บทที่ 18
เชื้อจุลินทรีย์ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำหรือเป็นศูนย์

18.1 พฤติกรรมเมื่อเชื้อจุลินทรีย์หยุดเจริญเติบโต

เมื่อการเจริญเติบโตหยุดลง เชื้อจุลินทรีย์จะเข้าสู่ระยะที่เรียกว่าหยุดนิ่ง **(Stationary phase)** ระยะหยุดนิ่งที่แท้จริงเกิดขึ้นได้เมื่อสารอาหารหมดไปหรือมีการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารเคมีหรือด้วยความเค้นทางกายภาพ ระยะถดถอย **(decline phase)** ถูกจำแนกลักษณะได้จากการสลายตัวโดยอัตโนมัติ **(autolysis)** และการลดน้อยถอยลงของชีวมวลระยะถดถอยนี้อาจเริ่มขึ้นภายในลังจากที่เชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะหยุดนิ่งหรืออาจเกิดขึ้นอย่างทันทีทันใดหลังจากที่การเจริญเติบโตหยุดลง

ไม่ว่าจะด้วยเหตุผลกลใดก็ตามการเจริญเติบโตของเซลล์ร่างกายเมื่ออยู่ในระยะหยุดนิ่งจะมีความไม่แน่นอน การหยุดเจริญเติบโตดูเหมือนว่าจะทำให้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของจุลินทรีย์เริ่มต้นขึ้นอย่างทันทีทันใดในลำดับต่อมา การสลายตัวโดยอัตโนมัติในระยะถดถอยเป็นการสำแดงอย่างรุนแรงเนื่องจากความไม่แน่นอนของจุลินทรีย์ภายหลังจากที่การเจริญเติบโตหยุดลง พฤติกรรมของจุลินทรีย์ในระยะหยุดนิ่งบางทีอาจไม่เปลี่ยนแปลงไปในแบบฉบับเดียวกันแต่ค่อนข้างเปลี่ยนแปลงไปในหลายแบบฉบับซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตหรือสภาวะยับยั้ง

เนื่องจากโดยทางทฤษฎีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกกำหนดให้เกิดขึ้นที่ค่าใด ๆ ก็ได้ แต่จะต้องมีค่าซึ่งมากกว่าศูนย์ขึ้นไปจึงก่อให้เกิดปัญหาว่าที่ค่าซึ่งใกล้กับศูนย์มาก ๆ อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะจะต้องอยู่ในช่วงก่อนหน้าที่จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์แสดงลักษณะพฤติกรรมของระยะหยุดนิ่งหรือไม่ หรืออยู่ในช่วงที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์แสดงพฤติกรรมของระยะหยุดนิ่งอย่างแท้จริงแล้วโดยเริ่มต้นที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตหนึ่งโดยเฉพาะ ปัญหานี้จะได้พิจารณากันต่อไปในตอนที่ 18.4

18.2 ระยะหยุดนิ่งของแบคทีเรีย

18.2.1 ลักษณะโดยทั่วไป

เมื่อเริ่มต้นระยะหยุดนิ่งขนาดของเซลล์แบคทีเรียจะอยู่ในขั้นต่ำสุด แต่เมื่ออยู่ในช่วงท้ายของระยะหยุดนิ่งหรือเริ่มเข้าสู่ระยะถดถอยเซลล์มักจะบวมหรือเสียรูปร่างไปจึงถูกเรียกว่ารูปแบบที่ไม่ตั้งใจ (involution forms) ลักษณะเช่นนี้บางครั้งก็อาจเป็นผลเสียหายเนื่องจากไลติคเอนไซม์ซึ่งกระทำต่อผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์อย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจเกิดขึ้นเนื่องจากขาดการควบคุมที่ดีเกี่ยวกับขบวนการสังเคราะห์ตกค้างในองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ การสูญเสียความสามารถในการรักษาลักษณะการติดสีแบบแกรมปกติมักถูกแสดงออกโดยแบคทีเรียแกรมบวกในระยะหยุดนิ่ง เช่นเดียวกันกับความทนทานของแบคทีเรียต่อความเค้นทางเคมีและทางกายภาพหลายรูปแบบอันเนื่องมาจากตัวอย่าง เช่น สื่อกลางอาหารที่เป็นไฮโปโทนิค การตัดเฉือน (shear) การทำให้เย็นโดยทันทีทันใดและการทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้น ในระยะหยุดนิ่งเซลล์แบคทีเรียจะมีความทนทานมากกว่าในระยะที่มีการเจริญเติบโตแบบลอการิทมิค ข้อแตกต่างเหล่านี้ชี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของจุลินทรีย์ในสองระยะนี้มีความแตกต่างกัน แบคทีเรียบางหมู่การสร้างเอนโดสปอร์หรือเอ็กโซสปอร์เป็นสิ่งที่ใช้ชี้แสดงถึงลักษณะของระยะหยุดนิ่ง แม้แต่ในพวกที่ไม่มีการสร้างสปอร์เมื่อถึงระยะหยุดนิ่งก็มีหลักฐานทางเซลล์วิทยาเกี่ยวกับการเกิดไมโครซีสต์ (microcyst) อันเป็นรูปแบบที่ทนทานและพักตัวของแบคทีเรียได้ (Bisset, 1950)

18.2.2 เมตาโบลิซึม

ลักษณะอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ที่ไม่เจริญเติบโตคือการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (Thurston, 1972) การสูญเสียเอนไซม์นี้อาจมีสาเหตุมาจากการผันเวียนโปรตีนซึ่งถูกเร่งให้เร็วขึ้นอย่างทันทีทันใดจากระดับ 0.5% หรือต่ำกว่าในแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโตไปเป็น 5% ต่อชั่วโมงเมื่อการเจริญเติบโตหยุดลง (Mandelstam, 1960) อย่างไรก็ตามเอนไซม์บางชนิดดูเหมือนว่าจะสูญหายไปได้อย่างรวดเร็วกว่าอัตราความเร็วในการผันเวียนโปรตีน (Thruston, 1972)

เมตาโบลิซึมภายในเซลล์แบคทีเรียที่ไม่เจริญเติบโตถูกใช้เป็นลักษณะเพื่อจำแนกประเภทหรือชนิดของแบคทีเรีย (Dawes & Ribbons, 1964) เมื่อถูกทำให้อดอยาก แบคทีเรียแกรมบวกที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวภายใต้สภาพแอโรบิคจะออกซิไดซ์เพ็บไทด์และกรดอะมิโนกองกลางไปพร้อมกันกับการสะสมคาร์โบไฮเดรต แตกต่างจาก **Escherichia coli** จะออกซิไดซ์ไกลโคเจนที่สะสมไว้เป็นอันดับแรกแล้วต่อมาจึงออกซิไดซ์สารเพ็บไทด์ถึงแม้ว่าปริมาณทั้งหมดของกรดอะมิโนอิสระจะยังคงมีอยู่อย่างคงที่ก็ตาม

18.2.3 ความสามารถในการยังชีพ (Viability)

เมื่อเซลล์แบคทีเรียถูกทำให้แขวนลอยอยู่ในสื่อกลางอาหารเหลวแต่ขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตแบคทีเรียก็จะตายไปเป็นลำดับ และถ้าถูกทำให้อดตายด้วยการขาดแคลนแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงานเมื่อเติมแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงานลงไปจะช่วยเร่งอัตราการตายของแบคทีเรียให้เร็วยิ่งขึ้น ปรากฏการณ์เช่นนี้ถูกเรียกว่า "การตายที่ถูกเร่งด้วยซับสเตรต" (Postgate & Hunter, 1964, Strange & Dark, 1965) ผลกระทบเช่นนี้อาจถูกยับยั้งได้ด้วยการเติม cyclic AMP จำนวนเล็กน้อยลงไป (Calcott & Postgate, 1972)

ชีวมวลที่ถูกทำให้มีเครื่องหมายแสดงตัวด้วย ^{14}C ได้ถูกใช้เพื่อชี้แสดงให้เห็นว่าการเติมคาร์บอนซับสเตรตลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสาหร่ายหรือเชื้อรา หรือยีสต์แขวนลอยอยู่จะกระตุ้นการสลายตัวของซับสเตรตภายในเซลล์ (Moses & Syrett, 1955; Miles & Pirt, 1969) กิจกรรมเช่นนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการตายที่ถูกเร่งด้วยซับสเตรต

การส่งเสริมความสามารถในการยังชีพของสเตร็บโตคอกไซที่แขวนลอยอยู่ในน้ำโดยไม่มีการเจริญเติบโตอาจถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยแม็กนีเซี่ยมไอออน (Thomas & Batt, 1968) นอกจากนี้การมีสารประกอบสะสมพลังงานปรากฏอยู่ก็สามารถช่วยยืดอายุการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ให้ยืนยาวออกไปได้ (Strange et al., 1961)

18.3 ระยะหยุดนิ่งของพังไจ

18.3.1 เมื่อปราศจากแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงาน

Trinic และ **Righelato** (1970) ได้ชักนำให้เกิดระยะฉุดถอยหรือระยะสลายตัวอัตโนมัติขึ้นกับเชื้อรา **Penicillium chrysogenum** โดยหยุดให้น้ำตาลกลูโคสแก่เชื้อราในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคง พบว่าการสลายตัวอัตโนมัติจะเริ่มขึ้นโดยไม่มีการรีรอล่าหลัง (lag) ซึ่งอาจถูกบ่งชี้ได้จากการลดลงของน้ำหนักไมซีเลี่ยมแห้งด้วยอัตราความเร็วคงที่ 8% ต่อชั่วโมง โปรตีนและอาร์เอนเอจะลดลงด้วยอัตราความเร็วเริ่มต้นประมาณ 5% ต่อชั่วโมง แต่ต่อมาภายหลังจาก 6 ชั่วโมงไปแล้วอัตราความเร็วในการสูญเสียก็จะลดลง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดสำหรับ 48 ชั่วโมงแรกแต่ต่อมาภายหลังก็จะลดลงประมาณ 0.5% ต่อชั่วโมง ดีเอนเอมีการลดลงอย่างน่าพิศวงประมาณ 75% ใน 12 ชั่วโมงแรกแล้วต่อมาก็จะยังคงมีอยู่อย่างค่อนข้างคงที่ มีหลักฐานแสดงว่าเบสของกรดนิวคลีอิกมีการสะสมอยู่ในสื่อกลาง อาหารไฮฟ่าส่วนใหญ่ก็ว่างเปล่าปราศจากไซโตพลาสซึ่มมีเหลืออยู่แต่ผนังไฮฟ่าและเยื่อหุ้มต่าง ๆ สะสมอยู่เข้าใจว่าเยื่อหุ้มเหล่านี้เป็นเยื่อหุ้มของอวัยวะต่าง ๆ ภายในเซลล์ ภายหลังจากที่เชื้อรามีอายุ 5 วันไฮฟ่าปกติสองสามชิ้นก็ยังคงมีปรากฏอยู่แต่ไม่มีโคนิเดียเกิดขึ้นจึงแตกต่างจากกรณีที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสให้อย่างช้า ๆ (ตอนที่ 18.3.2) ในการหมักแบบเก็บกักที่จำกัดน้ำตาลกลูโคสการสลายตัวอัตโนมัติจะเริ่มขึ้นเมื่อระยะการเจริญเติบโตแบบชยาบถูกทำให้สิ้นสุดลงด้วยการทำให้แหล่งพลังงานหมดไปอย่างทันทีทันใด

18.3.2 เมื่อมีการให้พลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

ผลกระทบจากการจำกัดน้ำตาลกลูโคสที่ให้ไว้เป็นสะเปียงกรังในการหมักแบบคงที่ทางเคมีของ **Penicillium chrysogenum** ได้ถูกศึกษาโดย **Righelato** และคณะ (1968) การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ถูกจำกัดน้ำตาลกลูโคสตลอดช่วง 12 ชั่วโมงแรก โปรตีน อาร์เอนเอ และดีเอนเอจะถูกทำให้สลายตัวอย่างกว้างขวาง ต่อมาโปรตีนในไมซีเลี่ยมก็จะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ส่วนอาร์เอนเอและดีเอนเอจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาอีก

และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเกินกว่าปริมาณตั้งต้น คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเพิ่มขึ้นด้วยปริมาณเพียงเล็กน้อย ผลหารในการหายใจลดลงจาก 0.97 เป็น 0.72 จึงคิดว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างใหญ่หลวงเกิดขึ้นในขบวนการออกซิเดทีฟเมตาโบลิซึม ภายหลังจาก 24 ชั่วโมงไฮฟ่าในของเหลวจะสร้างโคนิเดียอย่างรวดเร็วด้วยอัตราความเร็วคงที่และสถานะภาพเช่นนี้จะถูกรักษาไว้ต่อไปอีกเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 120 ชั่วโมง

ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีของเชื้อ Aspergillus nidulans เมื่อการเจริญเติบโตถูกทำให้หยุดลงด้วยการจำกัดน้ำตาลกลูโคสพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเชื้อรานี้ก็คล้ายคลึงกันกับที่สังเกตุเห็นได้จาก P. chrysogenum เว้นแต่โคนิเดียจะไม่ถูกสร้างขึ้น (Bainbridge et al., 1971) จึงสรุปได้ว่าการหยุดลงของการเจริญเติบโตในเชื้อราโดยจำกัดแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนอาจเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างลึกซึ้งของไมซีเลี่ยมและอาจมีผลทำให้เกิดโคนิเดียได้ในบางโอกาส

18.4 อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำสุด

ด้วยพื้นฐานจากการทดลองเกี่ยวกับการหมักแบบคงที่ทางเคมีเสนอว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตอย่างมั่นคงไม่อาจถูกรักษาไว้ได้ที่ค่าต่ำกว่าค่าจำกัดต่ำสุดอันหนึ่ง)Pirt, 1972b) Tempest และคณะ(1967)ได้ศึกษาอย่างมีระบบเกี่ยวกับผลกระทบจากการลดอัตราความเร็วในการเจือจางลงไปจนถึงค่าที่ต่ำมากอันหนึ่งในการหมักที่จำกัดกรีเซอรอลของเชื้อ Klebsiella aerogenes พบว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะเกือบจะมีค่าต่ำสุดที่ 0.009 h^{-1} (t_d=80 h) แต่อัตราความเร็วสูงสุดในการเจริญเติบโตเฉพาะจะมีค่าประมาณ 1.0 h^{-1} (t_d=0·69 h) ในการหมักที่จำกัดแอมโมเนียอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเกือบจะมีค่าต่ำสุดที่ 0.007 h^{-1} เนื่องจากถ้าอัตราความเร็วในการเจือจางมีค่าน้อยกว่า 0.2 h^{-1} เซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่ไม่มีชีวิตจึงต้องนำจำนวนเซลล์เหล่านี้มาใช้ในการคิดคำนวนเกี่ยวกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามแบบอย่างดังกล่าวไว้แล้วในตอนที่ 7.2.2 การดำรงค์ชีพของเซลล์ในกรณีนี้ยังเป็นที่สงสัยเนื่องจากเซลล์สามารถปรากฏอยู่ในลักษณะเป็นเซลล์พักตัวสงบเงียบได้

นั่นก็คือเซลล์พวกที่ไม่เจริญเติบโตในการหมักแบบนี้จะปรากฏว่ายังมีชีวิตอยู่เมื่อนำมาตรวจสอบในจานเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโตที่ได้จากการตรวจสอบในจานเลี้ยงเชื้อจึงมากเกินกว่าที่ควรจะเป็นไปตามความจริงและอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะต่ำสุดก็ต่ำเกินกว่าที่ควรจะเป็นไปตามความจริง ที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่ำกว่า 0.06 h^{-1} ทั้งปริมาณอาร์เอนเอและดีเอนเอของชีวมวลจะลดลงอย่างรวดเร็วตามอัตราความเร็วในการเจือจางและปรากฏว่าพลังงานที่ใช้เพื่อการทำนุบำรุงก็ลดน้อยลงด้วย (Pirt, 1972b) จากการสังเกตุนี้แสดงว่าคุณสมบัติบางอย่างของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะประมาณ 0.06

Koch และ **Coffman** (1970) ได้ศึกษาการหมักแบบคงที่ทางเคมีของเชื้อ **Escherichia coli** ด้วยอัตราความเร็วในการเจือจาง 0.029 h^{-1} ปรากฏว่าประชากรเซลล์แบคทีเรียประกอบด้วยสองพวกแตกต่างกันตามความสามารถในการชักนำให้สร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตไซเดส ประมาณสองในสามของประชากรทั้งหมดอาจถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์นี้ได้อย่างสมบูรณ์เป็นปกติได้ภายใน 10 นาที แต่อีกหนึ่งในสามของประชากรต้องใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงจึงจะสามารถชักนำให้สมบูรณ์ได้ แตกต่างจากการใช้อัตราความเร็วในการเจือจางที่ 0.09 h^{-1} ประชากรเซลล์แบคทีเรียจะไม่แสดงความแตกต่างกันเช่นนี้และเอนไซม์ก็ถูกชักนำให้เกิดขึ้นได้ภายใน 10 นาที

จากการสังเกตุถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่าง ๆ ของ **Klebsiella** และ **Escherichia** ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำกว่า 0.06 h^{-1} (6% ของ μ_m) ถูกตั้งเป็นสมมุติฐานว่าประชากรส่วนหนึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์พักตัวซึ่งถูกจำแนกลักษณะได้จากการหยุดเจริญเติบโตชั่วคราว มีปริมาณอาร์เอนเอและดีเอนเอต่ำสุด (ประมาณ 6% และ 2% ของชีวมวลแห้งตามลำดับ) พลังงานที่ใช้เพื่อการทำนุบำรุงจะอยู่ในระดับต่ำสุดหรือเป็นศูนย์ และมีการรีรอล่าหลังในการถูกชักนำให้ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตไซเดส การตรวจสอบอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะที่แท้จริงที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำจำเป็นต้องตรวจสอบส่วนของประชากรที่พักตัวแยกออกจากส่วนของประชากรที่ยังมีการเจริญเติบโตตามปกติจึงเป็นเรื่องที่ยุ่งยากมาก การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์พักตัวไม่ทำให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำสุดเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากได้รับ

การทดแทนจากส่วนของประชากรที่ยังคงเจริญเติบโตได้

18.5 ธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหวในการสร้างสปอร์ของบาซิลลัส

การสร้างเอนโดสปอร์ของบาซิลลัสปกติมักเกิดขึ้นได้ในระยะหยุดนิ่งของการหมักแบบเก็บกัก อย่างไรก็ตามจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีได้แสดงให้เห็นว่าการสร้างสปอร์มีความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต (**Dawes & Thornley,** 1970) แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ **Dawes** และ **Thornley** (1970) ที่ใช้เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวในการสร้างสปอร์จะได้กล่าวถึงดังต่อไปนี้

สมมุติว่าในการหมักมีปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเรียงเป็นลำดับดังต่อไปนี้ **(i)** การเพิ่มจำนวนแบบขยายของเซลล์ร่างกาย **(ii)** การเริ่มต้นสร้างสปอร์ **(iii)** การแก่สุกของสปอร์ **(iv)** การงอกของสปอร์ที่แก่สุกเพื่อทำให้เกิดเซลล์ร่างกายขึ้นมาใหม่ และถือว่าเมื่อได้เริ่มต้นสร้างสปอร์ขึ้นมาแล้วจุลินทรีย์จะต้องดำเนินการต่อไปอย่างสมบูรณ์เป็นลำดับจนกระทั่งได้สปอร์ที่แก่สุก ถ้าให้ X หมายถึงจำนวนเซลล์ร่างกาย Y หมายถึงจำนวนสปอร์ที่เริ่มต้น และ Z หมายถึงจำนวนสปอร์ที่แก่สุก ขบวนการทั้งสี่ขั้นตอนอาจถูกแทนค่าได้เป็นลำดับดังต่อไปนี้

$$(i)\ X \rightarrow 2X,\ (ii)\ X \rightarrow Y,\ (iii)\ Y \rightarrow Z,\ (iv)\ Z \rightarrow X$$

ถือว่าขบวนการที่ **(i)**, **(ii)** และ **(iv)** เป็นปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งด้วยอัตราความเร็วคงที่ μ, K และ α ตามลำดับ ให้ n, y และ ζ เป็นจำนวนเซลล์ร่างกายต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร จำนวนสปอร์ที่เริ่มต้นต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรตามลำดับและให้ t_m เป็นระยะเวลาจากการเริ่มต้นสร้างสปอร์จนกลายเป็นสปอร์ที่แก่สุก

ในการหมักแบบเก็บกักด้วยช่วงระยะเวลาอันสั้น dt การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ร่างกายต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรถูกกำหนดได้โดย

$$\text{net increase} = \text{growth} - \text{spores initiated} + \text{spores germinated}$$

นั่นก็คือ

$$dn = \mu n.dt - Kn.dt + \alpha\zeta.dt \qquad 18.1$$

ดังนั้น

$$dn/dt = (\mu - K)n + \alpha\zeta \qquad 18.2$$

ถ้าอัตราความเร็วในการงอกของสปอร์ $\alpha\zeta$ มีค่าน้อยเมื่อเทียบกับ $(\mu - K)n$ จะได้ว่า

$$dn/dt \approx (\mu - K)n \qquad 18.3$$

ดังนั้นการเจริญเติบโตจึงเป็นแบบขยาย (exponential) ด้วยอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะปรากฏ $(\mu - K)$

สำหรับการหมักแบบคงที่ทางเคมีความสมดุลย์ในการเพิ่มขึ้นของเซลล์ร่างกายถูกกำหนดได้โดย

$$\begin{matrix}\text{net growth} \\ \text{rate}\end{matrix} = \begin{matrix}\text{growth} \\ \text{rate}\end{matrix} - \begin{matrix}\text{initiation} \\ \text{rate}\end{matrix} - \begin{matrix}\text{washout} \\ \text{rate}\end{matrix} + \begin{matrix}\text{germination} \\ \text{rate}\end{matrix}$$

นั่นก็คือ

$$dn/dt = \mu n - Kn - Dn + \alpha\zeta \qquad 18.4$$

ดังนั้น

$$dn/dt = (\mu - K - D)n + \alpha\zeta \qquad 18.5$$

ความสมดุลย์สำหรับสปอร์เริ่มต้น คือ

$$\text{net initiation rate} = \text{initiation rate} - \text{maturation rate} - \text{washout rate}$$

นั่นก็คือ

$$dy/dt = Kn - Kn_{(t-t_m)}\, e^{-Dt_m} - Dy \qquad 18.6$$

เมื่อ $n_{(t-t_m)}$ คือจำนวนเซลล์ร่างกายที่ปรากฏเมื่อเวลา $(t - t_m)$ ในช่วงระหว่างเวลา t_m สปอร์เริ่มต้นบางส่วนจะถูกล้างออกไปแต่ส่วนของสปอร์เริ่มต้นที่เวลา $(t - t_m)$ ซึ่งยังคงเหลือตกค้างอยู่จะกลายเป็นสปอร์ที่แก่สุกคือ e^{-Dt_m} (ตอนที่ 5.4) ความสมดุลย์สำหรับสปอร์ที่แก่สุกคือ

$$\text{net increase rate} = \text{maturation rate} - \text{washout rate} - \text{germination rate}$$

นั่นก็คือ

$$d\zeta/dt = Kn_{(t-t_m)}\, e^{-Dt_m} - D\zeta - \alpha\zeta \qquad 18.7$$

สถานะมั่นคงเกิดขึ้นได้เมื่อ $dn/dt = dy/dt = d\xi/dt = 0,\ n_{t-t_m} = \tilde{n}$ ดังนั้นสมการที่ 18.5, 18.6 และ 18.7 เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงจึงกลายเป็น

$$(\mu - K - D)\tilde{n} + \alpha\tilde{\xi} = 0 \qquad 18.8$$

$$K\tilde{n}(1-\epsilon) - D\tilde{y} = 0 \qquad 18.9$$

$$K\tilde{n}\epsilon - (D+\alpha)\tilde{\xi} = 0 \qquad 18.10$$

ซึ่ง $\epsilon = e^{-Dt_m}$ สมมุติว่าสามารถวัดสัดส่วน θ ของสปอร์ที่แก่สุกต่อประชากรทั้งหมด (N) ได้ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงจะได้ว่า

$$\tilde{\theta} = \tilde{\xi}/\tilde{N} = \tilde{\xi}/(\tilde{n} + \tilde{y} + \tilde{\xi}) \qquad 18.11$$

สมการที่ 18.8, 18.9, 18.10 และ 18.11 อาจเปลี่ยนแปลงได้เป็น

$$K = \frac{D\tilde{\theta}(D+\alpha)}{D(\epsilon - \tilde{\theta}) - \alpha\tilde{\theta}(1-\epsilon)} \qquad 18.12$$

$$\mu = D + K\{1 - \alpha\epsilon/(D+\alpha)\} \qquad 18.13$$

$$\tilde{n} = \tilde{N}/\left\{\frac{K}{D}(1-\epsilon) + 1 + \frac{1}{\alpha}(K + D - \mu)\right\} \qquad 18.14$$

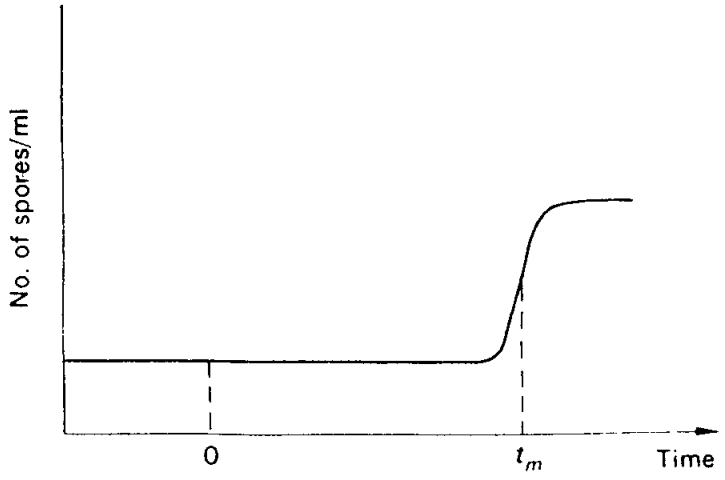
$$\tilde{\xi} = K\tilde{n}t/(D+\alpha) \qquad 18.15$$

$$\tilde{y} = \tilde{N} - \tilde{n} - \tilde{\xi} \qquad 18.16$$

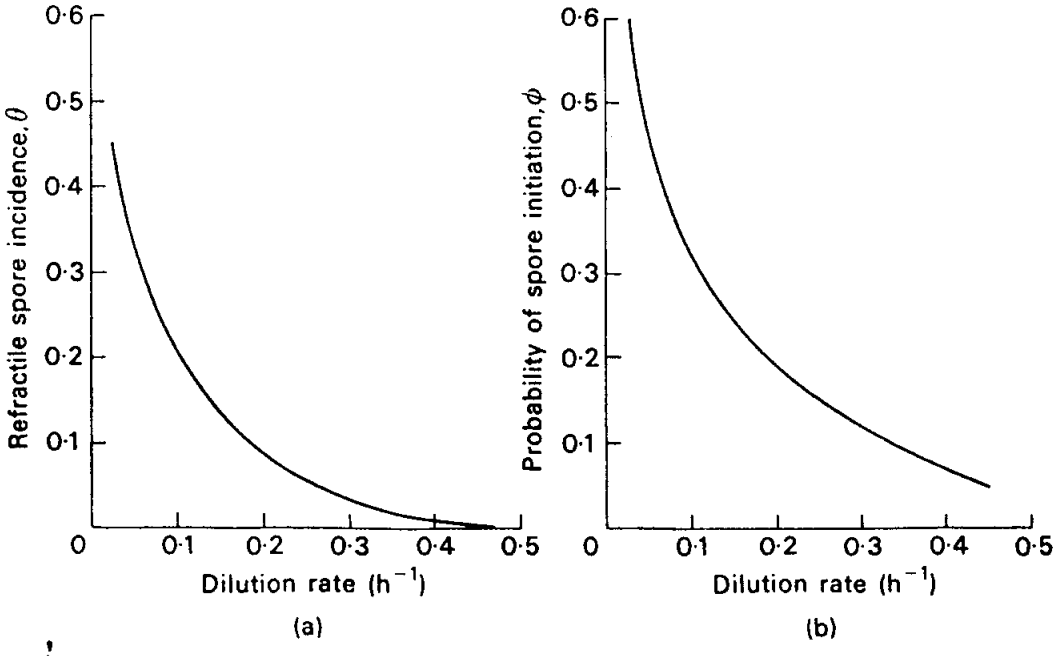
จึงเป็นไปตามแบบจำลองคือความถี่ในการเกิดสปอร์เท่ากับ Kn และความถี่ในการเกิดเซลล์ร่างกายคือ μn เนื่องจากมีเพียงแค่สองสถานะการณ์นี้เท่านั้นที่เซลล์ร่างกายสามารถดำเนินการต่อไปได้ ดังนั้นความน่าจะเป็นในการเกิดสปอร์เริ่มต้นจึงถูกกำหนดได้โดย

$$\phi = Kn/(\mu n + Kn) = K/(\mu + K) \qquad 18.17$$

Dawes และ **Thornley** (1970) ได้ทดสอบทฤษฎีนี้จากการสร้างสปอร์ของ **Bacillus subtilis** ในการหมักแบบคงที่ทางเคมี อัตราความเร็วในการงอกของสปอร์ (α) ถูกตรวจสอบจากสปอร์ตัวอย่างที่คัดแยกได้พบว่ามีค่าประมาณ $0.05\ h^{-1}$ ที่ 37° ซ ค่าสำหรับช่วงระยะเวลาแก่สุกของสปอร์ t_m ได้ถูกตรวจสอบใหม่อีกจากการหมักแบบคงที่ทางเคมี เมื่ออัตราความเร็วในการเจือจางลดลงอัตราความเร็วเริ่มต้นในการสร้างสปอร์จะเพิ่มขึ้น ดังนั้นหลังจากช่วงระยะเวลา t_m ต่อมาจำนวนสปอร์จึงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 18.1) ระยะเวลาแก่สุกของสปอร์บาซิลลัสที่ 37° ซ ถูกพบว่าเท่ากับ 4 ชั่วโมง อัตราความเร็วในการเริ่มต้น



รูปที่ 18.1 Chemostat method of determining spore maturation time, t_m (Dawes & Thornley, 1970). At time zero the dilution rate is decreased so as to step up the spore initiation rate. After time, t_m there is a step up in the number of spores.



รูปที่ 18.2 (a) Proportion (θ) of mature spores and (b) probability (ϕ) of spore initiation in chemostat culture of *Bacillus subtilis*, glucose-limited at 37°C. (Redrawn from Dawes & Thornley, 1970)

สร้างสปอร์ K เป็นความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามสมการ $K=0{\cdot}091-0{\cdot}143\mu$ สัดส่วนของสปอร์และความน่าจะเป็นในการเริ่มต้นสร้างสปอร์ของเซลล์แบคทีเรียได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 18.2 ตัวเลขจากการทดลองพบว่ามีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดีตามแบบจำลอง

Dawes และคณะ (1969) ยังได้แสดงให้เห็นจากลักษณะการแจกแจงของจำนวนสปอร์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ ของพัฒนาการสำหรับการหมักแบบคงที่ทางเคมี พบว่าระยะเวลาแต่ละขั้นตอนตามพัฒนาการถูกกำหนดได้โดย

$$\tau_{i-1} = t_m - \frac{1}{D}\ln\left(\frac{y_i}{y_r}\right) \qquad 18.18$$

ซึ่ง y_i = เศษส่วนจำนวนเซลล์ในระยะ X_i y_r = เศษส่วนจำนวนเซลล์ที่แสดงให้เห็นว่ามีสปอร์ซึ่งหักเหแสงได้อยู่ภายใน และ τ_{i-1} = ระยะเวลาภายหลังจากการเริ่มต้นเพื่อเริ่มระยะ X_i การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียมีความสำคัญต่อการเป็นตัวอย่างแสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจนในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้.