บทที่ 20
การหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม
(Mixed Cultures)

20.1 <u>คำนำ</u>

เชื้อจุลินทรีย์ผสมหมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน พฤติกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีความสำคัญต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในดิน ในน้ำ ในการทำให้เกิดโรคและการเน่าเสีย นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ผสมยังมีความสำคัญต่อการผลิตอาหารหมักดองและการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น กรดแอสพาร์ติค เป็นต้น (Hotta & Takao, 1973) ด้วยหลักการเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ผสมทำให้สามารถทำนายถึงผลลัพธ์ในการปะปนของเชื้อจุลินทรีย์หรือการคัดเลือกตัวผ่าเหล่าประเภทใดประเภทหนึ่งได้ เนื่องจากความซับซ้อนในพฤติกรรมของจุลินทรีย์ผสมแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เกี่ยวกับขบวนการต่าง ๆ จึงมีความสำคัญต่อการบรรยายและทำนายถึงพฤติกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ผสม

ในบทนี้ส่วนใหญ่จะได้กล่าวถึงแบบฉบับที่อาจเป็นไปได้ของพฤติกรรมสำหรับสองสายพันธุ์ในการหมักที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ส่วนการเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน เช่น การเจริญเติบโตเป็นโคโลนีบนสื่อกลางอาหารแข็ง (ดังในบทที่ 23) ก็มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น

ผลลัพธ์ขั้นสุดท้ายของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจแตกต่างจากการหมักแบบเก็บกักเป็นอย่างมาก ในการหมักแบบเก็บกักแต่ละสายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนชีวมวลของตนได้ด้วยอัตราความเร็วที่ถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมทางเคมีและกายภาพ จนกว่าสายพันธุ์หนึ่งจะทำให้เกิดปัจจัยที่หยุดยั้งการเจริญเติบโตของอีกสายพันธุ์หนึ่งหรือมีการกัดกินกันเกิดขึ้น แตกต่างจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีทุกสายพันธุ์ที่มีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะน้อยกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางจะลดจำนวนลงและท้ายที่สุดก็ถูก

กำจัดออกไปจากถังหมักจนหมดสิ้น

สภาวะพื้นฐานที่ใช้ในการรักษาไว้ให้จุลินทรีย์สองสายพันธุ์อยู่ด้วยกันได้ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกจำแนกได้ดังในตารางที่ 20.1 ทุกสภาวะมีสภาพร่วมกันอย่างหนึ่งคือมีอัตราความเร็วในการเจือจางต่ำกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤติของแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามในที่นี้จะพิจารณาถึงเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงเท่านั้น การกวัดแกว่งเกี่ยวกับค่าที่สถานะมั่นคงอาจเกิดขึ้นได้และถูกทำนายได้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

คำต่าง ๆ เช่น คอมเมนซาลิซึ่ม ซิมไบโอซิส และพาราซิทิซึ่มบางครั้งก็ใช้เพื่อบ่งบอกถึงประเภทต่าง ๆ ของการกระทำต่อกันระหว่างสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามมีข้อเหลื่อมล้ำกันมากในความหมายของคำเหล่านี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้เรียกเป็นชื่อของสภาวะพื้นฐานในการกระทำต่อกันต่าง ๆ ที่ได้กำหนดไว้ในตารางที่ 20.1

ตารางที่ 20.1 Basic conditions for the maintenance of two microbial species in a chemostat culture

I	With same growth-limiting substrate
	a. When specific growth rates coincide
	b. When the faster growing species is inhibited by its own product
	c. When a product of the faster growing species activates growth of the other species
II	With different growth-limiting substrates
	a. When the different growth-limiting substrates are fed into the culture
	b. When a product of one species is the growth-limiting substrate for the other
	c. When there is a prey-predator relationship

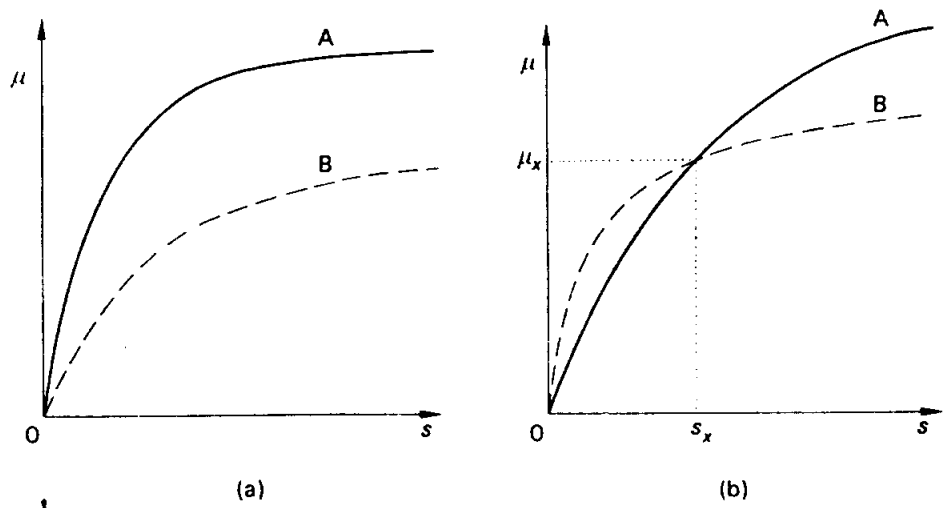
Note: In any system the dilution rate must be less than the critical dilution rate for both species.

20.2 จุลินทรีย์ผสมที่มีการแข่งขันเพื่อให้ได้รับซับสเตรตอย่างเดียวกัน

20.2.1 การแข่งขันกันอย่างอิสระ

ผลลัพธ์ในการแข่งขันระหว่างสองสายพันธุ์เพื่อยื้อแย่งกันใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตอย่างเดียวกันถูกกำหนดได้โดยอิทธิพลหนึ่งความเข้มข้นของซับสเตรต

ที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (s) ต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (μ) ของแต่ละสายพันธุ์ ถ้าความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับ s ของแต่ละกรณีเหมือนกันจะไม่มีการแข่งขันกันแต่บางครั้งความสัมพันธ์อาจแตกต่างกันในวิถีทางใดวิถีทางหนึ่งดังแสดงในรูปที่ 20.1



รูปที่ 20.1 The possible relations between the specific growth rate (μ) and growth-limiting substrate concentration (s) of two species A and B: (a) without crossover, (b) with crossover.

ในการหมักแบบเก็บกักโดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตสูงมากเมื่อเทียบกับค่า K_s แต่ละสายพันธุ์จะเจริญเติบโตด้วยอัตราความเร็วสูงสุดของตนจนกระทั่งซับสเตรตถูกดูเสมือนว่าหมดไป แต่ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีมีความแตกต่างกันคือภายหลังจากที่ระยะหัวเลี้ยวหัวต่อแรกผ่านพ้นไปแล้วจุลินทรีย์ที่มีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงกว่าจะเข้าแทนที่จุลินทรีย์อื่นในสื่อกลางการหมัก ถ้าความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับ s มีจุดตัดกันดังแสดงในรูป 20.1b ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีสายพันธุ์ใดจะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าก็ขึ้นอยู่กับอัตราความเร็วในการเจือจาง ดังนั้นที่จุดตัดกันซึ่ง $\mu=\mu_x=D_x$ และ $\bar{s}=s_x$ ทั้งสองสายพันธุ์จึงสามารถถูกรักษาไว้ให้อยู่ร่วมกันได้ด้วยการหมักแบบคงที่ทางเคมี จากสมการที่แสดงออกถึง μ (สมการที่ 3.21)จะได้ว่า

$$s_x = (\mu_{m(b)}K_a - \mu_{m(a)}K_b)/(\mu_{m(a)} - \mu_{m(b)}) \qquad 20.1$$

ซึ่ง $\mu_{m(a)}$ และ $\mu_{m(b)}$ คืออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะสูงสุดของแต่ละสายพันธุ์ตามลำดับ K_a และ K_b คือค่าความอิ่มตัวคงที่สำหรับสายพันธุ์ A และ B ตามลำดับ

ดังนั้นในการแข่งขันกันอย่างอิสระภายใต้การหมักแบบคงที่ทางเคมีจุลินทรีย์สองสายพันธุ์อาจถูกเพาะเลี้ยงไว้รวมกันได้อย่างมั่นคง เมื่อจุลินทรีย์ทั้งสองมีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะร่วมกันที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่งของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตซึ่งถูกใช้ด้วยกัน ดังเช่นการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่จุดตัดในความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับ s ดังรูปที่ 20.1

ตัวอย่างของจุดตัดในความสัมพันธ์ดังกล่าวด้วยการหมักแบบคงที่ทางเคมีได้รับรายงานเป็นครั้งแรกจาก Meers (1971) พบว่าการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่จำกัดแม็กนีเซี่ยมของ Bacillus subtilis และ Candida utilis ที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่ำประมาณ 0.08 h^{-1} เชื้อ Candida จะเข้าแทนที่ Bacillus แต่ที่อัตราความเร็วในการเจือจางสูง Bacillus จะแทนที่ Candida อย่างไรก็ตามก็ยังมีผลกระทบเนื่องมาจากขนาดของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์คือ ถ้าเชื้อ Bacillus ถูกเติมลงไปด้วยความเข้มข้น $<10^8$ / ml พบว่าเชื้อ Bacillus ไม่ว่ากรณีใด ๆ จะถูกกำจัดออกไป ผลกระทบเนื่องจากขนาดของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์อาจอธิบายได้จากความต้องการของ Bacillus ในการขับผลผลิตบางอย่างออกมาเพื่อกระตุ้นการใช้แม็กนีเซี่ยมไอออนแต่ผลผลิตนี้จะมีความเข้มข้นไม่เพียงพอถ้ามีความหนาแน่นของแบคทีเรียต่ำ (Meers & Tempest, 1968)

20.2.2 การแข่งขันที่ถูกควบคุม

ด้วยสภาวะตามแบบที่ 1 ของตารางที่ 20.1 สองสายพันธุ์ซึ่งใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเดียวกันถูกเพาะเลี้ยงไว้ร่วมกันในการหมักแบบคงที่ทางเคมี ถ้าสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า (คือสายพันธุ์ A) ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วยผลผลิตของตนเอง (รูปที่ 20.2) จึงถือว่าผลผลิตของสายพันธุ์ A ยับยั้งการใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ A แบบแข่งขัน และให้ p คือความเข้มข้นของผลผลิต ดังนั้นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งด้วยผลผลิต (ดูตอนที่ 17.2) จึงถูกกำหนดได้โดย

$$\mu_a = \mu_{m(a)}s/(s+\alpha K_a) \qquad 20.2$$

ซึ่ง $\alpha=(1+p/K_i)$ แต่อีกสายพันธุ์หนึ่งจะได้ว่า

$$\mu_b = \mu_{m(b)}s/(s+K_b) \qquad 20.3$$

ถ้า $\mu_a>\mu_b$ เมื่อ $p=0$ แต่โดยการเพิ่มขึ้นของ p ก็มีทางเป็นไปได้ว่า $\mu_a=\mu_b$ ที่ค่า s เดียวกัน ดังนั้นจึงทำให้ทั้งสองสายพันธุ์อาจถูกรักษาไว้ให้อยู่ร่วมกันได้ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเดียวกันและระบบก็เป็นแบบควบคุมตนเอง การควบคุมทำนองเดียวกันนี้ก็ควรใช้ได้เช่นเดียวกันถ้าผลผลิตนั้นเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบบไม่แข่งขัน

ภายใต้สภาวะตามแบบที่ 1 c ของตารางที่ 20.1 สองสายพันธุ์ยื้อแย่งเพื่อให้ได้ใช้ซับสเตรตเดียวกันถูกรักษาไว้ด้วยกันในการหมักแบบคงที่ทางเคมีแต่สายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า (คือสายพันธุ์ A) ผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ B (ดูรูปที่ 20.2) จากความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับ s อาจเขียนเป็นสมการสำหรับสายพันธุ์ A ได้ว่า

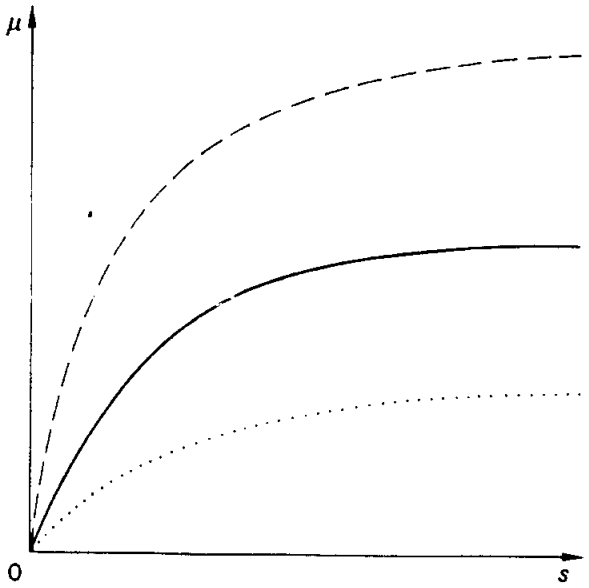
$$\mu_a = \mu_{m(a)}s/(s+K_a) \qquad 20.4$$

และสมการสำหรับสายพันธุ์ B คือ

$$\mu_b = \beta\mu_{m(b)}s/(s+K_b) \qquad 20.5$$

ซึ่ง β คือฟังก์ชั่นที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของผลผลิตที่กระตุ้นการเจริญเติบโต (p) ดังได้บรรยายไว้แล้วในตอนที่ 17.9 คือว่า $p=0, \beta=1$ และ $\mu_b<\mu_a$ การเพิ่มขึ้นของ p จะทำให้ค่า β เพิ่มขึ้นด้วยจนกระทั่งในที่สุด $\mu_b=\mu_a$

Brunner และคณะ (1968) รายงานว่าเมื่อ Serratia marcescens กับ Escherichia coli มีการแข่งขันเพื่อให้ได้รับซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตอย่างเดียวกันภายใต้การหมักแบบคงที่ทางเคมี ความถาวรของเชื้อจุลินทรีย์ผสมนี้อาจเกิดขึ้นได้เมื่อทำให้ E. coli มีจำนวนเล่นชัดขึ้นหรือมีจำนวนมากขึ้นที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่ำและทำให้ S. marcescens มีจำนวนเล่นชัดที่อัตราความเร็วในการเจือจางสูง กลไกที่ทำให้สองสายพันธุ์อยู่ร่วมกันได้ในกรณีนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด



รูปที่ 20.2 Effects of an inhibitor or activator on the relations of specific growth rate (μ) and growth-limiting substrate concentration (s) for a given species: continuous line, without either inhibitor or activator; dotted line, with inhibitor; broken line, with activator.

20.3 จุลินทรีย์ผสมที่ใช้ซับสเตรตต่างชนิดกัน

ลักษณะร่วมกันอย่างหนึ่งสำหรับสภาวะต่าง ๆ ในหมู่ที่ II ของตารางที่ 20.1 เพื่อรักษาไว้ให้มีสองสายพันธุ์อยู่ด้วยกันในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเดียวกันคือ การมีซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตต่างชนิดกันที่ความเข้มข้น s_a และ s_b ตามลำดับสำหรับสายพันธุ์ A และ B โดยไม่กีดกันว่าแต่ละสายพันธุ์อาจสามารถใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดทั้งสองร่วมกันได้ อัตราความเร็วในการสะสมสุทธิสำหรับซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ A ถูกกำหนดได้โดย

$$ds_a/dt = D(s_{r(a)} - s_a) - \mu_a x_a / Y_{a/a} - q_b x_b \qquad 20.6$$

อักษรกำกับล่าง a และ b หมายถึงตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์ของสายพันธุ์ A และ B ตามลำดับ พจน์ $Y_{a/a}$ หมายถึงพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ A จากซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของตน ตัวแปรเสริม q_b คือผลหารทางเมตาโบลิซึ่มสำหรับการใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ A โดยสายพันธุ์ B ถ้า $x_a/Y_{a/a} \gg q_b x_b$ สมการที่ 20.6 จึงถูกประเมินได้ว่า

$$ds_a/dt = D(s_{r(a)} - s_a) - \mu_a x_a / Y_{a/a} \qquad 20.7$$

ซึ่งก็เหมือนกันกับการแสดงออกสำหรับการใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ ถ้าสมการที่คล้ายคลึงกันนี้ถูกใช้สำหรับการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ B ด้วย ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดของตนแล้วการเจริญเติบโตของทั้งสองสายพันธุ์จะเท่ากับผลบวกของการเจริญเติบโตแยกกันในซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของทั้งสอง

ระบบเช่นนี้ถูกพบว่าเกิดขึ้นได้ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย <u>Pseudomonas aeruginosa</u> กับ <u>Klebsiella aerogenes</u> ที่เจริญเติบโตอยู่ในน้ำทาลกลูโคสและพาราไฮดรอซี่เบ็นโซเอตที่อุณหภูมิ 40° ซ และพีเอช 7.2 ซึ่งกลูโคสเป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของ <u>Pseudomonas</u> และไฮดรอซี่เบ็นโซเอตเป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของ <u>Klebsiella</u> (Pirt, 1975, p.203) อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 37° ซ หรือต่ำกว่า <u>Klebsiella</u> สามารถใช้ซับสเตรตทั้งสองอย่างร่วมกันได้และกีดกันการเจริญเติบโตของ <u>Pseudomonas</u> การกระทำต่อกันอย่างอื่นในระบบนี้คือไฮดรอซี่เบ็นโซเอตมีพฤติกรรมเป็นซับสเตรตยับยั้งการเจริญเติบโตของ <u>Klebsiella</u> แต่ไม่ใช่สำหรับ <u>Pseudomonas</u> ผลลัพธ์ที่เกิดตามมาคือถ้าความเข้มข้นของไฮดรอซี่เบ็นโซเอตสูงขึ้นจนถึงขั้นยับยั้ง <u>Klebsiella</u> เชื้อแบคทีเรีย <u>Pseudomonas</u> ก็สามารถใช้ไฮดรอซี่-เบ็นโซเอตได้มากขึ้นและลดความเข้มข้นของไฮดรอซี่เบ็นโซเอตลงมาจนถึงขั้นที่ไม่ยับยั้ง <u>Klebsiella</u> ได้

20.4 <u>จุลินทรีย์ผสมที่ผลผลิตของสายพันธุ์หนึ่งเป็นซับสเตรตของอีกสายพันธุ์หนึ่ง</u>

สภาวะในหมู่ที่ IIb ตามตารางที่ 20.1 ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการ

เจริญเติบโตของสายพันธุ์หนึ่งคือผลผลิตของอีกสายพันธุ์หนึ่ง ตัวอย่าง เช่น การเจริญเติบโตของโพรพิโอนิแบคทีเรียโดยใช้กรดแลคติกที่ได้จากการเจริญเติบโตของสเตรพโตคอกไซจากน้ำตาลแลคโตสในน้ำนม ตัวอย่างอย่างอื่นอาจพบได้จากการศึกษาของ **Shindela** และคณะ 1965, **Yeoh** และคณะ 1968, **Chao & Reilly**, 1972 และ **Hotta** และ **Takao**, 1973

สมมุติว่าในการหมักแบบคงที่ทางเคมีของสองสายพันธุ์ A และ B เจริญเติบโตร่วมกัน การเจริญเติบโตของสายพันธุ์ A ถูกกำหนดจำกัดโดยซับสเตรตในสื่อกลางอาหารที่ให้ด้วยความเข้มข้น s_r ความเข้มข้นของสายพันธุ์ A ควรเหมือนกันกับที่ควรจะได้เมื่อเจริญเติบโตเพียงเชื้อเดียว ถ้าซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตสำหรับสายพันธุ์คือผลผลิตของสายพันธุ์ A ซึ่งปรากฏอยู่ด้วยความเข้มข้น p ในสื่อกลางอาหาร อัตราความเร็วในการสะสมผลผลิตนี้คือ

$$dp/dt = q_p x_a - Dp - \mu_b x_b / Y_{b/p} \qquad 20.8$$

ซึ่ง q_p คืออัตราความเร็วเฉพาะในการเกิดผลผลิต ถือว่า $Y_{p/a} = dp/dx_a$ และ $q_p = Y_{p/a}\mu_a$ เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงก็จะสามารถกำหนดได้ว่า $\mu_a = \mu_b = D$ และ $\bar{x}_a = Y_{a/s}(s_r - \bar{s})$ แทนค่าสำหรับ q_p และ x_a ในสมการที่ 20.8 จะได้ค่าที่สถานะมั่นคง คือ

$$\bar{x}_b = Y_{b/p}\{Y_{p/a}Y_{a/s}(s_r - \bar{s}) - \bar{p}\} \qquad 20.9$$

ผลกระทบเนื่องจากอัตราความเร็วในการเจือจางต่อชีวมวลสองสายพันธุ์ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกทำนายได้ดังในรูปที่ 20.3 (a) ส่วนในรูปที่ 20.3 (b) แสดงถึงผลกระทบเมื่อ q_p เป็นอิสระจาก μ_a

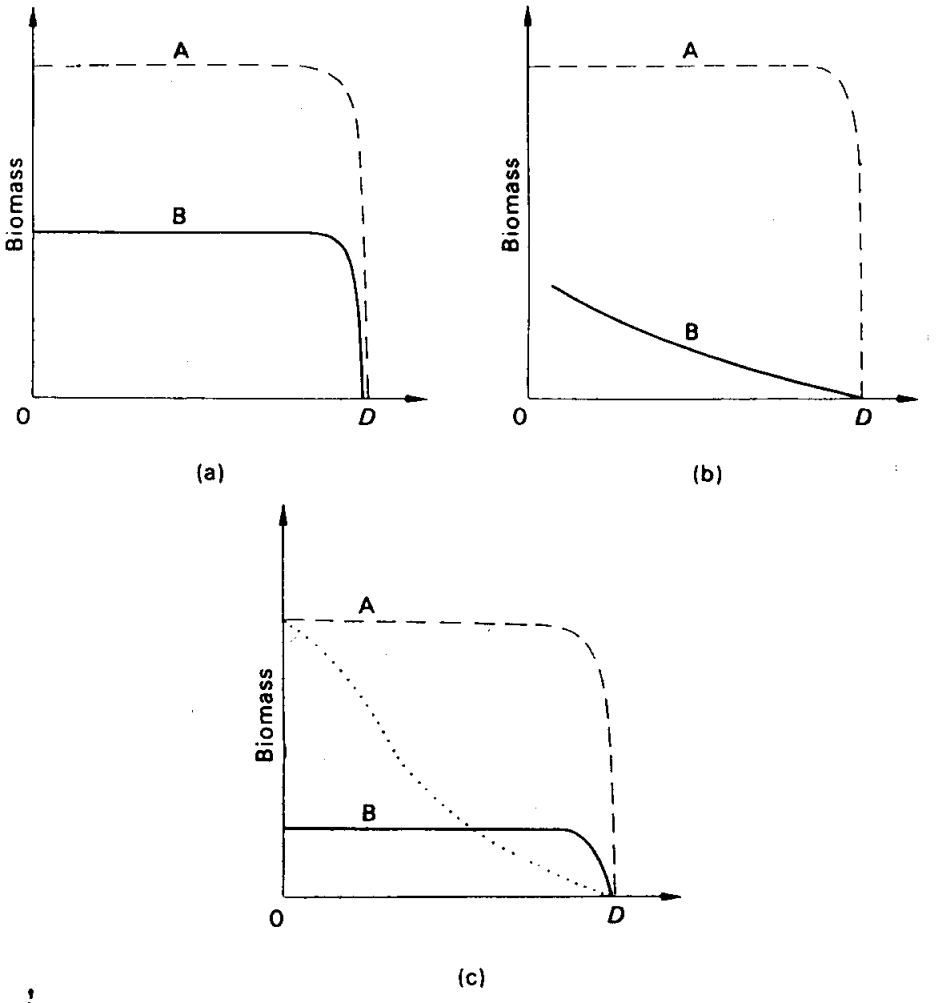
20.5 จุลินทรีย์ผสมที่ผลผลิตยับยั้งการเจริญเติบโตของสายพันธุ์หนึ่งเป็นซับสเตรตของอีกสายพันธุ์หนึ่ง

ถ้าผลผลิตของสายพันธุ์ A เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของตนเองได้ด้วยความเข้มข้น p แต่สายพันธุ์ B ใช้สารยับยั้งนี้เป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของตน ถ้าการยับยั้งนี้เป็นแบบแข่งขันอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ A อาจถูกกำหนดได้โดยสมการ

$$\mu_a = \mu_{m(a)} s/(s + \alpha K_s) \qquad 20.10$$

แต่ถ้าการยับยั้งนี้เป็นแบบไม่แข่งขันจะได้สมการเป็น

$$\mu_a = \mu_{m(a)}S/\alpha(S+K_s) \qquad 20.11$$



รูปที่ 20.3 Non-competitive growth of two species A and B as functions of the dilution rate (D) in a chemostat culture. (a) Species A forms a product which is the growth-limiting substrate for B ($Y_{p/a}$, constant). (b) Species A forms a product which is the growth-limiting substrate for B (q_p, constant). (c) Species A forms a product ($Y_{p/a}$, constant) which non-competitively inhibits its own growth and species B uses the inhibitor as growth-limiting substrate (dotted line shows growth of A in absence of B).

ซึ่ง $\alpha=(1+p/K_i)$ และสำหรับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของสายพันธุ์จะได้ว่า $\mu_b=\mu_{m(b)}p/(p+K_b)$ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงจึงได้สมการคือ

$$\tilde{p} = DK_b/(\mu_{m(b)}-D) \qquad 20.12$$

ค่าที่สถานะมั่นคงของ s อาจได้จากสมการ 20.10 หรือ 20.11 โดยกำหนดให้ $D=\mu_a$ และแทนค่าสำหรับ p จากสมการที่ 20.12 $\tilde{x}_a=Y(s_r-\tilde{s})$ และ $\tilde{x}_b$ ถูกกำหนดโดยสมการที่ 20.9 สำหรับผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ค่าของชีวมวลสำหรับสายพันธุ์ A และ B ในแง่เป็นฟังชั่นของอัตราความเร็วในการเจือจางถูกทำนายได้ดังในรูปที่ 20.3(c)

ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ผสมแบบนี้คือ จุลินทรีย์ผสมระหว่าง **Pseudomonas** ที่ออกซิไดซ์มีเทนกับ **Hyphomicrobium** ที่ใช้เมทานอล (Wilkinson & Harrison, 1973) ซูโดโมแนดเมื่อออกซิไดซ์มีเทนจะสะสมเมทานอลยับยั้งการเจริญเติบโตของตนได้ แต่ไฮโฟไมโครเบี่ยมใช้เมทานอลเป็นอาหารอีกทอดหนึ่งจึงทำให้ซูโดโมแนดไม่ถูกยับยั้ง

20.6 จุลินทรีย์ผสมที่สายพันธุ์หนึ่งเป็นซับสเตรตของอีกสายพันธุ์หนึ่ง

ความสัมพันธุ์ระหว่างผู้ล่า (predator) กับเหยื่อ (prey) อาจถูกยกตัวอย่างได้จากโปรตัวชั่วที่กัดกินแบคทีเรีย ระบบเช่นนี้ถูกทำเป็นแบบจำลองได้โดยสมมุติให้การหมักแบบคงที่ทางเคมีมีผู้ล่าปรากฏอยู่ด้วยความเข้มข้น r และมีเหยื่อปรากฏอยู่ด้วยความเข้มข้น h โดยใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของตนที่ปรากฏอยู่ด้วยความเข้มข้น s และ s_r ตามลำดับในถังหมักและในสื่อกลางอาหารที่เติมลงไป ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของเหยื่อ (μ) กับความเข้มข้นของซับสเตรต และความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของผู้ล่า (λ) กับความเข้มข้นของเหยื่อถูกถือว่าเป็นความสัมพันธ์แบบไฮเปอร์โบลิคดังสมการคือ

$$\mu = \mu_m s/(s+K_s) \quad \text{and} \quad \lambda = \lambda_m h/(h+K_h) \qquad 20.13$$

ซึ่ง K_s และ K_h คือค่าความอิ่มตัวคงที่สำหรับเหยื่อและผู้ล่าตามลำดับ หลักฐานความสัมพันธ์แบบไฮเปอร์โบลิคสำหรับค่าความสัมพันธ์ $(\lambda-h)$ เพื่อการเจริญเติบโตของโปรโตชั่วด้วยแบคทีเรียที่เป็นเหยื่อได้ถูกให้ไว้โดย **Curds** และ **Cockburn** (1968) ผลผลหรือประสิทธิภาพการเจริญเติบโตถูกกำหนดได้เป็น Y กรัมของเยื่อที่เกิดขึ้น/กรัมของซับสเตรต

ที่ใช้ และ W กรัมของผู้ล่า/กรัมของเหยื่อที่ใช้ ดังนั้นความสมดุลย์ของเหยื่อคือ

net rate of increase in prey = growth rate − consumption rate − output rate

นั่นก็คือ

$$dh/dt = \mu h - \lambda r/W - Dh \qquad 20.14$$

และความสมดุลย์ของผู้ล่าคือ

net rate of increase in predator = growth rate − output rate

จะได้ว่า

$$dr/dt = (\lambda - D)r \qquad 20.15$$

ความสมดุลย์ของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือเหยื่อคือ

net rate of increase = input rate − consumption rate − output rate

นั่นก็คือ

$$ds/dt = Ds_r - \mu h/Y - Ds \qquad 20.16$$

เพื่อให้ได้ค่าที่สถานะมั่นคงอนุพันธ์ ($dh/dt, dp/dt$ and ds/dt) ถูกทำให้เท่ากับศูนย์ จากสมการที่ 20.15 พบว่าเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคง $\lambda = D$ และจากสมการที่ 20.14 จะได้ว่า

$$\mu = D(1 + \tilde{r}/W\tilde{h}) \qquad 20.17$$

ซึ่งเส้นลากเป็นคลื่นกำกับบนตัวอักษรสัญลักษณ์แต่ละตัวหมายถึงค่าที่สถานะมั่นคง ดังนั้นเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของผู้ล่าจึงเท่ากันกับอัตราความเร็วในการเจือจาง และอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของเหยื่อจะสูงกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางไปนานเท่านานตราบที่ยังมีผู้ล่าที่ว่องไวปรากฏอยู่ จากสมการที่ 20.13 จะได้ความเข้มข้นที่สถานะมั่นคงของเหยื่อคือ

$$\tilde{h} = DK_h/(\lambda_m - D) \qquad 20.18$$

โดยการแทนค่าสำหรับ μ และ $\tilde{h}$ ในสมการที่ 20.16 เมื่อ $ds/dt = 0$ จะได้ว่า

$$\tilde{s}^2 - \{s_r - K_s - \mu_m K_h/Y(\lambda_m - D)\}\tilde{s} - K_s s_r = 0 \qquad 20.19$$

ดังนั้น $\tilde{s} = (-b \pm \sqrt{(b^2 + 4K_s s_r)})/2$ ซึ่ง $b = -\{s_r - K_s - \mu_m K_h/Y(\lambda_m - D)\}$

และที่สถานะมั่นคงจะได้ความสมดุลย์ของเหยื่อคือ

prey in effluent from culture = total prey produced − prey consumed by predator

นั่นก็คือ

$$\tilde{h} = Y(s_r - \tilde{s}) - \tilde{r}/W \qquad 20.20$$

ดังนั้น

$$\tilde{r} = W\{Y(s_r - \tilde{s}) - \tilde{h}\} \qquad 20.21$$

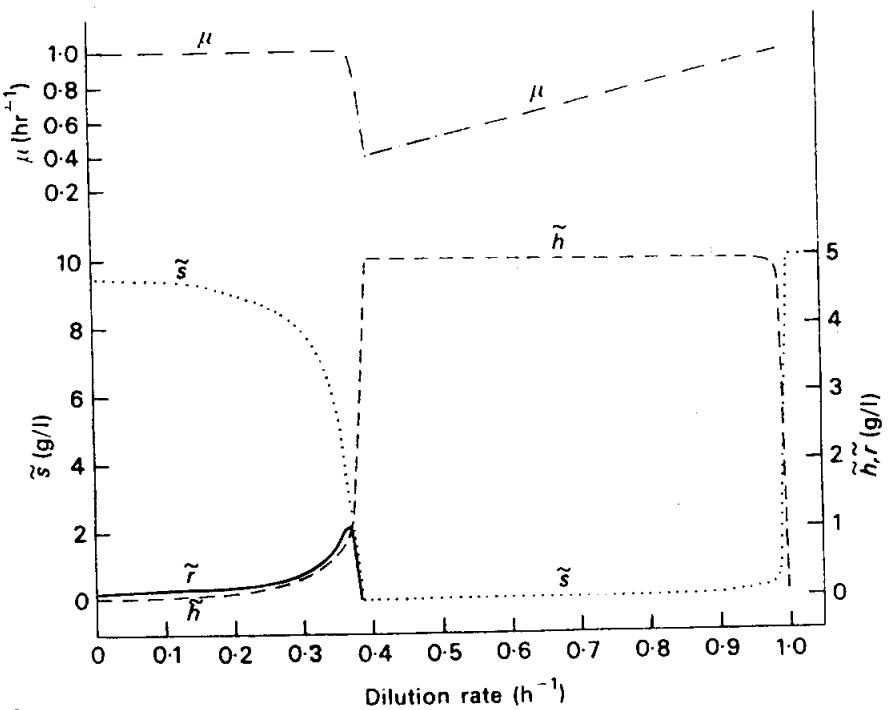
ถ้าอัตราความเร็วในการเจือจางสูงเกินกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤติ $D_{c(r)}$ ของผู้ล่า ผู้ล่าก็จะถูกกำจัดออกไปจากถังหมักจนหมดสิ้น ที่ค่า $D_{c(r)}$ ความเข้มข้นของผู้ล่าคือ $\tilde{r}=0$ และ $\tilde{h}=Y(s_r-\tilde{s})$ ซึ่งก็จะประมาณใกล้เคียงกันกับ Ys_r เมื่อ $D_{c(r)} \ll \mu_m$ และ $s_r \gg K_s$ แทนค่า $\tilde{h}=Ys_r$ ในสมการที่ 20.13 จะได้ว่า

$$D_{c(r)} \approx \lambda_m Ys_r/(Ys_r + K_h) \qquad 20.22$$

ถ้า $Ys_r \gg K_h$ ก็จะประมาณได้ว่า $D_{c(r)} \approx \lambda_m$ รูปที่ 20.4 แสดงถึงการทำนายค่าที่สถานะมั่นคงของ p, h, s และ μ ในฐานะเป็นฟังก์ชันของอัตราความเร็วในการเจือจางสำหรับการหมักที่มีแบคทีเรียเป็นเหยื่อและโปรโตซัวเป็นผู้ล่า ค่าที่สูงเกินกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤติของโปรโตซัวการหมักจะมีพฤติกรรมเป็นการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิของแบคทีเรียที่เป็นเหยื่อแต่เพียงอย่างเดียว

Canale (1970) และ **Curds** (1971) ได้ทำการวิเคราะห์และเลียนแบบการหมักด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้สมการดิฟเฟอเรนเชียลสำหรับค่า h, p และ s พบว่าระบบมีสถานะที่อาจเป็นไปได้ถึงสามสถานะขึ้นอยู่กับตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต คือ (1) ค่าที่สถานะมั่นคงอาจมีการกวัดแกว่งอย่างคงที่โดยมีช่วงวงรอบเท่ากันโดยตลอด **(stable oscillation)** หรือ (2) ค่าที่สถานะมั่นคงมีการกวัดแกว่งอย่างมีช่วงวงรอบไม่เท่ากันโดยมีช่วงวงรอบกว้างเมื่อเริ่มต้นแล้วค่อยแคบลงในตอนท้าย **(damped oscillation)** หรือ (3) การมีค่าเข้าใกล้กับค่าที่สถานะมั่นคงอย่าง **asymptotic** ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ จากตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับที่ใช้ในรูปที่ 20.4 **Curds**(1971)พบว่าการกวัดแกว่งอย่างคงที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อ D มีค่าต่ำกว่าประมาณ $75\% \lambda_m$ แต่เมื่อ D มีค่าใกล้เคียงกันกับค่า λ_m มากขึ้นระบบจะเข้าใกล้กับค่าที่สถานะมั่นคงโดยเริ่มต้นด้วยการกวัดแกว่งอย่างมีช่วงวงรอบกว้างแล้วค่อยแคบลง **(damped oscillation)** เข้าใกล้กับค่าที่สถานะมั่นคงอย่าง **asymptotic**

Curds ยังพบด้วยว่ามีความสอดคล้องกันเชิงคุณภาพระหว่างทฤษฎีกับระบบจากการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ Tetrahymena pyriformis ที่กัดกินเชื้อ Klebsiella aerogenes ที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นซับสเตรทกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต



รูปที่ 20.4 Predator–prey interactions in a chemostat culture. Predicted steady-state values for concentrations of protozoan predator ($\tilde{r}$, g/l), bacterial prey ($\tilde{h}$, g/l) and growth-limiting substrate ($\tilde{s}$, g/l) for the bacteria. Specific growth rate of bacteria = μ; maximum specific growth rate of bacteria = 1·0 h^{-1}; maximum specific growth rate of protozoa = 0·4 h^{-1}; growth yield of protozoa = 0·5 g/g bacteria; growth yield of bacteria = 0·5 g/g substrate; K_h = 0·10 g/l; K_s = 0·01 g/l; s_r = 10·0 g/l. (From Pirt & Bazin, 1972)

จึงสรุปได้ว่าผู้ล่าสามารถลดประชากรของเหยื่อได้อย่างรุนแรงและทำให้เพิ่มการใช้ซับสเตรทของเหยื่อ สิ่งนี้มีความสำคัญต่อขบวนการทำให้สิ่งที่ไหลออกมาจากระบบบริสุทธิขึ้น Pirt และ Bazin (1972) ได้เสนอแนะว่าโปรโตซัวควรมีผลอย่างตรงกันข้ามกับแบคทีเรียที่ถูกกัดกินซึ่งใช้วัตถุของเสียเป็นอาหาร อย่างไรก็ตามโปรโตซัวสามารถถูกกำจัดออกจากระบบได้ด้วยการเพิ่มอัตราความเร็วในการเจือจางให้สูงเกินกว่าค่าวิกฤติ

สำหรับโปรโตซัว ในกรณีที่จำเป็นการบริโภคเพื่อกำจัดแบคทีเรียโดยโปรโตซัวอาจถูกจัดทำขึ้นในขั้นตอนที่สองของการหมักแบบคงที่ทางเคมี

Jost และคณะ(1973)ได้ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียสองประเภทคือ Escherichia coli กับ Azotobacter vinelandii ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของทั้งสอง และโปรโตซัว Tetrahymena pyriformis เป็นผู้ล่าของแบคทีเรียทั้งสองนี้ ลักษณะสำคัญของระบบนี้คือถ้าไม่มีผู้ล่า E. coli จะกีดกันการเจริญเติบโตของ Azotobacter แต่ถ้ามีผู้ล่าปรากฏอยู่ก็จะยอมให้ทั้งสามสายพันธุ์มีอยู่ร่วมกันได้

20.7 การตรวจสอบอัตราความเร็วในการผ่าเหล่าจากลักษณะการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ผสม

การผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นในประชากรเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้ประชากรเซลล์จุลินทรีย์มีลักษณะเป็นเชื้อจุลินทรีย์ผสมประกอบด้วยเซลล์ที่ผ่าเหล่ากับเซลล์ที่ยังคงเหมือนพ่อแม่เดิมไม่ผ่าเหล่าไป ถ้าการผ่าเหล่าไม่มีผลกระทบต่อความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะกับความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตการหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกใช้เพื่อตรวจสอบอัตราความเร็วในการผ่าเหล่าได้ (Novick, 1958) ถ้าให้ N=จำนวนทั้งหมดของจุลินทรีย์/มล., m= จำนวนจุลินทรีย์ผ่าเหล่า/มล. (ถือว่ามีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับ N) , μ= อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของจุลินทรีย์พ่อแม่ , ρ= อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของจุลินทรีย์ผ่าเหล่า D= อัตราความเร็วในการเจือจาง , λ= อัตราส่วนในการผ่าเหล่าแสดงออกเป็นจำนวนเซลล์ผ่าเหล่าที่เกิดขึ้น/จำนวนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นทั้งหมด ดังนั้นภายใต้การหมักแบบคงที่ทางเคมีในช่วงระยะเวลาอันสั้น (dt) จะได้ว่า

$$dm = \lambda\mu N\,dt + \rho m\,dt - Dm\,dt \qquad 20.23$$

$$\therefore\ dm/dt = \lambda\mu N + (\rho - D)m \qquad 20.24$$

$$dN = \mu N\,dt - \lambda\mu N\,dt - DN\,dt \qquad 20.25$$

$$\therefore\ dN/dt = \{(1-\lambda)\mu - D\}N \qquad 20.26$$

ถือว่า λ มีค่าน้อยมากจนกระทั่ง $(1-\lambda)\approx 1$ และ $\rho=\mu$ เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงสามารถแทนค่า $\mu=\rho=D$ ได้ดังนั้นจากสมการที่ 20.24 จึงได้ว่า

$$dm/dt = \lambda DN \qquad 20.27$$

เมื่ออินทีเกรทสมการที่ 20.27 จะได้ว่า

$$m = \lambda DNt+m_0 \qquad 20.28$$

เมื่อพิจารณาสมการที่ 20.28 พบว่าจำนวนที่สูงขึ้นของเซลล์ผ่าเหล่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับเวลาด้วยความลาดเอียงเท่ากับ λDN ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบหาค่า λ ได้

โดยวิธีการนี้ **Novick** (1958) ได้ใช้สังเกตุการหมักแบบคงที่ทางเคมีของ **E. coli** B พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงของจำนวนเซลล์ผ่าเหล่าที่ทนทานต่อเฟจ T5 และ T6 และยังได้สังเกตุว่าตลอดช่วงอันกว้างในการเพิ่มขึ้นของเซลล์ผ่าเหล่าอัตราส่วนในการผ่าเหล่าเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อเวลาชั่วอายุ (t_d) นั่นคือ $\lambda=\alpha t_d$ ซึ่ง α คืออัตราความเร็วในการผ่าเหล่าต่อชั่วโมง

ถ้า μ ไม่เท่ากับ ρ ก็จะเป็นการคัดเลือกหรือต่อต้านเซลล์ผ่าเหล่าและจำนวนเซลล์ผ่าเหล่าก็จะไม่เพิ่มขึ้นด้วยอัตราคงที่ เมื่อ $\rho>\mu$ จำนวนเซลล์ผ่าเหล่าจะเพิ่มขึ้นแบบขยายแล้วในที่สุดก็จะแทนที่จุลินทรีย์ที่เป็นพ่อแม่ เมื่อ $\rho<\mu$ ในสถานะมั่นคงซึ่ง $\mu=D$ พจน์ $(\rho-D)$ ในสมการที่ 20.24 มีค่าเป็นลบและในขณะที่ m เพิ่มขึ้น $dm/dt\to 0$ ดังนั้นจำนวนเซลล์ผ่าเหล่าจะเพิ่มขึ้นถึงค่าจำกัดอันหนึ่งคือ m_L ซึ่งได้จากการใส่ค่า $dm/dt=0$ ในสมการที่ 20.24 จะได้ว่า

$$m_L = \lambda N/(1-\rho/D) \qquad 20.29$$

20.8 สรุป

ได้เคยมีการทดสอบอย่างเป็นระบบอยู่บ้างแต่ค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับหลักการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ผสม การกระทำต่อกันระหว่างสายพันธุ์อาจถูกตรวจสอบได้เป็นอย่างดีโดยใช้การหมักแบบคงที่ทางเคมีเนื่องจากการกระทำต่อกันหลายอย่างอาจไม่

ปรากฏขึ้นจนกว่าการเจริญเติบโตจะถูกจำกัดด้วยซับสเตรตและอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของจุลินทรีย์สามารถถูกทำให้เปลี่ยนแปลงได้

ภาวะพื้นฐานหกสภาวะที่ยอมให้มีการอยู่รวมกันของสองสายพันธุ์ได้ถูกจัดทำขึ้นเป็นบัญชีไว้ในตารางที่ 20.1 และการรวมกันของสภาวะพื้นฐานดังกล่าวอาจช่วยให้ระบบถาวรขึ้น ถ้าการกระทำต่อกันระหว่างสองสายพันธุ์ถูกไกล่เกลี่ยโดยผลผลิตที่แพร่ซึมได้ ระบบอาจถูกจัดทำให้ง่ายขึ้นโดยแบ่งแยกออกเป็นเชื้อบริสุทธิสองสายพันธุ์ด้วยเยื่อไดอะไลสิส (ตอนที่ 21.5) สภาวะในหมู่ที่ IIa ของตารางที่ 20.1 สามารถจัดทำให้มีจำนวน (n) กี่สายพันธุ์ก็ได้อยู่ร่วมกันในการหมักแบบคงที่ทางเคมีถ้ายังมีซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของแต่ละสายพันธุ์ปรากฏอยู่ นั่นก็คือมีซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตแตกต่างกัน n ชนิดเท่ากันกับจำนวนสายพันธุ์ เพื่อจุดประสงค์นี้แหล่งธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน หรือกำมะถันต่างชนิดกันมักถูกนำมาใช้ แต่สารอาหารพื้นฐานชนิดอื่นที่จำเป็นคือ ฟอสเฟต, โปแตสเซี่ยม และแม็กนีเซี่ยม มีให้เลือกน้อยมากและส่วนใหญ่ก็แตกตัวเป็นไอออนอิสระจึงสรุปได้ว่าความแตกต่างสูงสุดของประชากรจะเกิดขึ้นเมื่อมีสารประกอบคาร์บอน ไนโตรเจน และกำมะถันจำนวนหลายชนิดปรากฏอยู่และมีฟอสเฟต โปแตสเซี่ยม และแม็กนีเซี่ยมไอออนอยู่ด้วยปริมาณซึ่งมากเกินพอ ในแง่ที่กลับกันความแตกต่างที่น้อยที่สุดจะเกิดขึ้นเมื่อฟอสเฟต โปแตสเซี่ยม หรือแม็กนีเซี่ยมอย่างใดอย่างหนึ่งถูกใช้เป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต วิถีทางอื่นที่รักษาไว้ให้สองสายพันธุ์ยังคงแข่งขันกันอยู่ในระบบคือการทำให้มีสายพันธุ์ที่เป็นผู้ล่าปรากฏอยู่

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (μ) กับความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (s) เป็นพื้นฐานสำคัญในการตรวจสอบผลลัพธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ผสม ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอัตราความเร็วในการเจือจางที่สูงขึ้นจะทำให้มีจำนวนสายพันธุ์ที่สามารถคงอยู่ได้ในระบบลดน้อยลงภายใต้ภาวะการหมักที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันนี้ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับ s อาจถูกทำให้กลับกันหรือเปลี่ยนแปลงไปได้อย่างไม่มีขอบเขตจำกัดเมื่อมีสิ่งยับยั้งหรือสิ่งกระตุ้น และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือสภาวะทางกายภาพอื่น ๆ ปรากฏอยู่ด้วย.