บทที่ 23
การเจริญเติบโตเป็นโคโลนีบนพื้นผิวของสื่อกลางอาหารแข็ง

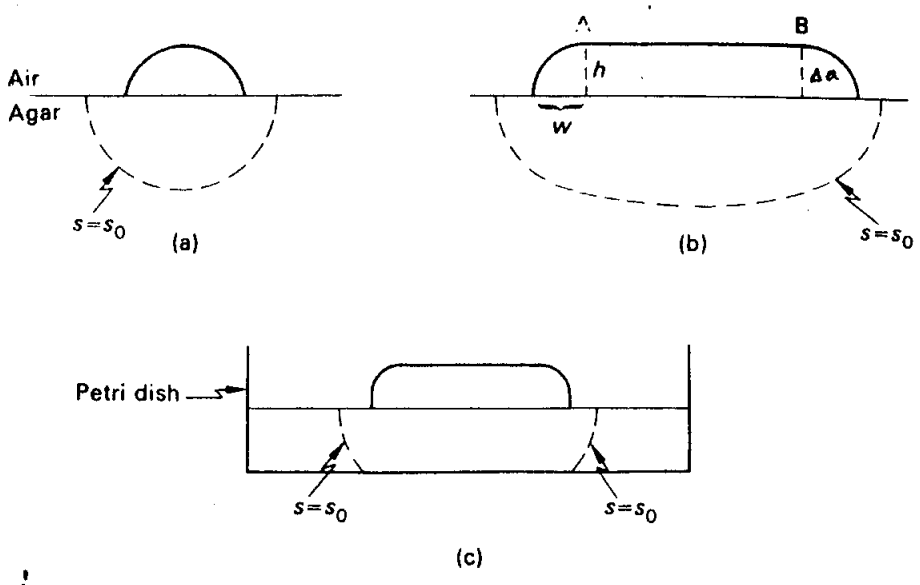
23.1 คำนำ

การรวมตัวเป็นโคโลนีของจุลินทรีย์บนพื้นผิวของวัตถุมักพบกันอยู่ทั่วไปและในห้องปฏิบัติการ การเจริญเติบโตของโคโลนีจุลินทรีย์บนสื่อกลางอาหารแข็งเป็นวิธีการพื้นฐานอย่างหนึ่งในการศึกษาถึงพฤติกรรมของจุลินทรีย์ หลักการต่าง ๆ เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโคโลนีได้ถูกใช้เป็นพื้นฐานอย่างสำคัญยิ่งตั้งแต่เมื่อ Fawcett (1952) ได้สังเกตุพบว่าโคโลนีของฟังไจแพร่กระจายออกไปได้ด้วยอัตราความเร็วคงที่ อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนีจึงได้ถูกใช้เพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของฟังไจ เมื่อไม่นานมานี้การศึกษาทางทฤษฎีและจากการทดลองต่าง ๆ ได้นำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับความหมายของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนี การเจริญเติบโตของโคโลนีแบคทีเรียซับซ้อนมากกว่าโคโลนีของฟังไจแต่ภายใต้สภาวะที่แน่นอนอย่างหนึ่งโคโลนีแบคทีเรียก็แสดงการเจริญเติบโตตามทฤษฎีเส้นตรง (Pirt, 1967)

23.2 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโคโลนี

Pirt (1967) ได้จัดทำสูตรสำเร็จสำหรับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อวัดปริมาณและอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนี ตามแบบจำลองนี้ถือว่าเมื่อแหล่งเชื้อจุลินทรีย์จำนวนเพียงเล็กน้อยถูกใช้เพื่อเริ่มต้นเป็นโคโลนีบนสื่อกลางวุ้นอาหารชีวมวลทั้งหมดมีโอกาสทำให้เกิดการเจริญเติบโตของประชากรได้เท่าเทียม ๆ กันและประชากรก็เจริญเติบโตด้วยอัตราความเร็วแบบขยายสูงสุดได้นานเท่านานตราบเท่าที่ความเข้มข้นของสารอาหารยังคงสูงกว่าค่าความอิ่มตัวคงที่ K_s และไม่มีสภาวะยับยั้งเกิดขึ้น การดูดซับสารอาหารจากวุ้นอาหารโดยโคโลนีจะทำให้เกิดความต่างระดับกันของความเข้มข้นสารอาหารภายในเนื้อวุ้นดังแสดงในรูปที่ 23.1 (a) ถือว่าการเจริญเติบโตที่พับถมกันให้สูงขึ้นของ

โคโลนีเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่อเริ่มต้นเท่านั้นและจะลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบเป็นศูนย์ เนื่องจากมีความต้านทานต่อการแพร่กระจายของสารอาหารดังที่ได้ทำนายไว้โดยทฤษฎีการแพร่กระจายของซับสเตรตเข้าไปในระนาบของเนื้อเยื่อ(ตอนที่ 22.1) และในท้ายที่สุดการเจริญเติบโตสูงขึ้นของโคโลนีก็จะถูกถือว่าขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตแบบขยายของบริเวณขอบรอบนอกอันจำกัดซึ่งมีความกว้าง w คงที่และมีพื้นที่หน้าตัด Δa ดังรูปที่ 23.1 (b) ความกว้าง w ของบริเวณที่มีการเจริญเติบโตถูกกำหนดได้โดยความสมดุลย์ระหว่างการบริโภคสารอาหารและการแพร่กระจายของสารอาหารเข้าไปในบริเวณที่มีการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังถือว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถฝ่าทะลุหรือแผ่ขยายเข้าไปในเนื้อวุ้นได้



รูปที่ 23.1 Cross sections of model microbial colonies growing on nutrient agar surfaces. (The diagrams are not to scale.) The broken line shows the depth of the nutrient concentration gradient in each case; s_0 is the initial nutrient concentration. (a) Colony during exponential growth. (b) When growth is limited by substrate diffusion to an annulus of width w. It is assumed that between A and B the growth rate is limited practically to zero by substrate diffusion. (c) When the depth of the concentration gradient of a nutrient is limited by the depth of the agar.

ให้ m = ปริมาณชีวมวลทั้งหมดของโคโลนี m_a = ปริมาณชีวมวลที่กำลังเจริญเติบโตอยู่ในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตรอบนอกด้วยความกว้าง w ดังแสดงในรูปที่ 23.1 (b) ดังนั้นการเจริญเติบโตของโคโลนีจึงถูกทดแทนได้ด้วยสมการคือ

$$dm/dt = \mu m_a \qquad 23.1$$

ซึ่ง μ คืออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของจุลินทรีย์ ถือว่า w มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับรัศมีของโคโลนี r. ดังนั้นจึงสามารถเขียนสมการได้ว่า

$$m_a = 2\pi r\,\Delta a\rho \qquad 23.2$$

และ

$$m = \pi r^2 h\rho \qquad 23.3$$

ซึ่ง ρ คือความหนาแน่นของชีวมวล จากสมการที่ 23.3 จะได้ว่า

$$dm/dt = 2\pi rh\rho\, dr/dt \qquad 23.4$$

แทนค่าสำหรับ dm/dt และ m_a ในสมการที่ 23.1 แล้วอินทีเกรตจะได้ว่า

$$r = \mu\frac{\Delta a}{h}t + r_0 \qquad 23.5$$

เพื่อทำให้ง่ายขึ้นจะถือว่าหน้าตัดของบริเวณที่มีการเจริญเติบโตเป็นรูปสี่เหลี่ยมมุมฉาก คือ $\Delta a = wh$ จะได้สมการว่า

$$r = \mu wt + r_0 \qquad 23.6$$

ดังนั้นถ้าถือว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามทฤษฎีเส้นตรง สมการที่ 23.6 ก็อาจใช้ทำนายได้ว่าโคโลนีมีการแผ่ขยายตามรัศมีด้วยอัตราความเร็วคงที่ $\mu w = K_r$

ด้วยความคล้ายคลึงกันกับการแพร่กระจายของซับสเตรตเข้าไปในระนาบของเนื้อเยื่อ(ตอนที่ 22.1)จึงคาดคะเนได้ว่า $w \propto (s_0/q)^{1/2}$ ซึ่ง s_0 คือความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต และ q คือผลหารทางเมตาโบลิซึม ถ้าไม่คำนึงถึงความต้องการซับสเตรตเพื่อการทำนุบำรุงต่าง ๆ ก็จะสามารถกำหนดได้ว่า $q = \mu/Y$ ซึ่ง Y คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต ดังนั้นจะได้ว่า $w = k_1(s_0/\mu)^{1/2}$ ซึ่ง k_1 คือค่าคงที่ และ

$$K_r = \mu w = k_1(s_0\mu)^{1/2} \qquad 23.7$$

23.3 ข้อสังเกตุจากการทดลองเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโคโลนีแบคทีเรีย

23.3.1 <u>การเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรง</u>

Pirt (1967)ได้ศึกษาการเคลื่อนไหวแห่งการเจริญเติบโตของโคโลนีแบคทีเรียเพื่อทดสอบแบบจำลองที่ได้ให้ไว้ในตอนที่ 23.2 การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีอย่างรวดเร็วและแม่นยำอาจทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โคโลนีถูกทำให้เริ่มขึ้นด้วยจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^6 เซลล์ พบว่าภายหลังจากการใส่เชื้อแล้วเป็นเวลา 30 ชั่วโมงอัตราความเร็วในการเพิ่มรัศมีของโคโลนีมีความคงที่จึงแสดงว่ามีการเจริญเติบโตคล้อยตามกฎเส้นตรง ต่อมาเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีลดลง ผลลัพธ์ที่ได้ก็คล้ายคลึงกันกับที่ถูกรายงานโดย Cooper และคณะ(1968) และโดย Palumbo และคณะ(1971) จากผลการทดลองของ Pirt (1967)พบว่าความกว้างของบริเวณที่มีการเจริญเติบโต w ที่ใช้สำหรับการคิดคำนวนอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีตลอดช่วงระยะเวลาที่มีการเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรงคือ 46 ไมโครมีเตอร์สำหรับ Escherichia coli และ 25 ไมโครมีเตอร์สำหรับ Streptococcus faecalis เมื่อเริ่มแรก Pirt (1967)ได้ใช้ w ที่มีค่าเป็นสองเท่าของที่กล่าวมาแล้วข้างต้นโดยถือว่าบริเวณที่มีการเจริญเติบโตรอบนอกมีหน้าตัดเป็นรูปสามเหลี่ยม Cooper และคณะ(1968) ได้รับหลักฐานมาว่ามวลบริเวณใจกลางโคโลนีแบคทีเรียไม่ได้มีส่วนช่วยในการขยายรัศมีของโคโลนี เนื่องจากจุลีเล็ก ๆ ของคาร์โบรันดัมที่ใช้โรยหว่านลงบนโคโลนีไม่ได้เคลื่อนย้ายออกจากกันอย่างมีความสัมพันธ์ในขณะที่โคโลนีเจริญเติบโต ความสูงของโคโลนีมีความคงที่ประมาณ 0.5 มม. ดังนั้นโคโลนีแบคทีเรียจึงอาจถือได้ว่ามีลักษณะเป็นจานสูงสม่ำเสมอกัน ขั้นตอนต่อมาของการเจริญเติบโตโคโลนีอาจยุบตัวลงตรงบริเวณใจกลาง

ในช่วงขณะที่มีการหน่วงอัตราความเร็วในการเพิ่มขึ้นตามรัศมีก็ยังคงเป็นไปด้วยอัตราคงที่ Cooper และคณะ(1968)พบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สอดคล้องกันกับอัตราความเร็วคงที่ในการเพิ่มขึ้นของพื้นที่โคโลนี เนื่องจากค่ากำลังสองของรัศมีเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงกับเวลา พฤติกรรมเช่นนี้ Cooper และคณะได้เสนอแบบจำลองที่ได้ถูกแก้ไขให้ดีขึ้นโดยสมมุติว่า w เป็นปฏิภาคกลับกับรัศมี เมื่อแทนค่า $\Delta a = bh/r$ ในสมการที่ 23.2 ซึ่ง b ถูกกำหนดให้เป็นค่าคงที่จะได้สมการคือ

$$r^2 = 2\mu bt + r_0^2 \qquad 23.8$$

สมการนี้ถูกเรียกว่ากฎแห่งพื้นที่(area law)

23.3.2 ผลกระทบจากความลึกของเนื้อวุ้นต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนี

Pirt (1967) พบว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีของโคโลนีแบคทีเรียจะอยู่ในระดับสูงสุดเมื่อวุ้นมีความลึกถึง 3.4 มม. และได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความลึกของเนื้อวุ้นจะช่วยยืดระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่เป็นไปตามกฎเส้นตรง เมื่อเพิ่มความลึกของเนื้อวุ้นให้หนาถึง 12 มม. โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตพบว่าอัตราความเร็วสูงสุดในการเพิ่มขึ้นตามรัศมีจะถูกรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลาประมาณ 150 ชั่วโมง แต่ถ้าความลึกของเนื้อวุ้นมีความหนาเพียง 3.2 มม. อัตราความเร็วดังกล่าวจะถูกรักษาไว้ได้เพียงแค่ 35 ชั่วโมงเท่านั้น ผลลัพธ์เช่นนี้แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงจากการเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรงไปเป็นกฎพื้นที่เป็นผลกระทบเนื่องมาจากความแตกต่างในความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตโดยมีพื้นฐานมาจากความหนาของเนื้อวุ้นดังแสดงในรูปที่ 23.1 (c) ข้อสรุปนี้ได้รับการสนับสนุนจากการคำนวนหาอัตราความเร็วในการแพร่กระจายของ Cooper และคณะ (1968) ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้กฎพื้นที่ความแตกต่างในความเข้มข้นของกลูโคสจะเกิดขึ้นได้จนถึงก้นจานเลี้ยงเชื้อดังแผนภูมิในรูปที่ 23.1 (c) จึงสรุปได้ว่าสภาวะเช่นนี้อาจลดความกว้างของบริเวณขอบรอบนอกซึ่งได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่

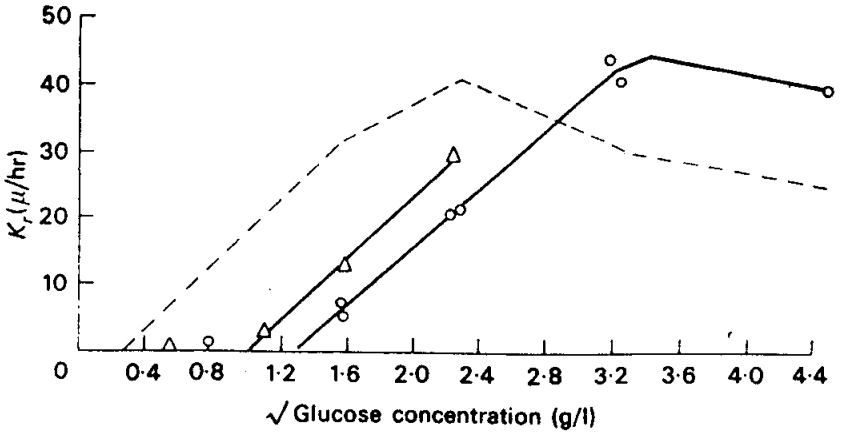
23.3.3 ผลกระทบจากความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต

Pirt (1967) ได้ชี้แสดงให้เห็นว่าถ้าใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงาน (กลูโคส) เป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต ความสัมพันธ์กันอย่างมีขอบเขตจำกัดระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส (s_0) กับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีคือ $K_r \propto s_0^{1/2}$ (รูปที่ 23.2) ขอบเขตจำกัดสูงสุดของ s_0 สำหรับกฎนี้ที่ใช้ได้กับการเจริญเติบโตของโคโลนีสำหรับ **Klebsiella aerogenes** , **Escherichia coli** และ **Streptococcus faecalis** คือ 5.0 , 2.5 และ 1.25 กรัม/ลิตรตามลำดับด้วย

อากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศและที่แม่นยำกว่านี้ก็คือ

$$K_r = k_2(s_0^{1/2} - s_t^{1/2}) \qquad 23.9$$

ซึ่ง k_2 คือค่าคงที่ s_t คือขีดเริ่มต้นความเข้มข้นซึ่งแต่เดิมเรียกว่า "ความเข้มข้นล้าหลัง" และการเจริญเติบโตจะเกิดขึ้นได้เมื่อซับสเตรตมีความเข้มข้นสูงเกินกว่านี้ ค่าของขีดเริ่มต้นความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (s_t) สำหรับ K. aerogenes, E.coli และ S. faecalis คือ 0.013 , 0.090 และ 0.005 กรัม/ลิตรตามลำดับ ขีดเริ่มต้นความเข้มข้นดูเหมือนว่ามีเฉพาะต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีแบคทีเรียเท่านั้นแต่ไม่พบกับฟังไจที่เป็นเส้นสาย(ตอนที่ 23.4) สาเหตุที่ทำให้มีขีดเริ่มต้นความเข้มข้นนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัดแต่อาจเป็นผลกระทบเนื่องมาจากความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงหรือผลกระทบเนื่องมาจากความเป็นพิษของออกซิเจน(ตอนที่ 23.3.4) การตอบสนองของ K_r ต่อ s_0 สามารถสะท้อนให้เห็นถึงความจริงที่ว่า $w \propto s_0^{1/2}$ ดังแบบจำลองที่ได้เสนอไว้ในสมการที่ 23.7



รูปที่ 23.2 Relation of radial growth rate (K_r) of *Escherichia coli* colonies to the glucose concentration at different oxygen partial pressures. Broken line, growth in air at 1 atm or air + 4·5% CO_2 at 1 atm; △, 95·5% oxygen + 4·5% CO_2 at 1 atm; ○, 100% oxygen at 1 atm. (From Pirt, 1967)

23.3.4 การจำกัดออกซิเจนและความเป็นพิษของออกซิเจน

สำหรับโคโลนีของ E. coli(Pirt, 1967) พบว่าการเพิ่มขึ้นของส่วนความดันออกซิเจน (P_{O_2}) จาก 0.21 เป็น 0.955 บรรยากาศช่วยเพิ่มขอบเขตจำกัดสูงสุดของ

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (s_0) สำหรับสมการที่ 23.9 จาก 2.5 เป็น 10.0 กรัม/ลิตร และการเพิ่มขึ้นของส่วนความกันออกซิเจนที่เท่ากันนี้ยังช่วยเพิ่มขีดเริ่มต้นความเข้มข้นของกลูโคส (s_i) จาก 0.09 เป็น 1.7 กรัม/ลิตร (รูปที่ 23.2) ผลลัพธ์เช่นนี้ชี้แสดงให้เห็นว่าขอบเขตจำกัดสูงสุดของความเข้มข้นกลูโคสสำหรับสมการที่ 23.9 เป็นผลกระทบเนื่องมาจากการเกิดผลผลิตที่เป็นพิษเช่นแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ซึ่งเกิดขึ้นโดยการเมตาโบลิซึมที่ถูกจำกัดด้วยออกซิเจน การเพิ่มขึ้นของขีดเริ่มต้นความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสอาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของออกซิเจนซึ่งเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของค่า Po_2 จึงสรุปได้ว่าเมื่อ Po_2 สูงขึ้นจำเป็นต้องทำให้อัตราความเร็วในการแพร่กระจายของกลูโคสสูงขึ้นด้วยเพื่อให้พอดีกันกับอัตราความเร็วในการออกซิเดชันซึ่งช่วยทำให้ค่า Po_2 ลดต่ำลงกว่าระดับที่ยับยั้งได้

23.3.5 <u>ผลกระทบจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ</u>

เพื่อที่จะสืบสวนถึงผลกระทบจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (μ) Pirt (1967)ได้เปลี่ยนแปลงค่า μ โดยใช้ทั้งสารยับยั้งซัลฟานิลาไมด์และอุณหภูมิ พบว่าเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปโดยสารยับยั้ง ค่าของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมี (K_r) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อ $\mu^{1/2}$ ดังที่ได้เสนอไว้แล้วโดยแบบจำลองตามสมการที่ 23.7 อย่างไรก็ตามเมื่อ μ ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปโดยอุณหภูมิความเป็นสัดส่วนกันระหว่าง K_r กับ $\mu^{1/2}$ ไม่อาจถูกรักษาไว้ได้โดยตลอด เหตุผลสำหรับการเบี่ยงเบนไปจากแบบจำลองนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

23.3.6 <u>ความไม่คงทนของเส้นรอบวงโคโลนี</u>

ขั้นต่อมาในการเจริญเติบโตของโคโลนีแบคทีเรีย ปกติภายหลังจากที่การเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรงไม่อาจถูกรักษาไว้ได้ ความเป็นวงกลมของโคโลนีจะเริ่มสลายไปและความผิดปกติของเส้นรอบวงจะเริ่มปรากฏขึ้น ความไม่คงทนดังกล่าวเช่นนี้ได้ถูกชี้แสดงโดย Cooper และคณะ(1968)ซึ่งได้ศึกษาว่าถ้าการเจริญเติบโตถูกกำหนดจำกัดโดยอัตราการแพร่กระจายของซับสเตรต การเสื่อมสลายของเส้นรอบวงโคโลนีจะเกิดขึ้นเนื่องจากส่วนที่ยื่นออกมาจากโคโลนีเพียงเล็กน้อยที่จุดใดจุดหนึ่งบนเส้นรอบวงจะมีผลกระทบทำให้

ได้รับสารอาหารเพิ่มขึ้น ณ ที่จุดนั้นแล้วทำให้ส่วนที่ยื่นออกมาถูกเน้นหนักมีขนาดโตขึ้นเป็นผลลัพธ์ติดตามมา

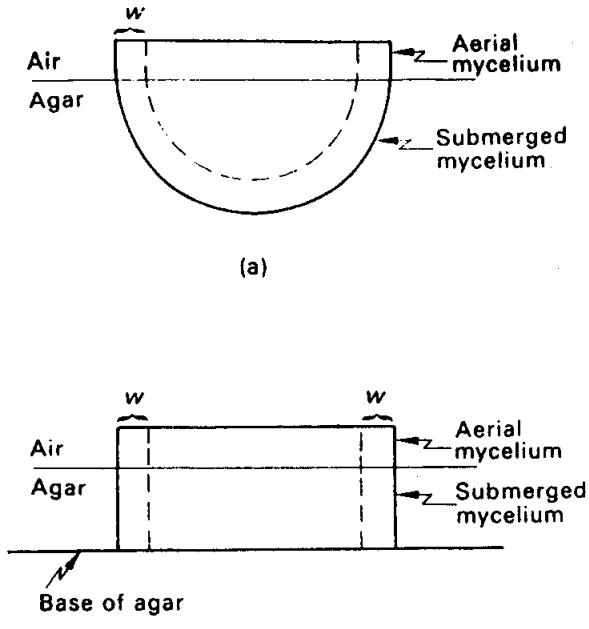
23.4 ข้อสังเกตุจากการทดลองเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของฟังกัลโคโลนี

23.4.1 การเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรง

อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนีฟังไจที่เป็นเส้นสายอาจถูกตรวจสอบได้จากการวัดการแผ่ขยายตามรัศมีของโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อหรือจากอัตราความเร็วในการแผ่ขยายของโคโลนีบนผิววุ้นในหลอดอาหาร (Trinci, 1969)แต่การศึกษาส่วนใหญ่มักนิยมใช้วิธีการตรวจสอบในจานเลี้ยงเชื้อพร้อมด้วยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อวัดขนาดของโคโลนีซึ่งก็เป็นวิธีการที่สดวกที่สุด มีแง่มุมที่สำคัญหลายอย่างเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโคโลนีฟังไจที่เป็นเส้นสายแตกต่างจากของแบคทีเรียเซลล์เดียว เนื่องจากไฮฟ่าของฟังไจเจริญเติบโตโดยการขยายออกจากปลาย การเจริญเติบโตของโคโลนีจึงพุ่งออกจากจุดศูนย์กลางโดยตรง การเคลื่อนไหวเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโคโลนีฟังไจในสายพันธุ์ Aspergillus, Penicillium, Mucor, Geotrichum และจีนัสอื่น ๆ ได้ถูกตรวจสอบโดย Trinci (1969 & 1971) ผลลัพธ์ที่ได้ชี้แสดงให้เห็นว่าภายหลังจากช่วงระยะเวลาล้าหลังซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการงอกของสปอร์ที่เป็นแหล่งเชื้อจุลินทรีย์แล้วจะมีช่วงระยะเวลาสั้น ๆ สำหรับการเพิ่มขึ้นของรัศมีโคโลนีตามกฎการเจริญเติบโตแบบขยาย แล้วต่อมาอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีก็จะคงที่ตามกฎเส้นตรงและถูกคงไว้อย่างไม่มีสิ้นสุดหรือจำกัด อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรงโดยทั่วไปของฟังไจที่เป็นเส้นสายไม่ขึ้นอยู่กับความหนาของเนื้อวุ้น ข้อยกเว้นสำหรับกฎนี้อาจปรากฏในตัวผ่าเหล่าทางสัณฐานวิทยาบางอย่าง (Trinci, 1973)ดังนั้นการเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรงจึงใช้ได้อย่างไม่จำกัดสำหรับฟังกัลโคโลนี แต่สำหรับโคโลนีแบคทีเรียอาจใช้ได้เพียงแค่ในช่วงระยะเวลาจำกัดเท่านั้น

ที่แตกต่างจากแบคทีเรียอีกประการหนึ่งคือฟังกัลไมซีเลี่ยมสามารถฝ่าทะลุเข้าไปในเนื้อวุ้นและเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ด้วยอัตราความเร็วประมาณพอ ๆ กันกับอัตราความเร็ว

ในการแผ่ขยายตามรัศมีของโคโลนีบนผิววุ้น ดังนั้นถ้าความหนาของเนื้อวุ้นมากพอโคโลนีก็อาจเจริญเติบโตเป็นรูปครึ่งทรงกลมใต้ผิววุ้นได้อีกด้วยดังรูปที่ 23.3 ความหนาแน่นของไฮฟ่าจะลดลงแบบลอการิทมิคตามความลึกของไมซีเลี่ยมที่หิมแทงเข้าไปในเนื้อวุ้น



รูปที่ 23.3 Cross sections of model fungal colonies growing on nutrient agar and penetrating into the agar. (a) Form of colony on deep agar; (b) form of colony on shallow agar. The broken line shows the inner limit of the growth unit, that is the growing part of the hyphal tips.

23.4.2 ความกว้างของบริเวณที่มีการเจริญเติบโต (*w*)

Trinci (1971) ได้ตรวจสอบตัวแปรเสริมนี้โดยตัดโคโลนีออกไปตามแนวเส้นตรงที่เชื่อมจุดสองจุดบนเส้นรอบวงของโคโลนีจนกระทั่งปลายไฮฟ่าขาดหลุดออกมา ตามลำดับความยาวแล้วติดตามการเจริญเติบโตโดยการถ่ายรูป ความยาวต่ำสุดของปลายไฮฟ่าที่จำเป็นต่อการสนับสนุนให้มีการเจริญเติบโตด้วยอัตราความเร็วเท่ากับ K, จะถูกถือว่าเป็นค่า w พบว่าความยาว w ของปลายไฮฟ่าที่กำลังเจริญเติบโตหรือ "หน่วยการเจริญเติบโต" (Caldwell & Trinci, 1973) เป็นลักษณะประจำสปีชี่และสเตรนของฟังไจโดยจะ

แตกต่างกันตั้งแต่ประมาณ 10 มม. สำหรับ Neurospora crassa จนถึง 0.4 มม. สำหรับ Geotrichum lactis เมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปโดยอุณหภูมิหรือโดยสารยับยั้ง (ไซโคลฮีซิไมด์) ค่า w ก็ยังคงที่ ดังนั้น K_r จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อ μ

ปัจจัยที่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ซึ่งควบคุมความยาว w นั้นยังไม่ได้มีการค้นพบ อย่างไรก็ตามความถี่ในการแตกแขนงดูเหมือนว่าจะมีความสัมพันธ์กันกับ w ผลกระทบจากการแตกแขนงถูกแสดงออกโดยตัวผ่าเหล่าของ Aspergillus nidulans เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่พบว่ามีค่า w ต่ำกว่าแต่มีความถี่ในการแตกแขนงมากกว่าจึงทำให้มีความหนาแน่นของไฮฟ่ามากกว่า (Bainbridge & Trinci, 1969)

Trinci (1970) ได้เปรียบเทียบอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีของก้อนเม็ดไฮฟ่าสำหรับ A. nidulans ที่เจริญเติบโตอยู่ในสื่อกลางอาหารเหลวซึ่งถูกกวนหรือคนกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีของโคโลนีที่เจริญเติบโตอยู่บนผิววุ้นสำหรับสื่อกลางอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตามรัศมีของโคโลนีบนผิววุ้นจะประมาณเป็นสองเท่าของก้อนเม็ดไฮฟ่าในสื่อกลางอาหารเหลว จึงเสนอว่าความกว้างของบริเวณที่มีการเจริญเติบโตในก้อนเม็ดไฮฟ่าจะประมาณเป็นครึ่งหนึ่งของโคโลนีบนผิววุ้น สาเหตุแห่งความแตกต่างในการควบคุมความกว้างของหน่วยการเจริญเติบโตในก้อนเม็ดและไฮฟ่าอากาศนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ผลลัพธ์เช่นนี้อาจถือได้ว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวลสำหรับฟังไจถูกกำหนดโดย $dx/dt = \mu n m_u x$ ซึ่งทั้ง n คือจำนวนแขนงไฮฟ่าต่อหน่วยชีวมวล และ m_u คือมวลของหน่วยการเจริญเติบโตซึ่งเป็นค่าที่อาจเปลี่ยนแปลงได้

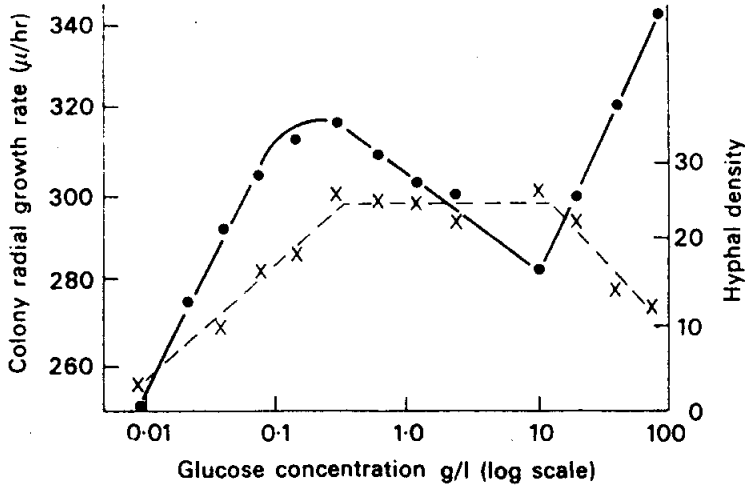
23.4.3 ผลกระทบจากความเข้มข้นของซับสเตรต

อิทธิพลเนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนีสำหรับ Aspergillus nidulans ได้แสดงไว้ในรูปที่ 23.4 สำหรับฟังไจพวกอื่นก็ได้เส้นกราฟในลักษณะเดียวกันโดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (Trinci, 1969)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของฟังกัลโคโลนีต่อความเข้มข้นของซับสเตรตไม่ได้คล้อยตามความสัมพันธ์ $K_r \propto s_0^{1/2}$ เหมือนดังโคโลนีแบคทีเรีย Pirt (1973b) ได้สรุปไว้ว่าถ้ามีซับสเตรตที่ความเข้มข้นต่ำจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของโคโลนีฟังไจในรูปแบบของ Monod คือ

$$K_r = K_{r(max)} s_0/(s_0 + K_s) \qquad 23.10$$

เนื่องจาก $K_r = \mu w$ ดังนั้นถ้า w มีค่าคงที่ก็อาจสามารถคำนวนหาค่าความอิ่มตัวคงที่ (K_s) ได้จากการวัดอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนี ค่าที่ได้สำหรับฟังไจก็ประมาณใกล้เคียงกันกับที่ได้รายงานไว้แล้วในตารางที่ 2.1 สำหรับโปรติสต่าง ๆ



รูปที่ 23.4 Effect of glucose concentration on radial growth rate (●) and hyphal density (X) of *Aspergillus nidulans* colonies. (Reproduced from Trinci, 1969)

ส่วนค่าของ $K_{r(max)}$ จะได้จากการลากเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/K_r$ กับ $1/s_0$ (Pirt, 1973b) ซึ่งก็ใกล้เคียงกันกับค่าสูงสุดที่ได้จากการทดลองและที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าค่าซึ่งทำให้ได้อัตราความเร็วสูงสุดในการเจริญเติบโตของโคโลนีอาจทำให้ได้ค่า K_r ลดลง การลดลงเช่นนี้ถูกชดว่ามีสาเหตุมาจากการลดลงของค่า w สำหรับ Aspergillus nidulans (Trinci, 1971)

A. nidulans เป็นเชื้อราที่ได้รับการยกเว้นคือเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงเกินกว่า 10 กรัม/ลิตรค่า K_r ก็จะเริ่มสูงขึ้นอีก ผลลัพธ์เช่นนี้มีผลทำให้มีการ

ลดลงของความหนาแน่นไอฟ่า แต่เป็นที่น่าสังเกตุว่ามักมีการเจริญเติบโตอยู่บ้างเล็กน้อย เสมอแม้ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในวุ้นอาหารจะมีค่าเป็นศูนย์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีสิ่งเจือปนอยู่ในเนื้อวุ้นทำหน้าที่เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนได้ ผลลัพธ์เช่นนี้ชี้แสดงว่าความต่างระดับในความเข้มข้นของสารอาหารที่เกิดขึ้นรอบ ๆ ไอฟ่าน่าลองของโคโลนีฟังไจบนผิววุ้นอาหารนั้นอาจละทิ้งได้เช่นเดียวกันกับกรณีที่ได้ปรากฏขึ้นสำหรับการใช้ซับสเตรตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (ตอนที่ 9.6.2) ผลกระทบจากความคับแคบคาร์บอนไดออกไซด์จำเป็นต้องสืบสวนต่อไปเนื่องจากดูเสมือนว่าความเข้มข้นของแหล่งธาตุคาร์บอนที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของโคโลนีอาจไม่ทำให้เกิดความเครียดคาร์บอนไดออกไซด์อย่างเพียงพอจนทำให้แน่ใจได้ว่าคาร์บอนไดออกไซด์ไม่ได้เป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (ตอนที่ 8.10)

23.5 สรุป

การเจริญเติบโตตามกฎเส้นตรงของโคโลนีแบคทีเรียและฟังไจใช้ได้กับแบบจำลองในตอนที่ 23.2 อย่างไรก็ตามความหมายของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตคงที่ตามรัศมี K_r จะแตกต่างกันสำหรับโคโลนีของแบคทีเรียและฟังไจที่เป็นเส้นสาย สำหรับฟังไจได้ถูกแสดงออกว่ามีค่า K_r เป็นผลลัพธ์เนื่องมาจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (μ) และความกว้างของบริเวณที่มีการเจริญเติบโตรอบนอก (w) ซึ่ง $\mu=\mu_m s_0/(s_0+K_s)$ และ s_0 คือความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต แต่สำหรับแบคทีเรียมักปรากฏว่า $K_r \propto \mu^{1/2}(s_0^{1/2}-s_i^{1/2})$ ซึ่ง s_i คือขีดเริ่มต้นความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (ซับสเตรตจะต้องมีความเข้มข้นถึงระดับนี้เสียก่อนจึงจะมีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นได้) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_r กับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะอาจถูกใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในการศึกษาเชิงปริมาณเกี่ยวกับอิทธิพลของสารอาหาร สารยับยั้งและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของโคโลนี.