บทที่ 11
ผลของออกซิเจนต่อเชื้อจุลินทรีย์

11.1 คำนำ

การศึกษาถึงผลของออกซิเจนต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้เริ่มต้นขึ้นโดย Pasteur ซึ่งค้นพบว่ายีสต์ได้รับพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตจากการออกซิไดซ์น้ำตาลด้วยออกซิเจน หรือจากการทำให้น้ำตาลสลายตัวภายใต้สภาพที่ไม่มีออกซิเจนแล้วได้เป็นอีทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจนสามารถยับยั้งขบวนการสร้างพลังงานที่ไม่ใช้ออกซิเจนของยีสต์พร้อมทั้งลดอัตราการทำลายน้ำตาลกลูโคสได้ด้วย ผลจากการยับยั้งโดยออกซิเจนในกรณีนี้อาจถูกเรียกในเวลาต่อมาว่า Pasteur effect จึงเป็นตัวอย่างในการควบคุมการเมตาโบลิซึมโดยซับสเตรตแบบหนึ่ง อย่างไรก็ตามกลไกที่ทำให้เกิดผลเช่นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ปัญหาเกี่ยวกับปริมาณความต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโตหรือเพื่อกิจการอื่นของจุลินทรีย์ได้กล่าวถึงมาแล้วในตอนที่ 9.2 แต่ในบทนี้จะได้กล่าวถึงเกี่ยวกับการตอบสนองของจุลินทรีย์ต่อความเครียดออกซิเจนที่ละลาย

11.2 การเจริญเติบโตที่ถูกจำกัดโดยออกซิเจน

ในการหมักแบบเก็บกักด้วยค่า K_La คงที่เมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดด้วยออกซิเจน อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวล (dx/dt) จะคงที่ด้วยแต่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะจะลดลง เพื่อตรวจสอบผลของการจำกัดออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตวิธีที่ดีที่สุดคือการหมักแบบคงที่ทางเคมีภายใต้สถานะมั่นคงจนกระทั่งสามารถหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะได้ ผลจากการจำกัดออกซิเจนต่อความเข้มข้นของชีวมวลในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกทำนายโดยสมการที่ 9.20 ในสมการนี้จะถูกแทนค่าด้วย $c_s = Hp_g$, $c = Hp_l$, $q_{O_2} = D/Y_O$, ซึ่ง Y_O คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากออกซิเจน และเมื่อในสถานะมั่นคง

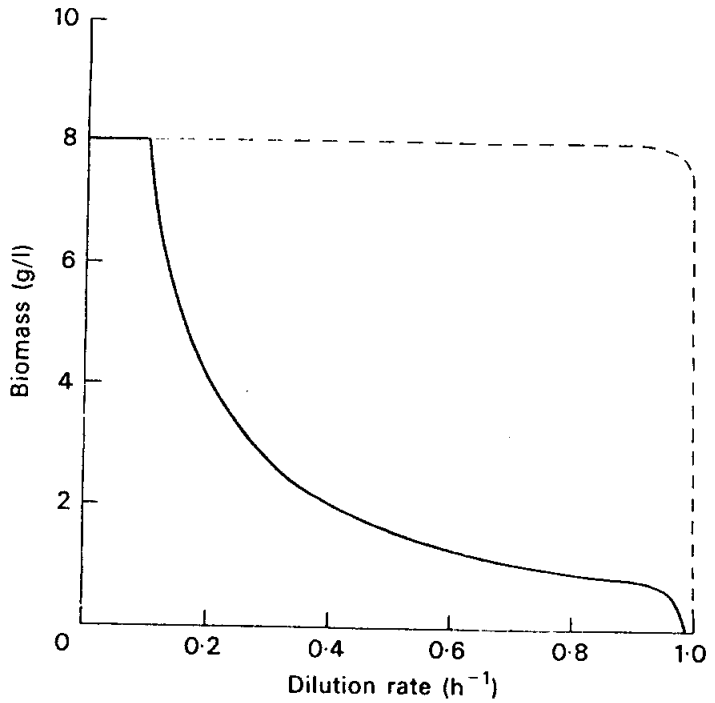
คือเมื่อ $dc/dt=0$ ความเข้มข้นของชีวมวลคือ

$$\tilde{x} = Y_0 \left(\frac{K_L a}{D} + 1\right)(c_s - \tilde{c}) \qquad 11.1$$

ในหลายระบบพบว่าค่า $K_L a/D \gg 1$ ดังนั้นสมการที่ 11.1 จึงถูกลดรูปเป็น

$$\tilde{x} = \frac{Y_0 K_L a}{D}(c_s - \tilde{c}) \qquad 11.2$$

ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงถูกกำหนดได้จาก $\tilde{c} = K_s D/(\mu_m - D)$ ซึ่ง K_s คือค่าความอิ่มตัวคงที่ของออกซิเจน รูปที่ 11.1 แสดงการตอบสนองของความเข้มข้นชีวมวลในการหมักแบบคงที่ทางเคมีด้วยการจำกัดออกซิเจนและด้วยการลดอัตราความเร็วในการเจือจางจนกระทั่งไม่ปรากฏการจำกัดออกซิเจน การตอบสนองเช่นนี้ถูกค้นพบโดย Pirt (1957) สำหรับการเจริญเติบโตของ **Klebsiella aerogenes** ที่ถูกกำหนดจำกัดโดยออกซิเจน



รูปที่ 11.1 Comparison of biomass production with oxygen-limited growth and carbon and energy substrate-limited growth in steady states of a chemostat culture. Continuous line, oxygen-limited biomass; broken line, carbon-limited biomass. Values of parameters used in Eqn *11.2* and Eqn *5.9*: $K_L a = 100\ h^{-1}$, $c_s = 8 \times 10^{-3}$ g/l, K_s(oxygen) $= 8 \times 10^{-5}$ g/l, $Y_0 = 1{\cdot}0$, $\mu_m = 1{\cdot}0\ h^{-1}$, for carbon-limited growth $Y = 0{\cdot}5$, s_r for carbon substrate $= 16{\cdot}0$ g/l, K_s (carbon substrate) $= 0{\cdot}01$ g/l; maintenance energy is assumed to be nil.

11.3 ผลจากความเครียดออกซิเจนที่ละลายต่ออัตรา การใช้ออกซิเจนของชีวมวลที่กำลังเจริญเติบโต

ความสัมพันธ์ระหว่างการหายใจของชีวมวลกับความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายปกติเป็นไปตามความสัมพันธ์แบบ **Michaelis-Menten** คือ

$$q_{O_2} = q_{O_2}^{max}\, c/(c+K_s) \qquad 11.3$$

ถ้าแทนค่า $c = Hp_l$ ซึ่ง p_l คือความเครียดออกซิเจนที่ละลาย (DOT) H คือค่าคงที่ของ **Henry** และ $K_s = HK_p$ จะได้ว่า

$$q_{O_2} = q_{O_2}^{max}\, p_l/(p_l+K_p) \qquad 11.4$$

ซึ่ง K_p คือค่าความอิ่มตัวคงที่ที่ถูกวัดเป็นหน่วยความดัน นอกจากนี้ถ้าให้ μ คืออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะและถือว่าพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (Y_0) จากออกซิเจนมีค่าคงที่ก็อาจแทนค่าได้ว่า $q_{O_2} = \mu/Y_0$ และ $q_{O_2}^{max} = \mu_m/Y_0$ จะได้สมการเป็น

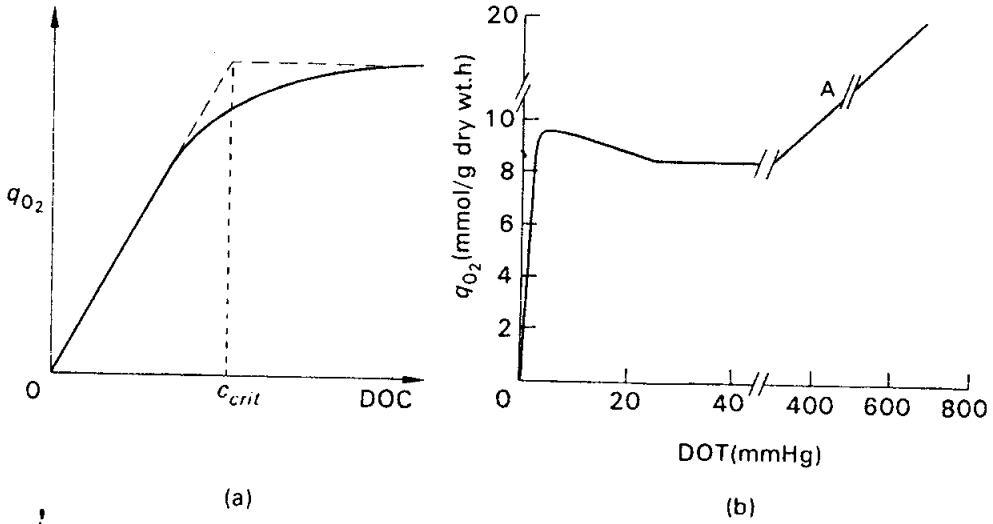
$$\mu = \mu_m p_l/(p_l+K_p) \qquad 11.5$$

สมการนี้เป็นสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับ p_l เมื่อออกซิเจนเป็นซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต **Johnson** (1967 b) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง c ต่อ μ สำหรับ **Candida utilis** เมื่อใช้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าคล้อยตามความสัมพันธ์ของ **Michaelis-Menten** โดยมีค่า $K_s = 1{\cdot}3 \times 10^{-6}$ M นั่นก็คือ $K_p = 0{\cdot}91$ mmHg อัตราการหายใจมักถูกพิจารณาว่าเป็นอิสระจากความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายเมื่ออยู่เหนือค่าวิกฤต c_{crit} ซึ่งถูกกำหนดได้ดังในรูปที่ 11.2 a

ค่าของ c_{crit} อาจเทียบเป็นค่าความเครียดออกซิเจนได้ว่า p_{crit} และเป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ สำหรับจุลินทรีย์เซลล์เดียวในของเหลวเคยถูกรายงานว่ามีค่า p_{crit} สูงถึง 10 **mmHg (Harrison et al., 1969)**

อิทธิพลของออกซิเจนที่มีความดันสูงคือมีความดัน $>0{\cdot}21$ atm หรือ 159 **mmHg** ต่ออัตราการหายใจของจุลินทรีย์ได้เคยถูกตรวจสอบโดย **Maclennan** และคณะ (1971) ด้วยเชื้อซูโดโมแนดที่เจริญเติบโตอยู่ในเมทานอล ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11.2 b แสดงว่าค่า DOT ตั้งแต่ 30 จนถึงประมาณ 400 **mmHg** ทำให้อัตราการหายใจคงที่แต่ที่

ประมาณ 500 mmHg ค่า q_{O_2} มีการกวัดแกว่งแสดงว่าการเมตาโบลิซึมไม่อาจถูกควบคุมให้คงที่ได้ แต่ที่เหนือจาก 560 mmHg ค่า q_{O_2} เพิ่มขึ้นตาม DOT อย่างน่าพิศวง เนื่องจากพืชผลหรือประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวล ($Y_{x/O}$) มีค่าสูงสุดที่ DOT ต่ำกว่า 100 mmHg จึงดูเหมือนว่าที่ค่า DOT > 100 mmHg และโดยเฉพาะที่ค่า > 560 mmHg พลังงานเพื่อการทำนุบำรุงถูกทำให้เพิ่มขึ้นทั้งนี้เพื่อเอาชนะความเป็นพิษของออกซิเจน Maclennan และคณะ (1971) ได้ชี้แสดงให้เห็นว่าบางทีอาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องในกลไกของเซลล์ตลอดทั้งช่วงของ DOT ที่เปลี่ยนแปลง จุดซึ่งอาจเป็นข้อผิดพลาดแต่เก่าก่อนคือการศึกษาที่จำกัดขอบเขตอยู่เพียงแค่การเปรียบเทียบผลของการมีหรือไม่มีออกซิเจนเท่านั้น



รูปที่ 11.2 Effects of dissolved oxygen concentration on respiration rate (q_{O_2}): (a) relation between q_{O_2} and dissolved oxygen concentration (DOC) and definition of c_{crit}; (b) the response shown by a chemostat culture of *Pseudomonas* species ($\mu = 0{\cdot}1\ h^{-1}$) with methanol as carbon source. About 'A' the q_{O_2} oscillated (from data of Maclennan *et al.*, 1971)

11.4 อิทธิพลของสภาวะในการเจริญเติบโตต่ออัตราการหายใจของเซลล์พักตัว

การวัดอัตราการหายใจของเซลล์พักตัวหรือเซลล์ที่ไม่ได้อยู่ในขณะเจริญเติบโตได้เคยถูกใช้เป็นตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์ที่มีคุณค่ายิ่งต่อการเมตาโบลิซึม รายละเอียดเกี่ยวกับสภาวะในการเจริญเติบโตที่มีผลต่ออัตราการหายใจของเซลล์พักตัวยังไม่ได้รับ

ความสนใจมากนักแต่ก็ได้เป็นที่ประจักษ์แล้วว่าผลดังกล่าวอาจใหญ่หลวงมาก การเสื่อม-สลายและการเปลี่ยนแปลงในระบบเอนไซม์อาจเริ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะที่การเจริญเติบโตหยุดลง (Fensom & Pirt, 1972) แต่เพื่อกันไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมากนักเซลล์จึงควรถูกถ่ายออกมาจากถังหมักแล้วใส่ลงสู่เครื่องวัดการหายใจ(respirometer) อย่างรวดเร็ว อัตราการหายใจของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกจำกัดคาร์บอนจะมากเซลล์ที่ถูกจำกัดไนโตรเจน (Tempest et al., 1967) จากผลการทดลองของ Tempest และ Herbert (1965) และ Harrison และ Loveless (1971 a) พบว่าค่า q_{O_2} ของเซลล์พักตัวจะเพิ่มขึ้นตามอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งเซลล์ ผลเช่นนี้แสดงว่าคาตาโบลิกเอนไซม์และเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการหายใจของชีวมวลยังคงถูกควบคุมอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต

ค่า q_{O_2} ของเซลล์แบคทีเรียพักตัวอาจได้รับผลกระทบเป็นอย่างมากจากความเครียดออกซิเจนที่ละลายในขณะเจริญเติบโต สำหรับ **Escherichia coli** มีค่า q_{O_2} สูงสุดเมื่อเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงไว้โดยมีออกซิเจนเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต แต่ที่ขัดแย้งกันคือ **Klebsiella aerogenes** กลับมีค่า q_{O_2} สูงที่สุดเมื่อมีการเจริญเติบโตอยู่ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจน (Harrison & Loveless, 1971a)

11.5 อิทธิพลของความเครียดออกซิเจนที่ละลายต่อปริมาณคาตาโบลิกเอนไซม์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ

สิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต(eucaryote) และแบคทีเรียบางชนิดมีไซโตโครม (cytochrome) เป็นเส้นทางสุดท้ายของขบวนการออกซิเดชั่นเพื่อนำไปสู่ออกซิเจน ในแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างเช่น พวก lactobacillaceae จะมีเส้นทางนำไปสู่ออกซิเจนที่ซับซ้อนกว่าโดยผ่าน flavoprotein Harrison (1972) พบว่าเอนไซม์ออกซิเดสที่อยู่ในลำดับสุดท้ายของ **Klebsiella aerogenes** คือ ไซโตโครม เอ$_2$ จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 200 เท่าเมื่อลดค่า **DOT** ลงจาก 5.3 **mmHg**ถึง <0·4 mmHg แต่ปริมาณของไซโตโครม บี และโอ ได้รับผลกระทบเพียงเล็กน้อยจากค่าของ **DOT** ในเชื้อ **Candida** ไซโตโครม บี และซี แสดงปริมาณสูงสุดเมื่อมีค่า **DOT** ประมาณ 1 **mmHg** และไซโตโครม เอ แสดงประมาณ

สูงสุดเมื่อมีค่า DOT <0.1 mmHg (Moss et al.,1969)

Carter & Bull(1969)พบว่าปริมาณของเอนไซม์บางชนิดในเส้นทางไกลโคไลติกและเฮกโซสโมโนฟอสเฟตในเชื้อ Aspergillus nidulans ถึงจุดสูงสุดเมื่อมีค่า DOT ต่ำกว่า 30 mmHg

11.6 การเปลี่ยนแปลงระหว่างแอโรบิคและแอนแอโรบิคเมตาโบลิซึมสำหรับพวกกึ่งแอนแอโรบ

การเปลี่ยนแปลงจากการเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิค (anaerobic) ไปเป็นแบบแอโรบิค (aerobic)มักมีการกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์หลายอย่างแตกต่างกันแต่การสังเคราะห์เอนไซม์ที่ต้องการเพื่อการเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิคจะถูกสกดไว้ (Wimpenny, 1969) ในบรรดาเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์โดยสภาวะที่มีอากาศ (aerobiosis) คือองค์ประกอบต่าง ๆ ในเส้นทางของไซโตรโครมรวมทั้งยูบิควิโนนและเอนไซม์ในวงจรกรดซิตริก แต่ในขณะเดียวกันการสังเคราะห์เอนไซม์ฟอร์มิกไฮโดรเจน-ไลเอสจะถูกสกดไว้

เมื่ออยู่ในสถานะจำกัดออกซิเจนขบวนการเมตาโบลิซึมของพวกกึ่งแอนแอโรบ (facultative anaerobe) เช่น K. aerogenes สามารถใช้การเมตาโบลิซึมทั้งแบบแอโรบิคและแอนแอโรบิคร่วมกัน ที่พีเอชค่อนไปทางกรดแบคทีเรียนี้ภายใต้สภาพการจำกัดออกซิเจนจะผลิต 2, 3-butanediol และคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาเป็นพิเศษจากน้ำตาลกลูโคส แต่เมื่อมีออกซิเจนมากเหลือเฟือจะยับยั้งการผลิตสารดังกล่าวและภายใต้สภาพแอนแอโรบิคจะมีการสะสมอีทานอลได้เท่า ๆ กันกับการสะสมบูทานีไดออล(Pirt & Callow, 1958a)

Harrisonและ Pirt (1967) ได้พยายามตรวจสอบค่า DOT ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากแอโรบิคเมตาโบลิซึมไปเป็นแอนแอโรบิคเมตาโบลิซึมที่เกิดขึ้นในเชื้อ K. aerogenes ซึ่งเจริญเติบโตอยู่ในน้ำตาลกลูโคส พบว่าเมื่อค่า DOT ต่ำลงมาอยู่ในช่วงระหว่าง 5 ถึง 15 mmHgค่า q_{O_2} จะเป็นอิสระจาก DOT แต่เมื่อ DOT มีค่าต่ำลง

ต่อไปอีกจะกระตุ้นให้อัตราการหายใจเพิ่มขึ้นอย่างกระทันหันถึงประมาณ 30% สิ่งนี้นำไปสู่การถวัดแกว่งระหว่างค่า DOT กับ q_{O_2} ดังนั้นความไม่แน่นอนในการควบคุม q_{O_2} ด้วยค่า DOT จึงเป็นสัญญาณแรกที่บ่งบอกถึงการจำกัดออกซิเจนในเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังเจริญเติบโต

ผลการทดลองของ Harrison และ Loveless, 1971b) แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ต้องการใช้เพื่อการเปลี่ยนแปลงจากการเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิคในสถานะมั่นคงไปเป็นการเจริญเติบโตแบบแอโรบิคในสถานะมั่นคงของเชื้อ K. aerogenes หรือ E. coli ต้องใช้เวลาเป็นสองเท่าของระยะเวลาในการทวีคูณ แต่สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่กลับกันจากสภาพแอโรบิคไปเป็นสภาพแอนแอโรบิคจะต้องใช้เวลาประมาณสามเท่าของระยะเวลาในการทวีคูณ

11.7 ผลจากความเครียดออกซิเจนที่ละลายต่อการทำงานที่นอกเหนือจากการหายใจ

การมีชีวิตอยู่ของอะซีติกแอสิดแบคทีเรียถูกพบว่าต้องการให้มีออกซิเจนปรากฏอยู่เสมอ ถ้าทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้ที่กำลังเจริญเติบโตขาดออกซิเจนเป็นระยะเวลาเพียงเล็กน้อยแค่หนึ่งนาทีเท่านั้นก็เป็นสาเหตุทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ตายลงไปเป็นจำนวนมาก (Hromatka, 1952)

Feren และ Squires(1969)พบว่าเพื่อรักษาระดับการผลิตสูงสุดของสารปฏิชีวนะ Cephalosporin C จากเชื้อรา Cephalosporium จะต้องทำให้มีค่า DOT ไม่ต่ำกว่า 20 mmHg แต่ค่า DOT วิกฤตสำหรับการหายใจของเชื้อรานี้คือ 8 mmHgระบบที่ใช้ในการตรวจสอบผลของความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายต่อการเกิดผลผลิตสารปฏิชีวนะและเมตาโบไลทุติยภูมิอื่น ๆ (secondary metabolite) นั้นมีไม่มากนัก นิยามความรู้เกี่ยวกับผลกระทบจาก DOT บางครั้งก็อาจได้รับความรู้จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีในสถานะมั่นคงเท่านั้น

การผลิตเมลานินรงควัตถุที่ไม่ละลายน้ำในไมซีเลี่ยมของ Aspergillus nidulans ถูกพบว่ามีปริมาณสูงสุดเมื่อมีค่า DOT > 30 mmHgแต่ที่ค่าDOT < 30 mmHg รงควัตถุ

เดียวกันนี้จะอยู่ในรูปที่เป็นสารละลายน้ำได้และถูกขับออกมานอกเซลล์โดยมีปริมาณสูงสุด เมื่อมีค่าDOT 18 mmHg(Rowley & Pirt, 1972) การผลิต diphtheria toxin โดย corynebacteria จะมีปริมาณสูงสุดเมื่อมีค่า DOT จาก <0·1 mm ถึง 100 mmHg แต่ค่า DOT ที่สูงกว่านี้จะยับยั้งการผลิตสารพิษนี้ (Righelate & Van Hemert, 1969) ส่วนประกอบของลิปิดใน Candida utilis ก็ขึ้นอยู่กับค่า DOT ในขณะเจริญเติบโต การลดลงของค่า DOT จาก 5 ถึง<1 mmHg จะลดสัดส่วนของกรดไขมัน C_{18}:C_{16} และลดระดับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน (Brown & Rose,1969) การลดความไม่อิ่มตัวอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจาก linolenic acid ซึ่งมี 3 คับเบิลบอนด์ถูกแทนที่ด้วย oleic acid ซึ่งมีหนึ่งดับเบิลบอนด์ (Babij et al.,1969) Harrison และคณะ(1960)รายงานว่าการผลิตรงควัตถุสีเหลืองลักษณะคล้าย flavin โดย Klebsiella aerogenes มีการเพิ่มขึ้นตามค่า DOT ที่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงระดับอย่างน้อย 450 mmHg ผลกระทบต่าง ๆ เหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามีความน่าสนใจในการที่จะศึกษาถึงผลจากความเครียดออกซิเจนที่ความดันสูง (hyperbaric oxygen tension) ต่อการเกิดผลผลิต

11.8 การใช้สิ่งอื่นทดแทนแกสออกซิเจน

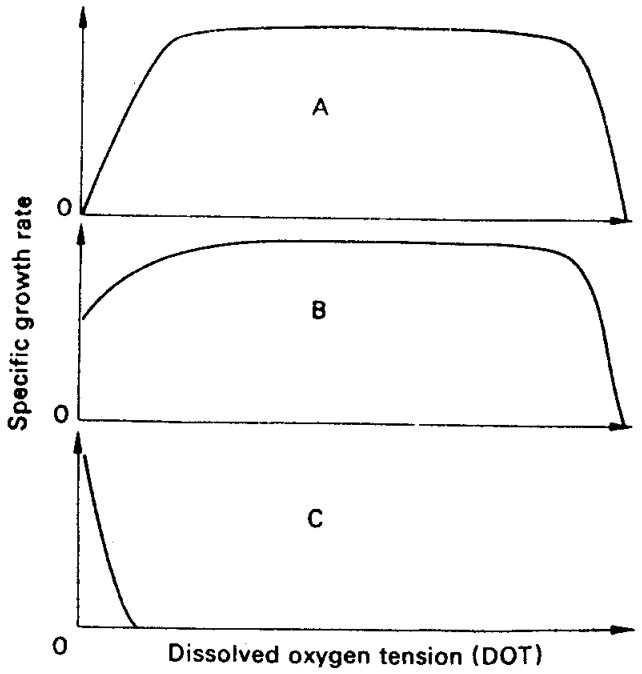
ออกซิเจนอาจถูกให้แก่เชื้อจุลินทรีย์ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขบวนการเช่นนี้เป็นผลเนื่องมาจากการกระตุ้นให้มีเอนไซม์คาตาเลสจำนวนมากเกิดขึ้นในเชื้อจุลินทรีย์ (Herbert & Phipps,1974) ในกรณีที่ปราศจากแกสออกซิเจน nitrate, ferricyanide, tetrathionate และสารประกอบอินทรีย์ที่อาจถูกรีดิวส์ได้เช่น methylene blue และ tetrazolium อาจถูกใช้เป็นสิ่งรับอีเล็คตรอนในขั้นสุดท้ายได้ แต่แกสออกซิเจนก็สามารถยับยั้งปฏิกริยาที่เซลล์ใช้สิ่งอื่นรับอีเล็คตรอนแทนแกสออกซิเจนได้ การรีดักชั่นไนเตรตของ Klebsiella ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนก็คล้ายคลึงกันกับการรีดักชั่นของออกซิเจนคือมีการควบคุมกับการผลิต ATP โดยมีปริมาณสัมพันธ์(stoichiometry คือ $NO_3^- \rightarrow NO_2^- + 3$ ATP (Hadjipetrou & Stouthamer,1965) ขบวนการนี้แตกต่างจากที่ใช้ออกซิเจนคือเอนไซม์ในวงจรกรดซิตริกถูกยับยั้งจนกระทั่งน้ำตาลกลูโคสถูกออกซิไดซ์ไปได้เพียงแค่เป็นอะซีเตตเท่านั้น ส่วนการใช้เฟอร์ริไซยาไนด์ (ferricyanide)

แทนออกซิเจนของเชื้อ **Klebsiella** เอนไซม์ในวงจรกรดซิตริกไม่ถูกยับยั้ง น้ำตาลกลูโคสจึงถูกออกซิไดซ์ไปได้อย่างสมบูรณ์แต่การรีดักชั่นของเฟอร์ริไซยาไนด์จะไม่คู่ควบกับการผลิต ATP (Hadjipetrou et al.,1966) ดังนั้นการเจริญเติบโตของ **Klebsiella** ในน้ำตาลกลูโคสที่มีเฟอร์ริไซยาไนด์ปรากฏอยู่จึงขึ้นอยู่กับ ATP ที่เกิดขึ้นจากขบวนการไกลโคลีสิส ทั้งไนเตรตและเฟอร์ริไซยาไนด์ก็คล้ายกันกับออกซิเจนคือยังยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ฟอร์มิกไฮโดรไลเอส (formic hydrogenlyase)

11.9 การยับยั้งการเจริญเติบโตโดยแก๊สออกซิเจน

มีวิธีการเพียงไม่กี่อย่างที่ใช้วัดระดับการยับยั้งของออกซิเจนที่ละลาย อย่างไรก็ตามแสดงว่าสิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีระดับความต้องการ DOT ซึ่งถ้าสูงเกินไปจากที่กำหนดจะเป็นพิษและยับยั้งการเจริญเติบโต รูปแบบการตอบสนองต่อออกซิเจนของจุลินทรีย์ได้แสดงไว้ในรูปที่ 11.3 สำหรับพวกแอนแอโรบ (anaerobe) พบว่าออกซิเจนที่ทุกค่าของ DOT จะยับยั้งการเจริญเติบโต (รูปที่ 11.3) สำหรับพวกกึ่งแอนแอโรบ (facultative anaerobe) ซึ่งถูกจำแนกโดยความสามารถในการเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน คำว่าไมโครแอโรฟิลิก (microaerophilic) อาจใช้ได้กับพวกแอโรบหรือกึ่งแอนแอโรบที่อาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วยค่า DOT ต่ำกว่า 0.21 บรรยากาศ (atm) หรือต่ำกว่าส่วนความดันของออกซิเจนในอากาศ 1 บรรยากาศ แต่สำหรับจุลินทรีย์ที่ถูกจัดเป็นพวกแอโรบหรือพวกที่ต้องการออกซิเจนอาจถูกยับยั้งได้ด้วยค่า DOT ที่ความดันสูง (hyperbaric) คือ > 0.21 บรรยากาศ การศึกษาถึงผลกระทบของออกซิเจนที่มีความดันสูงส่วนใหญ่มักศึกษาโดยการควบคุมความเครียดออกซิเจนในวัตภาคแก๊สมากกว่าควบคุม DOT ในสื่อกลางการหมัก การศึกษาเช่นนี้ไม่สามารถลงความเห็นเกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่าง DOT กับผลกระทบต่อการเจริญเติบโตได้จนกว่าจะมีการป้องกันไว้ก่อนเพื่อทำให้แน่ใจว่าการลดลงของค่า DOT อันเนื่องมาจากการใช้ออกซิเจนนั้นไม่มีความสำคัญ เมื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโตสำหรับโคโลนีของ **Escherichia coli** โดยมีการป้องกันไว้ก่อนดังกล่าวข้างต้นภายใต้สภาวะจำกัดน้ำตาลกลูโคสบนผิวรุ้นพบว่าการเจริญเติบโตของ **E. coli** ถูกยับยั้งได้ด้วยค่า DOT ที่ 1 บรรยากาศ (Pirt,1967) ผลจากการทดลองของ **Wiseman**

และคณะ(1966)ได้ชี้แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของ **Pseudomonas** , **Escherichia** และ **Staphylococcus** ถูกยับยั้งได้ด้วยความเครียดออกซิเจนที่ประมาณ 1 บรรยากาศ การเจริญเติบโตของ **Penicillium chrysogenum** ถูกยับยั้งได้ด้วยค่า DOT ที่ 1.5 บรรยากาศ และในถังหมักที่มีการปั่นกวนความเครียดออกซิเจนที่สูงเช่นนี้ทำให้รูปพรรณ-สัณฐานของไฮฟ่าผิดปกติไป จะเห็นได้ว่าค่า DOT ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตสำหรับจุลินทรีย์พวกแอโรบอันเนื่องมาจากการเป็นพิษของออกซิเจนนั้นต่ำมากจึงง่ายที่จะเกิดขึ้นได้ในถังหมักระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ซึ่งลึกมากโดยเฉพาะเมื่อมีการอัดดันแกสเข้าไปภายในช่องว่างตอนบน (**head space**)ของถังหมักร่วมด้วย



รูปที่ 11.3 Responses of microbial growth rate to dissolved oxygen tension (DOT): A, aerobic organism, B, facultative anaerobe; C, anaerobic organism.

กลไกการเป็นพิษของออกซิเจนในระดับโมเลกุลยังไม่มีใครทราบแน่ชัด มีสมมุติฐานหลายอย่างที่ได้ถูกเสนอเพื่ออธิบายถึงเหตุผลที่เกิดขึ้นแต่ก็ยังไม่มีสมมุติฐานที่อาจใช้ร่วมเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันได้ สมมุติฐานอย่างหนึ่งคือการเป็นพิษของออกซิเจนอันเนื่องมาจากการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ ปรากฏการณ์เช่นนี้พบได้ในเชื้อ **Streptococcus faecalis** (**Seeley & Vandemark, 1951**) แต่ไฮโดรเจน-

เปอร์ออกไซด์ก็อาจถูกกำจัดออกได้และการเป็นพิษอาจถูกทำให้หมดไปได้โดยการกระทำของเอนไซม์คาตาเลสและเปอร์ออกซิเดสที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นโดยมีเปอร์ออกไซด์ปรากฏอยู่ สมมุติฐานที่สองคือออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญโดยตรงโดยการรวมตัวกันกับเอนไซม์หรือออกซิไดส์เอนไซม์ สมมุติฐานที่สามคือออกซิเจนออกซิไดส์โคเอนไซม์ เช่นเฟอร์ริดอกซินจึงเป็นการยับยั้งโคเอนไซม์เหล่านี้

11.10 การเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิค

11.10.1 วิธีการหมักแบบแอนแอโรบิค

จุลินทรีย์พวกที่เป็นแอนแอโรบอย่างถูกมักถูกจัดเป็นจุลินทรีย์ซึ่งถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วยออกซิเจนที่ทุกระดับของ DOT อากาศภายใต้ความดันของบรรยากาศสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เหล่านี้ได้อย่างสมบูรณ์และบางชนิดก็ถูกทำให้ตายไปได้

สภาพแอนแอโรบิคอาจถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยกรรมวิธีการต่าง ๆ ซึ่งอาจเป็นที่แน่นอนหรือไม่แน่นอนก็ได้ (Hobson, 1969; Hungate, 1969; Willis, 1969) การแทนที่อากาศด้วยไนโตรเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปราศจากแก๊สออกซิเจนก็อาจเพียงพอในการทำให้เกิดสภาพแอนแอโรบิค แต่ในหลายกรณีก็ต้องมีคาร์บอนไดออกไซด์บางส่วน (5%) ปะปนอยู่ในวัตถุดิบแก๊สด้วยส่วนผสมของไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์มีความเหมาะสมที่จะใช้ภายในโหลแอนแอโรบิค (anaerobic jar) ซึ่งออกซิเจนที่ตกค้างอยู่ภายในโหลอาจถูกกำจัดออกได้ด้วยตาลิสท์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจน สภาพแอนแอโรบิคยังอาจถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยวิธีการเติมสารรีดิวซ์ลงไปในสื่อกลางอาหาร เช่น **cysteine, sodium sulphide, sodium thioglycollate, sodium dithionite** และ **ascorbic acid** แต่โดยทั่วไปมักนิยมใช้ **cystein** และ **sodium sulphide** สื่อกลางอาหารธรรมชาติบางชนิดเช่นเนื้อต้ม (**cooked meat**) จากซับสเตรตที่เหมาะสมก็อาจใช้ได้เนื่องจากมีสารรีดิวซ์ต่าง ๆ ปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก การหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์พวกกึ่งแอนแอโรบล่วงหน้ามักนิยมใช้เพื่อทำให้เกิดสภาพแอนแอโรบิคสำหรับการหมักด้วย

เชื้อจุลินทรีย์พวกมีเทนแบคทีเรีย (Hobson, 1969)

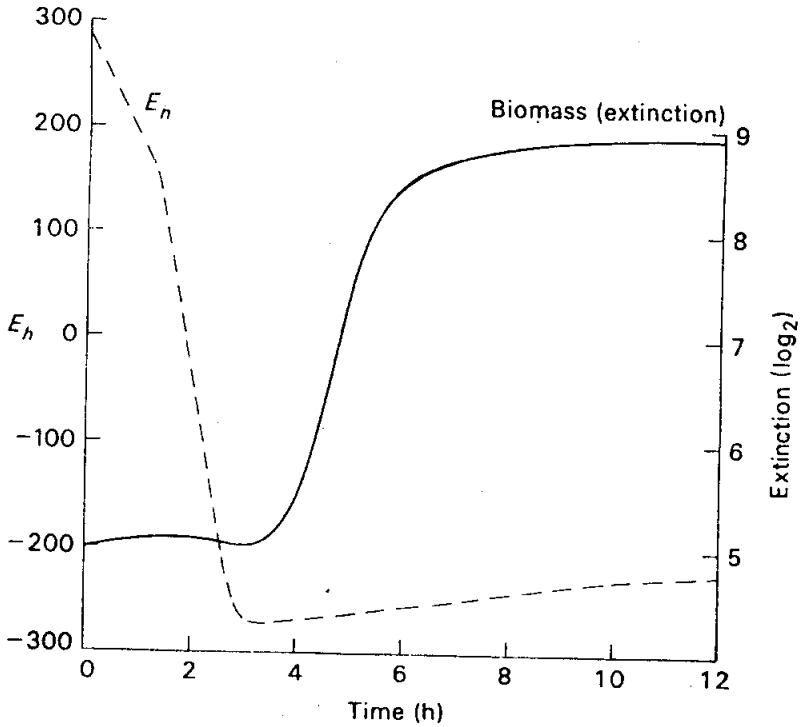
ระดับของการเป็นสภาพแอนแอโรบิคมักถูกตรวจสอบโดยการวัดค่า E_h สีพวกรีดอกไดย์อาจถูกใช้ใส่ลงไปในสื่อกลางอาหารเพื่อจุดประสงค์นี้ สี **resazurin** (10^{-4} g/l) มักถูกใช้เป็นตัวชี้ค่า E_h อยู่เสมอ ค่า E_o สำหรับการเปลี่ยนแปลงสีชมพูของ **resazurin** ไปเป็นไม่มีสีคือ −51mV ที่ pH7 และ 30° C สภาวะซึ่งไม่มีสีของ **resazurin** จะเกิดขึ้นที่ค่า E_h ประมาณ −100mV จึงถูกถือว่าเป็นสภาพแอนแอโรบิค

11.10.2 ขอบเขตจำกัดของค่า E_h เพื่อการเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิค

ขอบเขตจำกัดสูงสุดของค่า E_h เพื่อการเจริญเติบโตของแอนแอโรบได้ถูกตรวจสอบเป็นครั้งแรกโดย **Knight** และ **Fildes** (1930) จากการสังเกตุความสัมพันธ์ระหว่างค่า E_h และระยะเวลาในการงอกของสปอร์สำหรับเชื้อ **Clostridium tetani** พบว่ามีขอบเขตจำกัดสูงสุดของค่า E_h ที่ 50 ถึง 100mV **Aubel** และคณะ(1964) พบว่าขอบเขตจำกัดสูงสุดของค่า E_h เพื่อการเจริญเติบโตของ **Cl. sporogenes** หรือ **Cl. saccharobutyricum** อยู่ที่ประมาณ −100mV อย่างไรก็ตามค่า E_h เริ่มต้นอาจสูงถึง + 180 mV แต่แล้วก็จะมีระยะล่าหลัง (**lag**) ในการเจริญเติบโตที่ยาวนานพอจนกระทั่งจุลินทรีย์สามารถลดค่า E_h ลงได้เองถึง −100mV ความทนทานต่อค่า E_h เริ่มต้นถูกพบว่าอาจลดลงได้ตามการลดลงของขนาดของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ (**inoculum size**) นอกจากนี้ของเหลวใสจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ถูกพบว่าสามารถทำให้ลดขนาดต่ำสุดของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตด้วยค่า E_h เริ่มต้นที่ 180 mV ลงได้ ผลการทดลองของ **Aubel** และคณะ(1946)แสดงว่าพวก **clostridia** มีกลไกเพื่อลดค่า E_h ของสื่อกลางอาหารได้

ขอบเขตจำกัดต่ำสุดของค่า E_h ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้มีการให้อากาศเป็นลักษณะอย่างหนึ่งของเชื้อจุลินทรีย์(Jacob,1970) ในเชื้อ **Bacillus subtilis** ค่า E_h ซึ่งสัมพันธ์กันกับไฮโดรเจนอีเล็คโตรดมาตราฐานอาจตกลงมาจาก 400 mV เมื่อเริ่มต้นใส่เชื้อจุลินทรีย์เป็น 200mV ในเชื้อ **Staphylococcus aureus** ค่า E_h ตกลงจาก 400 เป็น 50 mV และในเชื้อ **Proteus vulgaris** และ

Escherichia coli ค่า E_h ตกลงจาก + 400 เป็น − 300 mV จึงแตกต่างจากเชื้อ **Clostridium paraputrificum** ซึ่งลดค่า E_h ลงมาจากประมาณ + 300 เป็น − 300 mV แต่การเปลี่ยนแปลงค่านี้เกิดขึ้นในระหว่างระยะเวลาล่าหลังก่อนการเจริญเติบโต (รูปที่ 11.4) ผลเช่นนี้แสดงว่าแบคทีเรียพวกกึ่งแอนแอโรบที่อาศัยอยู่ในช่องท้อง (facultative enterobacteria) สามารถลดค่า E_h ลงจนถึงค่าที่ยอมให้พวกแอนแอโรบที่เข้มงวดเจริญเติบโตได้



รูปที่ 11.4 Change in E_h and biomass growth (extinction) in culture of *Clostridium paraputrificum* in liver broth. (Redrawn from Jacob, 1970; permission of Academic Press).

11.10.3 ขอบเขตจำกัดสูงสุดของความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายเพื่อการเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิค

Gordon และคณะ (1953) ได้ตรวจสอบความทนทานต่อส่วนความดันออกซิเจนในวัตภาคแกสบนสื่อกล่างอาหารแข็งผสมเลือดที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์พวก clostridia บางชนิด พบว่าขอบเขตจำกัดสูงสุดของออกซิเจนสำหรับเชื้อ **Clostridium welchii** คือ 30 ถึง 80 mmHg และ 1 ถึง 2 mmHg สำหรับเชื้อ

Cl. tetani , Cl. botulinum และ **Cl. oedimatiens** ความเครียดออกซิเจนในสื่อกลางอาหารอาจต่ำกว่าในวัตภาคแกสเนื่องจาก **clostridia** บางชนิดอย่างน้อยก็มีกลไกเพื่อใช้ออกซิเจนได้ **Bromel** และ **Teodoro** (1966) แสดงให้เห็นว่า **Cl. sporogenes** มีค่า q_{O_2} เป็น 30 **ml oxygen/(g dry weight h)** เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรต การหายใจของ **clostridia** เช่นนี้อาจถือว่าเป็นกลไกของเซลล์เพื่อลดค่า **DOT** และทำให้ค่า E_h อยู่ในระดับซึ่งยอมให้มีการเจริญเติบโตของตนได้ ขอบเขตจำกัดสูงสุดของค่า E_h หรือ **DOT** ซึ่งยอมให้มีการเจริญเติบโตอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการกำจัดออกซิเจนออกจากสื่อกลางอาหารและทำให้เกิดสภาพแอนแอโรบิค ดังนั้นจุลินทรีย์พวกแอนแอโรบที่แท้จริงส่วนใหญ่จึงอาจถูกถือได้ว่าเป็นพวกซึ่งไม่มีกลไกในการใช้ออกซิเจนแบบนี้

Harrison และ **Pirt** (1967) พบว่าในระหว่างการเจริญเติบโตแบบแอนแอโรบิคของ **Klebsiella aerogenes** ทำให้ความเครียดออกซิเจนที่ละลายต่ำเกินกว่าที่จะวัดได้คือ <0·1 mmHg

การตรวจสอบความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายในเชื้อแบบแอนแอโรบิคจากค่า E_h อาจทำได้โดยวิถีทางดังต่อไปนี้ สมมุติให้ค่า E_h ของสารละลายอิ่มตัวด้วยออกซิเจนที่ความเครียดออกซิเจน 0.21 บรรยากาศคือ 400 **mV (Jacob, 1970)** และถือว่าค่า E_h ลดลงเป็นจำนวน 60 **mV** ต่อทุก ๆ 1 หน่วยของ **logDOT** ที่ลดลงด้วย (ดูตอนที่ 9.5.2) ดังนั้นถ้าค่า E_h ลดลงจาก + 400 ไปเป็น −140 **mV** ก็จะสอดคล้องกันกับการลดลงเป็นจำนวน 9 หน่วยของ **logDOT** ดังนั้นค่า **DOT** จึงควรเท่ากับ 0.21×10^{-9} บรรยากาศ การลดลงของค่า **DOT** เช่นนี้หมายความว่าความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายที่ 25° C ควรลดลงจาก 0.25×10^{-3} **M** ไปเป็น 0.25×10^{-12} **M** ที่ความเข้มข้นออกซิเจนครั้งหลังนี้จำนวนโมเลกุลของออกซิเจนต่อมิลลิลิตรควรเป็น $N \times 0{\cdot}25 \times 10^{-15}$ ซึ่ง N คือ **Avogadro's Avogadro's number** (6×10^{23}) ดังนั้นจำนวนโมเลกุลของออกซิเจนต่อมิลลิลิตรจึงเท่ากับ 1.5×10^{8} ฉนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าที่ค่า E_h ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นลักษณะการเมตาโบลิซึ่มแบบแอนแอโรบิคสำหรับแบคทีเรียถึงแม้จะยังคงมีออกซิเจนโมเลกุลอยู่เป็นจำนวนมากแต่แบคทีเรียบางชนิดหรือส่วนใหญ่ก็สามารถรอดพ้นจากผลกระทบของออกซิเจนได้ทั้งหมด ข้อขัดแย้งเช่นนี้

ชี้แสดงให้เห็นว่าพวกแอนแอโรบอาจมีความต้องการออกซิเจนแต่เป็นออกซิเจนที่มีความเครียดต่ำเท่านั้น.