตกของโฮสท์เซลล์จากฟาจอื่นที่จะเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ได้ เช่นเดียวกับพล๊าคที่เกิดจากการแตกของโฮสท์เซลล์ของฟาจที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกชนิดใหม่ของ *S. venezualae* (Stuttard and Dwyer, 1981) อย่างไรก็ตามฟาจที่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกที่อยู่อย่างอิสระก็สามารถพบในดินได้ด้วย ฟาจที่แยกได้จากหลอดทดลองส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกและปกติจะมีคุณสมบัติในการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ชนิดที่อยู่ในจีนัสเดียวกันได้ ในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง (Jones and Sneath, 1970)

7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของฟาจที่อาศัยอยู่ในดิน

ฟาจที่อาศัยอยู่ในดินอาจอยู่ในลักษณะเป็นฟาจอิสระหรือเข้าไปเจริญอยู่ภายในโฮสท์เซลล์ โดยฟาจจะเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์เป็นระยะ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมบางอย่างที่ชักนำให้เกิดขึ้น และความเสถียรของฟาจนั้นด้วย

7.3.1 ความเสถียรของฟาจในดินที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ

การศึกษาผลกระทบของปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมที่มีต่อดินนั้นมักจะทำการศึกษาภายใต้การควบคุมในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการก็ไม่ใช่ข้อมูลเหมือนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มีการศึกษาถึงความเสถียรของฟาจที่อาศัยอยู่ในดินที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อโดย Williams and Lanning (1984) รายงานว่าความเสถียรของ *Streptomycetes* ฟาจที่อาศัยอยู่ในดินนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมหลายชนิด โดยการตอบสนองต่อปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมชนิดต่างๆ ในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อของฟาจจะมีลักษณะคล้ายกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความเสถียรของ *Streptomycetes* ฟาจในดินที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อพบว่าในดินที่ไม่ปลอดเชื้อฟาจจะสูญเสียความเสถียรได้มากกว่าในดินที่ปลอดเชื้อ Manchester (1986) รายงานว่าความเสถียรของ *Streptomycetes* ฟาจในดินปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ความเสถียรของ *Streptomycetes* ฟาจจะมีค่าลดลงเมื่ออยู่ในดินที่มีลักษณะเป็นดินทราย

I20438874

7.3.2 ดินที่อยู่ในสภาพคอลลอยด์

Reamney and Marsh (1973) รายงานว่าฟาจส่วนใหญ่สามารถจับกับอนุภาคของดินที่อยู่ในสภาพคอลลอยด์ตามแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ ซึ่งการที่ฟาจจับกับอนุภาคคอลลอยด์ของดินเหนียวอาจส่งผลกระทบต่อสภาพ หรือป้องกันไม่ให้ฟาจสามารถทำกิจกรรมต่างๆ ได้ (Duboise *et al.*, 1979) ผลจากการศึกษานั้นขัดแย้งกับการศึกษาของ Bystricky *et al.* (1975) ที่แสดงให้เห็นว่าการจับกันของฟาจกับวัตถุต่างๆ เช่น เบนโทไนท์ (bentonite) ไม่มีผลต่อความสามารถในการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจซึ่งได้ทำการศึกษากับฟาจของ *Arthrobacter sp.* Sykes and Williams (1978) พบว่า *Streptomycetes* ฟาจส่วนใหญ่ที่แยกได้จากดินจะอยู่ในสภาพที่จับกับวัตถุพวกเกาลิน (kaolin) อย่างไรก็ตามฟาจที่จับกับวัตถุเกาลินส่วนใหญ่จะยังคงคุณสมบัติในการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ได้ มีรายงานแสดงให้เห็นว่าฟาจอาจจะจับกับอนุภาคคอลลอยด์ของดินเหนียว ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียก็สามารถจับกับอนุภาคคอลลอยด์ได้ เช่นเดียวกัน ทำให้อนุภาคคอลลอยด์ของดินกลายเป็นที่ยึดของเซลล์ ทั้งสองกรณีอาจส่งผลให้โอกาสในการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจมีค่าเพิ่มมากขึ้น (Marshall, 1968 ; Marshall, 1969) Ruddick and Williams (1972) พบว่าสปอร์ของ *Streptomycetes* ที่จับอยู่อนุภาคของเกาลินจะถูกทำให้แตกได้โดยฟาจและเป็นไปได้ที่จะพบฟาจปริมาณมากในแหล่งที่อยู่อาศัยเดียวกับโฮสท์ อย่างไรก็ตาม Roper and Marshall (1974,1978) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟาจและ *E. coli* ในตะกอนดิน พบว่าการจับกันของเชื้อกับมอนท์มอริลโลไนท์ (montmorillonite) และอนุภาคคอลลอยด์อื่นๆ จะป้องกันเชื้อจากการเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของฟาจได้ Manchester (1986) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Streptomycetes* สองสายพันธุ์กับฟาจที่อาศัยอยู่ในดินที่ไม่ปลอดเชื้อโดยบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ พบว่าแม้จะมีข้อจำกัดมากกว่าเมื่อฟาจอยู่ในดิน แต่ประสิทธิภาพของการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการจับกันของฟาจกับสปอร์ของโฮสท์ที่อยู่ในอนุภาคของดิน

7.3.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

การศึกษาผลที่เกิดจากค่าความเป็นกรด-ด่างของดินต่อความเสถียรของฟาจมีอยู่น้อย อย่างไรก็ตามพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่าสูงหรือต่ำมากๆ (< 4.0

หรือ > 8.0) เป็นสาเหตุของการสูญเสียความสามารถในการทำกิจกรรมของฟาจที่อาศัยอยู่ในดิน ส่วนใหญ่ Sykes *et al.* (1981) รายงานว่าฟาจที่แยกจากดินที่มีสภาพเป็นกลางจะสามารถเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของ *Streptomycetes* ที่ชอบสภาวะเป็นกลางและชอบสภาวะเป็นกรดได้ดีทั้งสองสภาวะเมื่อทำในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่าไม่สามารถตรวจพบฟาจได้ในดินที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 6.0 ทั้งๆที่ค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าวมี *Streptomycetes* ที่ชอบสภาวะเป็นกรดอาศัยอยู่ก็ตาม การแยกฟาจจะมีค่าคงที่อยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5 - 9.0 ในดินปลอดเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แต่จะเกิดการเสียสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงกว่าค่าที่กำหนดไว้ ข้อมูลที่ได้มีประโยชน์ในการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อขบวนการจำลองตัวเองของฟาจในโฮสท์หลายชนิด ความเป็นกรดจะมีผลต่อขบวนการจับกันของฟาจกับโฮสท์เซลล์ ขบวนการส่งผ่านสารพันธุกรรมของฟาจไปสู่โฮสท์เซลล์ ความยาวของระยะพักของฟาจภายในของโฮสท์เซลล์ และสุดท้ายต่อประสิทธิภาพการทำงานของวิถีเมตาบอลิซึมภายในโฮสท์เซลล์ ช่วงที่ฟาจไวต่อความเป็นกรดมากที่สุดเกิดขึ้นในขั้นตอนการเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของขบวนการจำลองตัวเองของฟาจ และพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุดจะทำให้ระยะพักของฟาจมีค่าเพิ่มขึ้น Williams and Lanning (1984) ได้ศึกษา *Streptomycetes* ฟาจที่แยกจากดินที่มีสภาพเป็นกลาง พบว่าฟาจสามารถเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0 ได้ ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อความเสถียรของฟาจอิสระในดินและมีผลต่อความสามารถในการทำกิจกรรมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินด้วย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดกับแบคทีเรียที่ชอบสภาวะเป็นกลางเมื่อทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อขบวนการจับกันของฟาจกับโฮสท์เซลล์หรือฟาจกับอนุภาคคอลลอยด์ (Santoro and Stozky, 1967 ; Ruddick and Williams, 1972) Sykes and Williams (1978) พบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของฟาจที่จับกับเกาลินจะสูญเสียความสามารถในการทำกิจกรรมที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.1 แต่ฟาจอิสระจะสูญเสียความสามารถในการทำกิจกรรมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.9

7.3.4 ผลของอุณหภูมิต่อฟาจในดิน

Williams and Lanning (1984) ได้ศึกษาถึงความเสถียรของ *Streptomycetes* ฟาจที่บ่มในดินที่อุณหภูมิระหว่าง 5 - 40 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการอยู่รอดสูงสุดจะอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ และการสูญเสียความสามารถในการทำกิจกรรมทั้งหมดจะเกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ฟาจที่ทนต่อสภาวะอุณหภูมิสูงก็สามารถพบ

ได้ในฟาจของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง เช่น *Micropolyspora sp.* (Kurup and Heinzen, 1978) และ *B. stearothermophilus* (Saunders and Campbell, 1966) Seeley and Primrose (1980) ได้รายงานถึงผลของอุณหภูมิต่อนิเวศวิทยาของคอลิฟาจที่อาศัยอยู่ในน้ำ พบว่าการแพร่กระจายของฟาจมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่แยกได้ฟาจ Reanney and Marsh (1973) ได้ศึกษาพัฒนาการของฟาจในแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง เช่น *B. stearothermophilus* ที่อาศัยอยู่ในดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆกัน พบว่าการเจริญพัฒนาของฟาจจะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การเจริญพัฒนาของฟาจจะมีค่าลดลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือ 55 องศาเซลเซียส Manchester (1986) ศึกษาขบวนการจำลองตัวเองของ *Streptomyctes* ฟาจที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆ กันของดินในเขตร้อน พบว่าที่อุณหภูมิต่ำระยะพักของฟาจมีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณของฟาจที่เกิดขึ้นต่อจำนวนของโฮสท์เซลล์มีค่าลดลง สำหรับช่วงที่ฟาจมีการเจริญแบ่งตัวนั้นไม่สามารถสรุปได้ เป็นที่น่าสังเกตุว่าฟาจจะสร้างฟาจใหม่ได้น้อยในดินที่อยู่ในเขตร้อน ซึ่งแสดงถึงปริมาณของฟาจที่อาศัยอยู่ในดินนั้นถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิของดิน

7.4 การศึกษาลักษณะของฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษาไวรัสโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการเสนอรายละเอียดของรูปแบบภายนอกและโครงสร้างโดยตรง ถึงแม้ว่าเครื่องมือที่ใช้จะมีคุณภาพสูงในการใช้งาน อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้ก็ถูกจำกัดในเรื่องของเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (Brenner and Horne, 1959) ส่วนประกอบของฟาจได้รับความสนใจมาหลายปีแล้ว และด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีพ สเตนนิ่ง ทำให้การศึกษาโครงสร้างและส่วนประกอบของฟาจมีความสมบรูณ์มากยิ่งขึ้น ความรู้จากการศึกษาโครงสร้างของฟาจก่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกต่างๆ เช่น การจับกันของฟาจกับโฮสท์เซลล์ การส่งผ่านสารพันธุกรรมจากฟาจเข้าสู่โฮสท์เซลล์ การเพิ่มจำนวนและการเกิดการผ่าเหล่าภายในโฮสท์เซลล์ (Painter and Bradley, 1965)

Brenner and Horne (1959) พบว่าเทคนิคที่ง่ายในการศึกษารูปทรงภายนอกและโครงสร้างของฟาจ ซึ่งทำให้เห็นความแตกต่างและมีรายละเอียดที่ชัดเจน คือ การผสมฟาจแขวนลอยกับ 1 เปอร์เซ็นต์ ของกรดฟอสโฟทังสติค (phosphotungstic acid) และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.4 จากนั้นก็สเปร์ยสารผสมดังกล่าวลงบนที่รองรับตัวอย่าง(grid)ที่ใช้ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ซึ่งทำมาจากทองแดงฉาบด้วยคาร์บอนที่ระเหยแห้ง

Gilmour *et al.* (1959) ศึกษาแอคติโนฟาจที่มีส่วนหางที่เข้าไปเจริญภายในเซลล์ของ *S. griseus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีฟ สเตนนิ่ง พบว่าให้รายละเอียดด้านรูปร่างชัดเจนดีมาก

Bradley and Kay (1960)ได้ศึกษาถึงวิธีเนกาทีฟ คอนทราส (negative contrast) ที่ใช้เตรียมฟาจเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน โดยได้ทำการศึกษากับฟาจ 22 ชนิด พบว่าวิธีดังกล่าวให้รายละเอียดและความชัดเจนของตัวอย่างที่ศึกษาได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากวิธีเนกาทีฟ คอนทราส มีความสามารถที่จะทำให้ค่ารีโซวิ่ง เพาเวอร์ (resolving power) มีค่าสูง (10 อังสตรอม หรือน้อยกว่า) เมื่อใช้กับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนรุ่นใหม่ๆ ดังนั้นจึงทำให้รายละเอียดและโครงสร้างของฟาจที่ได้มีความชัดเจนสูงมาก

Bredley (1962) รายงานว่าความแตกต่างของสีที่ใช้ย้อมฟาจด้วยเทคนิคเนกาทีฟ สเตนนิ่ง ว่ามีผลต่อการศึกษารูปทรงภายนอกและโครงสร้างของฟาจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เกิดขึ้นขณะที่สารละลายที่ใช้ย้อมสีด้วยเทคนิคเนกาทีฟ สเตนนิ่ง ถูกทำให้แห้งจะมีผลต่อความชัดเจนของตัวอย่างที่ศึกษา นอกจากนั้นยังเสนอว่าการใช้แผ่นทองแดงฉาบคาร์บอนเป็นที่รองรับตัวอย่าง จะให้ตัวอย่างที่ศึกษามีความชัดเจนมากขึ้น

Stouthamer *et al.* (1963) ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนศึกษาขบวนการจับกันของฟาจกับผิวของไฮสท์เซลล์ โดยเทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีฟ สเตนนิ่ง พบว่าเทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีฟ สเตนนิ่ง มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาขบวนการจับกันของฟาจกับผิวของไฮสท์เซลล์ เนื่องจากเทคนิคการย้อมสีดังกล่าวจะให้รายละเอียดในส่วนต่างๆ เช่น ปลอกหุ้มที่หดได้ แผ่นฐาน แกนกลางของหาง เป็นต้น ได้อย่างชัดเจน ทำให้เข้าใจถึงลักษณะการจับกันของฟาจกับผิวของไฮสท์เซลล์ และขบวนการส่งผ่านสารพันธุกรรมจากฟาจไปสู่ภายในไฮสท์เซลล์

Michelle Bacq and Horne (1963) ศึกษารูปร่างของแอคติโนฟาจ ϕ17 โดยใช้เทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีฟ สเตนนิ่ง ในการศึกษาพบว่าแอคติโนฟาจ ϕ17 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวเฉลี่ย 625 $\pm$ 30 อังสตรอม มีส่วนหัวแบบหกเหลี่ยมถูกบาศก์ (hexagonal) และไม่มีส่วนหาง

Painter and Bradley (1965) ศึกษา *S. venezuelae* ฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดยใช้เทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีฟ สเตนนิ่ง ด้วยยูรานิลอะซิเตด (uranyl acetate) และกรดฟอสโฟทังสติค นอกจากนั้นยังใช้เทคนิคการย้อมสีแบบชาโดว์ แคสติ้ง(shadow-casting)ด้วย ยูเรเนียม (uranium)

Coyette and Calberg-bacq (1967) ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของแอคติโนฟาจชนิดใหม่ 3 ชนิด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบเนกาทีพ สเตนนิ่ง พบว่าฟาจที่แยกได้มีส่วนหัวเป็นรูปหลายเหลี่ยม มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ขนาดของฟาจทั้ง 3 ชนิด รูปร่างส่วนหัว ความยืดหยุ่นของส่วนหาง และชนิดของแผ่นฐานแตกต่างกัน ลักษณะบางอย่างของฟาจที่แยกได้เป็นลักษณะใหม่ที่พบในกลุ่มแอคติโนฟาจ

Ackermann (1983) พบว่าฟาจแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในกลุ่มของแบคทีเรีย แต่ส่วนใหญ่จะถูกแยกออกมาจากกลุ่มของแบคทีเรียที่มีการศึกษาอย่างดีไม่กี่กลุ่ม ฟาจประมาณ 3,000 ชนิดถูกจัดจำแนกโดยการดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

Ackermann and Nguyen (1983) รายงานว่ากล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนเหมาะสมสำหรับการศึกษาฟาจ เพราะว่าเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว นอกจากนั้นยังมีประโยชน์ในการจัดจำแนกและการศึกษาโครงสร้างขนาดเล็กของฟาจด้วย ปัญหาของการศึกษาฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน คือ ปริมาณของฟาจในตัวอย่าง รวมทั้งไม่สามารถตรวจสอบฟาจที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ทุกชนิด ดังนั้นการศึกษาส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคส่งเสริมการเจริญและตรวจสอบพล๊าคเดี่ยวๆที่เกิดจากการแตกของโฮสท์เซลล์ ข้อดีของการตรวจสอบฟาจที่แยกได้จากวิธีส่งเสริมการเจริญด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน คือรวดเร็วและให้ภาพที่สมบรูณ์ ข้อเสียของการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนคือ มีข้อจำกัดอยู่ที่ปริมาณของฟาจในตัวอย่างต่อการมองเห็นตัวอย่างเช่น ถ้าตัวอย่างประกอบด้วยฟาจน้อยกว่า 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน นอกจากนั้นธรรมชาติและสายพันธุ์ของฟาจที่ใช้ศึกษาจะมีผลต่อข้อมูลที่ได้ด้วย

7.5 การศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของฟาจ

เกณฑ์ที่ใช้สำหรับการศึกษาลักษณะของฟาจ มีอยู่หลายประการ เช่น

7.5.1 จากลักษณะรูปแบบของพล๊าคที่เกิดจากการแตกของโฮสท์เซลล์

ฟาจต่างชนิดกันจะมีลักษณะและชนิดของพล๊าค แตกต่างกันไป พวกฟาจที่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกมักจะสร้างพล๊าค ที่มีลักษณะใสตรงบริเวณส่วนกลาง อย่างไรก็ตาม ฟาจพวกที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตก มักจะสร้างพล๊าค ที่มีลักษณะขุ่นตรงบริเวณส่วนกลาง

Clair and McCoy (1959) รายงานว่าลักษณะของพล๊าค สามารถใช้ในการบอกชนิดของโฮสท์และฟาจ ซึ่งมีความแน่ชัดมากกว่าการดูจากช่วงของโฮสท์หรือความไวของฟาจที่มีต่อโฮสท์เซลล์ ลักษณะของพล๊าค อาจจะถูกควบคุมด้วยโฮสท์หรือด้วยฟาจ ดังนั้นจึงมีลักษณะที่จำเพาะและแตกต่างกันออกไปตามชนิดของฟาจและโฮสท์เซลล์

Dowding and Hopwood (1973) รายงานการแยกฟาจที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตกของ *S. coelicolor* A3(2) จากดิน พบว่าฟาจที่แยกได้ให้พล๊าค ที่มีลักษณะใสในสภาพไวรูเลนท์แต่จะให้พล๊าค ที่มีลักษณะขุ่นขึ้น เมื่ออยู่ในสภาพโปรฟาจ นอกจากนั้นลักษณะพล๊าคของฟาจ VP5 หลังการบ่มข้ามคืนจะมีลักษณะใสตรงบริเวณส่วนกลาง โดยบริเวณส่วนรอบจะมีลักษณะขุ่น เมื่อบ่มเชื้อต่อไปลักษณะพล๊าคของฟาจ VP5 จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป หลังจาก 3 วันของการบ่มบริเวณส่วนรอบๆที่มีลักษณะขุ่น จะเปลี่ยนเป็นวงแหวนล้อมรอบบริเวณส่วนที่มีลักษณะใส

Kurup and Heinzen (1978) รายงานว่าลักษณะพล๊าคของฟาจจะแตกต่างกันไปตามอาหารเลี้ยงเชื้อและโฮสท์ พบว่า *Micropoly faeni.* ฟาจ(ϕ-150A) ให้พล๊าคลักษณะใสมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร ส่วน *T. candidus* ฟาจ(ϕ-115A) ให้พล๊าคลักษณะใสตรงบริเวณส่วนกลางโดยบริเวณรอบๆ จะมีลักษณะขุ่น

Sykes *et al.* (1981) รายงานว่า ฟาจ f6 และ f13 ที่แยกได้มีลักษณะของพล๊าคแตกต่างกัน โดยฟาจ f6 จะให้พล๊าคลักษณะใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2.18 มิลลิเมตร สำหรับฟาจ f13 จะให้พล๊าคลักษณะขุ่น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.55 มิลลิเมตร

Kuhn *et al.* (1987) รายงานการศึกษาฟาจที่ไม่ทำให้โฮสท์เซลล์ของ *S. galilaeus* แตกพบว่าฟาจที่แยกได้ให้พล๊าค ที่มีลักษณะขุ่น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร

7.5.2 จากลักษณะรูปร่างโครงสร้างส่วนประกอบของฟาจ

โครงสร้างของส่วนหัว ส่วนหาง ของฟาจสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการศึกษาลักษณะของฟาจได้ ส่วนหัวอาจมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม และส่วนหางอาจมีลักษณะเป็น ชนิดหดได้ ชนิดหดไม่ได้ โดยชนิดหดได้อาจมีขนาดยาว สั้น หนา บาง เป็นเกลียว หรือ เป็นเส้นโค้ง แตกต่างกันไปในฟาจแต่ละชนิด

Coyette and Calberg-bacq (1967) ศึกษาลักษณะรูปร่างของแอคติโนฟาจชนิดใหม่ 3 ชนิด พบว่าส่วนหัวของฟาจมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยมถูกบาศก์ (polyhedral) และมีส่วนหางเป็นแบบหดไม่ได้ อย่างไรก็ตามฟาจแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในด้านขนาด ความยืดหยุ่นของส่วนหางและชนิดของแผ่นฐาน

Kurup and Heinzen (1978) พบว่าฟาจ ϕ-115A มีส่วนหัวเป็นแบบหกเหลี่ยมถูกบาศ์ก มีขนาด 60 -65 นาโนเมตร ส่วนหางมีขนาดสั้นและบาง ขนาด 5 x 97 นาโนเมตร ส่วนฟาจ ϕ-150A มีส่วนหัวเป็นแบบหกเหลี่ยมถูกบาศ์ก มีขนาด 50 - 60 นาโนเมตร มีส่วนหางลักษณะยาวมีขนาด 7 - 8 x 132 - 145 นาโนเมตร

Sykes *et al.* (1981) รายงานการศึกษารูปร่างของฟาจ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยเทคนิคเนกาทีพ สเตนนิ่ง พบว่าฟาจ f6 และ f13 ที่แยกได้มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 นาโนเมตร มีส่วนหางแบบหดไม่ได้ ยาว 145 และ 175 นาโนเมตรตามลำดับ และสามารถจัดให้อยู่ในฟาจกลุ่ม IV ของการจัดจำแนกฟาจตามลักษณะรูปร่าง ส่วนประกอบ ของ Bradley (1967) (รูปที่ 4)

7.5.3 ลักษณะอื่นๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการศึกษา

คุณสมบัติอื่นอีกหลายประการที่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการศึกษาลักษณะของฟาจ คือ ลักษณะการอยู่ร่วมกันของฟาจกับโฮสท์โดยฟาจไม่ทำให้โฮสท์เซลล์แตก (lysotype) (Dhillon and Dhillon, 1976 ; Dhillon *et al.*, 1976) โฮสท์เรนท์ (Kurup and Heinzen, 1978 ; Kuhn *et al.*, 1987) ความไวต่อคลอโรฟอร์ม (chloroform sensitivity) ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บรักษา การเจริญแบบขั้นตอนเดียว (one step growth curve) ระยะเวลาการพักตัวของฟาจภายในโฮสท์เซลล์ปริมาณของฟาจต่อปริมาณเซลล์ของโฮสท์(brust size) และผลของสิ่งแวดล้อมชนิดต่างๆ เช่น ความเค็ม เป็นต้น (Goyal *et al.*, 1987)

7.6 วิธีการเก็บรักษาฟาจ

ในปี 1954 ศูนย์เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แห่งชาติอเมริกัน เริ่มให้ความสนใจในการหาข้อมูลหลักฐานทางเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาสายพันธุ์ของฟาจให้ได้เป็นระยะเวลานานๆ รวมถึงการแพร่กระจายของฟาจด้วย ส่งผลให้เกิดความจำเป็นในการหาวิธีการที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาสายพันธุ์ของฟาจ ได้เป็นระยะเวลานานๆ โดยไม่ทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงสภาพ ได้มีการศึกษาวิธีการต่างๆที่ใช้เก็บรักษาฟาจ เช่น การเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Adams, 1950) การเก็บรักษาโดยใช้ กลีเซอรอล หรือสารช่วยรักษาสภาพอื่นๆ การทำให้แห้ง และการทำให้แห้งในสภาพแช่เข็ง

Adams (1959) รายงานว่าความเสถียรของฟาจจะขึ้นอยู่กับของเหลวที่แขวนลอยฟาจอยู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยโปรตีนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปกติจะใช้เก็บรักษาฟาจได้เป็นระยะเวลานานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามส่วนประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำ มักจะไม่คงที่ ปริมาณโปรตีนเพียงเล็กน้อยที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะป้องกันการเสียสภาพของฟาจได้ นอกจากนั้นโปรตีนยังมีส่วนสำคัญต่อการเจือจาง หรือในบางกรณีที่ใช้สารละลายของเกลือที่มีประจุบวก เช่น แมกนีเซียมอิออน หรือ แคลเซียมอิออน ที่ค่าความเข้มข้นประมาณ 10^{-3} โมลาร์ ซึ่งอาจทำให้ความเสถียรของฟาจมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก

Clark (1962) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาฟาจหลายวิธี โดยใช้ฟาจหลายชนิดและใช้สภาวะในการเก็บรักษาแตกต่างกันไปหลายสภาวะ ตัวอย่างที่ใช้จะถูกเก็บเป็นเวลา 2 ปีที่อุณหภูมิห้อง (24 - 28 องศาเซลเซียส) และที่ 4 องศาเซลเซียส ; ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บโดยการทำให้แห้ง เก็บโดยการทำให้แห้งในสภาพแช่เข็ง และทำการตรวจวัดจำนวนฟาจที่สูญเสียไป พบว่าการเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จะก่อให้เกิดความเสียหายกับฟาจได้น้อยที่สุด รองลงมาคือการเก็บใน 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล จะเกิดความเสียหายน้อยรองลงมา หลัง 2 ปีจำนวนของฟาจในอาหารเหลวจะมีค่าสูงกว่าในกลีเซอรอลและการทำให้แห้งในสภาพแช่เข็ง การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีจำนวนของฟาจอยู่รอดมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

Keogh and Pettingill (1966) พบว่า *Streptococci sp.* ฟาจคงรักษาสภาพได้เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส หลังการแช่เข็งอย่างรวดเร็วที่ -70 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม มีหลายกรณีที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ความสัมพันธ์ของการแช่แข็งและการละลายมีผลต่อการมีชีวิตอยู่ของฟาจบางชนิด แต่มีหลักฐานยืนยันน้อยในกรณีฟาจของเชื้อจำพวก *Streptococci sp.*

8. การประยุกต์ใช้ฟาจในด้านต่างๆ

8.1 ทางการแพทย์

การค้นพบฟาจโดย F.W. Twort (1915) และ d'He'relle (1917) เมื่อประมาณ 90 ปีที่ผ่านมา ก่อให้เกิดความหวังที่จะใช้ฟาจในทางอายุรเวช เพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการค้นพบสารปฏิชีวนะในปี 1940 ส่งผลให้งานวิจัยในด้านนี้หยุดชะงักลง (Goyal *et al.*, 1987) ต่อมาความคิดดังกล่าวได้ถูกนักจุลชีววิทยารื้อฟื้นขึ้นมาอีกครั้ง โดย Williams Smith และ Michael Huggions แห่ง Hougton College ในรัฐ New York ได้ทำการศึกษาวิจัยการใช้ฟาจรักษาการติดเชื้อโรคในสัตว์ โดยในการทดลองหนึ่งพวกเขาฉีดฟาจที่ก่อให้เกิดการแตกของโฮสท์เซลล์ที่มีความจำเพาะสูงต่อฟาจในหนูทดลองที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าไม่เพียงก่อให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่เป็นโฮสท์ แต่ประสิทธิภาพในการทำลายยังมีผลมากกว่าการใช้สารปฏิชีวนะถึง 4-5 เท่า อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียจำนวนหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านทานการทำลายของฟาจแต่ก็พบในปริมาณที่น้อยมาก จากผลการวิจัย Smith และ Huggin เกิดความคิดที่จะใช้ฟาจรักษาการติดเชื้อของสัตว์ใหญ่ เช่น สุกร หรือ วัว โดยใช้ฟาจที่เป็นสายพันธุ์ผสมเพื่อป้องกันการต้านทานที่มีต่อฟาจของแบคทีเรียที่เป็นโฮสท์ ซึ่งการทดลองทั้งหมดให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เมื่อเปรียบเทียบการใช้ฟาจกับสารปฏิชีวะ พบว่าฟาจมีข้อดีที่น่าสนใจกว่าสารปฏิชีวนะดังนี้ คือ (Pelczar *et al.*, 1993)

ก. การรักษาโรคด้วยฟาจจะใช้ฟาจในปริมาณหนึ่งเพียงครั้งเดียว เนื่องจากฟาจสามารถเพิ่มจำนวนได้เอง และไม่ถูกเจือจางด้วยของเหลวภายในร่างกายของสัตว์และพืช

ข. แบคทีเรียผ่าเหล่าที่มีฤทธิ์ต้านทานการทำลายของฟาจ จะมีการเจริญพัฒนาช้ามาก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติ

ค. ฟาจสามารถค้นหาแบคทีเรียชนิดที่ก่อให้เกิดโรคได้ เปรียบเหมือนกับจรวดนำวิถีที่พุ่งเข้าหาเป้าหมายโดยอาศัยความร้อน

ง. ในกรณีการติดเชื้อที่เกิดขึ้นภายในทางเดินอาหาร ฟาจจะทำหน้าที่ในการขจัดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคแต่เพียงอย่างเดียว โดยไม่ก่อให้เกิดผลอย่างใดต่อแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ภายในทางเดินอาหารเลย

8.2 การใช้เป็นดัชนีชี้มลภาวะ

มีการประยุกต์ใช้ฟาจเป็นดัชนีชี้มลภาวะในหลายกรณี เช่น เป็นดัชนีชี้การปนเปื้อนของน้ำทิ้ง เป็นดัชนีชี้คุณภาพของน้ำและขบวนการบำบัดน้ำเสีย และ ใช้เป็นดัชนีชี้การรอดชีวิตของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ (Kott *et al.*, 1974) การใช้ฟาจเป็นดัชนีชี้หรือตรวจสอบปริมาณและพฤติกรรมของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม นิยมใช้กันมากเพราะว่าเป็น

การตรวจสอบที่สะดวกและมีค่าใช้จ่ายต่ำ นอกจากนั้นยังสามารถทราบปริมาณในจำนวนที่ต่ำที่ได้จากตัวอย่างได้อีกด้วยภายในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการนับจำนวนหรือตรวจหากับแบคทีเรียที่ต้องใช้เวลาหลายวัน(Kenard and Valentine, 1974) ฟาจที่อยู่ในกลุ่มจำพวกคอลิฟาจจะมีการนำมาใช้มากที่สุดเนื่องจากมีการศึกษามาอย่างดี (Hilton and Stotzky, 1973)

การปนเปื้อนของน้ำส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรค จำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการตรวจสอบที่มีความไวต่อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบและควบคุมน้ำทิ้งได้ (Wentsel *et al.*, 1982) ซึ่งจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่เกิดการแพร่กระจายมีความสำคัญต่อสาธารณสุขของชุมชน การตรวจสอบและนับจำนวนโดยตรงของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคนั้น เป็นวิธีการตรวจสอบที่จำเพาะและยุ่งยาก (Havelaar and Hogeboom, 1984) นอกจากนั้น วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลา ทำให้เกิดความยุ่งยากต่อนักจุลชีววิทยาที่จะพัฒนาการใช้แบคทีเรียเป็นดัชนีชี้สภาวะมลพิษ ดังนั้นฟาจในกลุ่มคอลิฟาจจึงถูกพัฒนาขึ้นโดยศูนย์บริการสาธารณสุขแห่งสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้สภาวะมลพิษของน้ำดื่ม ปัจจุบันอัตราการระบาดของแบคทีเรียในน้ำที่ก่อให้เกิดโรคในสหรัฐอเมริกามีค่าต่ำมาก เพราะว่ามีวิธีการตรวจสอบที่เป็นมาตรฐาน ทำให้ได้น้ำที่มีคุณภาพดีตามหลักสุขาภิบาล (Kott *et al.*, 1974) ความคิดในการใช้ฟาจเป็นดัชนีชี้สภาวะได้แพร่หลายไปอย่างมาก ทำให้เกิดการวิจัยและพัฒนาเพื่อค้นหาฟาจที่มีประสิทธิภาพในการใช้งานได้ดีที่สุด แต่ก็ไม่มีฟาจกลุ่มจำเพาะใดที่พบว่ามีคุณสมบัติครบถ้วนตามเกณฑ์ที่กำหนด เช่น การตรวจหาต้องง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่สูง ปริมาณต้องสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบ ต้องไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นต้น อย่างไรก็ตามคอลิฟาจมีคุณสมบัติตามเกณฑ์ที่กำหนดเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการนำฟาจมาใช้เป็นดัชนีชี้สภาวะการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (Berg, 1978)

8.3 การใช้ฟาจเป็นตัวตามรอยการเคลื่อนที่ของน้ำ

ความรู้ในการเคลื่อนที่ของน้ำจากถังเก็บน้ำเสีย น้ำที่ระบายจากบ่อรับน้ำเสีย และน้ำเสียจากที่ตั้งต่างๆ มีความสำคัญมากหากต้องการที่จะกำหนดที่ตั้งที่ดีที่สุดของแหล่งน้ำที่ใช้ในการบริโภค (Bitton, 1980) นอกจากนี้การปล่อยน้ำเสียลงในทะเลเปิดหรือในปากน้ำก่อให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำเสียบริเวณชายหาด และปนเปื้อนสัตว์ทะเลที่ใช้บริโภคได้ วิธีที่ใช้ตามรอยการเคลื่อนที่ของน้ำ คือการเติมฟาจปริมาณมากลงในสถานที่ที่คาดว่าจะเป็นต้นเหตุของการปนเปื้อน หรือจุดปล่อยน้ำทิ้ง เพื่อให้เห็นการแพร่กระจาย ข้อดีของการใช้ฟาจเป็นตัวตามรอย คือ ฟาจไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคน สัตว์ และพืช เมื่อเกิดการปนเปื้อนของฟาจในช่วงระยะเวลาที่ใช้

ทดลอง สามารถตรวจสอบได้แม้ฟาจมีปริมาณต่ำหากใช้วิธีการที่เหมาะสม การใช้ฟาจเป็นตัวตามรอยต้องพิจารณาถึงชนิดของฟาจและโฮสท์ที่เลือกใช้ ตัวอย่างเช่น *E. coli* ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นโฮสท์ เพราะว่าทั้ง E. coli. และคอลิฟาจมีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้แปรผลผิดพลาดไป (Seeley and Primrose, 1980)

8.4 ทางอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมการหมัก ผลผลิตส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับการเจริญและเมตาบอลิซึมแอคติวิตีของแบคทีเรียที่ใช้ในขบวนการ ในขั้นตอนนี้จะเป็นโอกาสของฟาจที่จะเข้าไปเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว การเข้าไปเจริญภายในโฮสท์เซลล์ของฟาจในขบวนการหมัก ก่อให้เกิดการสูญเสีย และเกิดความเป็นพิษกับวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของฟาจในอุตสาหกรรมการผลิตหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์นม (dairy) (Klaenhammer, 1984) เคซีน (casein) (Thomas and Lowrie, 1975a, 1975b) ไวน์ (wine) (Sozzi *et al.*, 1982) อะซีโตน-บิวทานอล (acetone-butanol) (Ogata and Hongo, 1979) สาเก (sake) (Kaneko *et al.*,1955) และกรดกลูตามิค (glutamic acid) (Hongo *et al.*, 1972) มีความสำคัญอย่างยิ่ง แม้ว่าฟาจที่ก่อให้เกิดการแตกของเซลล์โฮสท์จำพวกแบคทีเรียจะแยกได้จากแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติโดยทั่วไป แต่ก็มีรายงานที่ยืนยันการพบฟาจที่เข้าไปเจริญในขบวนการหมักปกติด้วยเช่นที่เกิดขึ้นในกรณีของ *L. plantarum* ที่ใช้ในขบวนการหมักน้ำปลา (Nes and Sorheim, 1984) และ *Actinomycetes* ที่ใช้ในขบวนการผลิตสารปฏิชีวนะ (Ogata *et al.*, 1982) แบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักจะสูญเสียความสามารถในการผลิต เมื่อถูกฟาจเข้าไปเจริญภายในเซลล์ ผลผลิตของขบวนการหมักจะลดลง เชื้อที่ปนเปื้อนจะเกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ประสิทธิภาพของการหมักจะลดลง นอกจากนั้นในขบวนการหมักอาหาร การพัฒนาเชื้อตั้งต้นที่ไม่เหมาะสม อาจก่อให้เกิดการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Goyal *et al.*, 1987) ประโยชน์ของฟาจในทางอุตสาหกรรมได้แก่การใช้ฟาจเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อตั้งต้นให้มีภูมิคุ้มกันการเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของฟาจชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังใช้ฟาจเพื่อทำให้เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้อุตสาหกรรมสูญเสียความเสถียรทำให้ต้องพึ่งพาบริษัทผู้ผลิตอยู่ตลอดเวลา ไม่สามารถปลูกถ่ายเชื้อตั้งต้นได้เอง

8.5 ทางอาหาร

ฟาจมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียหลายสปีชีส์สามารถพบฟาจได้ในสิ่งแวดล้อมที่เดียวกันกับที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ นอกจากนี้ฟาจยังสัมพันธ์กับแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารหรือสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหาร ดังนั้นจึงทำให้พบฟาจในอาหารด้วย ฟาจถูกแยกได้จากอาหารหลายชนิดและบ่อยครั้งที่จะพบฟาจและโฮสท์เซลล์ในขบวนการผลิตอาหารหมัก เมื่อไม่นานมานี้เองความสัมพันธ์ระหว่างฟาจกับโฮสท์ได้รับความสนใจและได้รับความสำคัญเพิ่มมากขึ้นทุกที ซึ่งเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในอาหารซึ่งเป็นปัญหาที่มีความสำคัญด้านสาธารณสุข หรือเป็นดัชนีชี้สภาวะทางสุขาภิบาลในขบวนการผลิตอาหาร นั้นมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ตรวจสอบได้ยาก ใช้เวลาในการตรวจสอบ อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง ฟาจจึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นดัชนีชี้การปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากฟาจถูกตรวจสอบได้แม้มีปริมาณต่ำ การตรวจสอบใช้เวลาน้อยค่าใช้จ่ายก็ไม่สูง การพบฟาจปริมาณสูงในอาหารแช่แข็งเป็นจุดสำคัญประการหนึ่งของการพัฒนาการใช้ฟาจเพื่อเป็นดัชนีชี้การปนเปื้อนของแบคทีเรีย นอกจากนี้คุณสมบัติความจำเพาะของฟาจที่มีต่อโฮสท์ก็เป็นประโยชน์ต่อการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ปนเปื้อน คุณสมบัติในการยั้บยั้งการเจริญพัฒนาของฟาจต่อแบคทีเรีย ยังช่วยในการจำกัดปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารด้วย (Goyal *et al.*, 1987)

8.6 ชีววิทยาระดับโมเลกุล

ฟาจเป็นจุลชีพขนาดเล็กมากที่มีลักษณะทางพันธุกรรมน้อย ขนาดเล็ก มีระบบจำลองตัวที่ไม่ซับซ้อน เจริญรวดเร็ว จึงมักนำฟาจมาใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดสารพันธุกรรม (vecter of gene transfer) การโคลนยีนในฟาจมีข้อดีกว่าการใช้พลาสมิด คือ สามารถใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้ถึงประมาณ 20 กิโลเบส และการนำฟาจถูกผสมเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทรานดักชั่น (transduction) ก็มีประสิทธิภาพดีกว่าการนำพลาสมิดถูกผสมเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทรานฟอร์เมชั่น (transformation) นอกจากนี้การตรวจหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจากพล๊าคยังทำได้ง่ายกว่าการตรวจหาจากโคโลนีของแบคทีเรียด้วย (Cameron, 1975)

งานวิจัยนี้จะดำเนินการแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจที่อาศัยอยู่ในดิน ด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ ซึ่งต้องทำการแยกจุลินทรีย์ที่เป็นโฮสท์ของฟาจก่อน จากนั้นจึงใช้โฮสท์ที่แยกได้มาช่วยในการเพิ่มจำนวนฟาจที่มีอยู่ในดินให้เพิ่มมากขึ้นจนสามารถตรวจสอบฟาจได้โดยง่าย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟาจนิยมศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นยังช่วยในการจัดจำแนกชนิดและโครงสร้างของฟาจด้วย ฟาจที่นำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านจะถูกย้อมสีด้วยเทคนิคแบบเนกาทีพ สเตนนิ่ง ซึ่งวิธีนี้จะให้รายละเอียดในส่วนที่มีขนาดเล็กได้อย่างชัดเจน

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย</u>

ได้ฐานข้อมูลเกี่ยวกับฟาจและลักษณะของฟาจต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในดินในประเทศไทย

<u>ขั้นตอนการวิจัย</u>

1. แยกจุลินทรีย์ที่เป็นโฮสท์ของฟาจจากดิน
2. แยกฟาจจากดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ
3. ตรวจสอบฟาจที่แยกได้ด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็งสองชั้น
4. ทำฟาจให้บริสุทธิ์
5. เพิ่มปริมาณฟาจให้มากขึ้น
6. ศึกษาลักษณะของฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย