บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ได้รับมาจากคุณเศรษฐา คิริพินทุ์ ซึ่งแยกโดยวางรากอ้อยบนอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน คัดเลือกจนได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จากการแยกด้วยวิธีดังกล่าว แบคทีเรียที่แยกได้จึงต้องมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และจากการศึกษาของคุณเศรษฐา คิริพินทุ์ ได้แบ่งแบคทีเรียที่แยกได้ออกเป็น 3 สกุล คือ Azotobacter , Azomonas และ Beijerinckia ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกเอา Azotobacter มาศึกษา เนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามี ARA สูงมากคืออยู่ในช่วง 480-1210 นาโนโมล ของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อวัน (เศรษฐา คิริพินทุ์) ด้วยเหตุที่ Azotobacter spp. มีหลายชนิด และวัตถุประสงค์ของการวิจัยจะต้องใช้ Azotobacter ที่มีความไวต่อยาเตรทตราซัยคลินและคานามัยซิน จากการทดลองพบว่า Azotobacter ที่เหมาะสมมีเพียง 2 สายพันธุ์ และเนื่องจากสายพันธุ์ทั้งสองให้ลักษณะโคโลนีและเม็ดสีแตกต่างกัน มีแนวโน้มในขั้นต้นว่าอาจเป็น Azotobacter ต่างชนิดกัน จึงได้จำแนกชนิดของ Azotobacter 2 สายพันธุ์นั้นโดยอาศัยความแตกต่างในการใช้สารต้นตอคาร์บอนตามหลักการจำแนกสมบัติของ Azotobacter ดังตารางที่ 22 ได้เจริญ Azotobacter ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมี Mannitol, Rhamnose และน้ำแป้ง เป็นสารต้นตอคาร์บอนในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน พบว่า สายพันธุ์หนึ่งที่มีเมือกมากและให้เม็ดสีน้ำตาลดำเป็น Azotobacter chroococcum เพราะไม่สามารถใช้ Rhamnose ได้ ส่วนอีกสายพันธุ์หนึ่งเป็น Azotobacter vinelandii เพราะไม่สามารถใช้น้ำแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้

น่าสังเกตว่า แม้สรีรวิทยาของการเจริญของ Azotobacter 2 ชนิดนี้จะแตกต่างกัน แต่ถ้าพิจารณาในด้านเกี่ยวกับความสามารถในการตรึงไนโตรเจนกลับไม่พบความแตกต่างกัน เช่น ค่าแบ่งตัวสองเท่า (Doubling time) ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนและไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนจะได้ค่าเท่ากันคือ 3.30 ชั่วโมง ค่าการเจริญสูงสุดในภาวะเดียวกัน

ตารางที่ 16 สมบัติต่าง ๆ ของ Azotobacter spp.(1)

	1. *Azotobacter chroococcum*	2. *Azotobacter beijerinckii*	3. *Azotobacter vinelandii*	4. *Azotobacter paspali*
Pigments				
Water-soluble fluorescence	None	None	Green	Green
Water-insoluble in cells	Black	Cinnamon		
Carbohydrate utilization				
Starch	+	−	−	−
Mannitol	+	−	+	−
Rhamnose	−	−	+	−
Motility	+	−	+	+
Flagella				
Peritrichous	+		+	+
Lophotrichous				
Monotrichous				
Cysts formed	+	+	+	+
Capsular slime produced	+	+	+	+
Habitat usually soil	+	+	+	+
Habitat limited to fresh water				
DNA base ratio GC%	65–66	66	66	63–65

(1) จาก Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974) Burgey's manual of determinative bacteriology, pp. 253 - 255.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เท่ากับ 170 KU. สำหรับ A. vinelandii และ 180 KU. สำหรับ A. chroococcum และค่า ARA เท่ากับ 6.7 และ 7.2 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง สำหรับ A. vinelandii และ A. chroococcum ตามลำดับ จะสังเกตเห็นว่าเมื่อการเจริญของ Azotobacter เข้าสู่ stationary phase ค่า ARA จะลดลง ทั้งนี้ก็เพราะที่ stationary phase มีอัตราการสร้างโปรตีนลดลงรวมทั้งตัวกระตุ้นที่เป็นโปรตีนจากยีน ntr ด้วย ทำให้มีการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนสลดลง ค่า ARA จึงลดต่ำลงด้วย ข้อมูลเหล่านี้เป็นเครื่องหมายทางอ้อมว่า เมตาบอลิสม เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนในแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้คล้ายคลึงกันไม่ว่าในแง่ของต้นตอ ATP หรือต้นตอของอำนาจรีดิวซ์ก็ตาม และเมื่อเจริญ Azotobacter ทั้ง 2 ชนิดในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 มิลลิโมลาร์เป็นสารต้นตอไนโตรเจน ก็ไม่พบค่า ARA เลย ซึ่งแสดงว่าการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ไนโตรจิเนสใน Azotobacter ทั้ง 2 ชนิดควรมีลักษณะเดียวกับที่พบในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ กล่าวคือการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนส จะถูกกดดันไว้ในสภาวะที่มีอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูงโดยในสภาวะดังกล่าวยีน nif L จะสร้างโปรตีนไปกดดันทำให้ยีนการสร้างไนโตรจิเนสไม่สามารถถอดรหัสได้ (Merrick และคณะ, 1982) และด้วยเหตุที่โปรตีนจากยีน nif A สำคัญสำหรับการถอดรหัสยีนการสร้างไนโตรจิเนส (Buchanan และคณะ,1980) ในงานวิจัยนี้จึงได้เคลื่อนพลาสมิดที่มียีน nif A เข้าสู่เซลล์ของ Azotobacter พลาสมิดนี้คือ pCK3

พลาสมิด pCK3 เป็นอนุพันธุ์ของพลาสมิด pRK290 มียีน nif A จาก Klebsiella pneumoniae และยีนต้านยาเตตราซัยคลินและคานามัยซิน เนื่องจากพลาสมิด pCK3 มีขนาด 27 kb ซึ่งนับได้ว่าใหญ่มาก พลาสมิดขนาดใหญ่จะทำให้ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์เมชั่นลดต่ำลง ใน Escherichia coli ถ้าพลาสมิดดีเอนเอมีขนาด 9.5 kb (pSY343) ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มจะลดลงจากพลาสมิดที่มีขนาด 4.3 kb (pBR322) ถึง 10^2 เท่า (Maniatis et al., 1983) ในกรณีที่ขนาดของพลาสมิดใหญ่มากขึ้น การเพิ่มโอกาสในการได้ทรานสฟอร์แมนท์อาจทำได้ด้วยการเพิ่มปริมาณของพลาสมิดดีเอนเอ เช่น ใน Escherichia coli ถ้าจะทรานสฟอร์มพลาสมิด pBR322 ก็จะใช้ประมาณ 30-50 นาโนกรัมพลาสมิด แต่ถ้าเป็นพลาสมิด pSY343

ก็อาจเพิ่มขึ้นเป็น 100 นาโนกรัมพลาสมิด (จรัญญา, 2528) สำหรับพลาสมิด pCK3 นั้น ปริมาณของพลาสมิดที่ใช้ก็จะต้องมากขึ้นไปอีก เนื่องจากพลาสมิด pCK3 เป็นอนุพันธุ์ของ pRK290 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Ditta et al, 1980; Meyer et al, 1982; 1977; Fegurski et al, 1979; Kornacki et al, 1986) ดังนั้นในการเตรียมพลาสมิดปริมาณมาก ๆ จะต้องใช้เซลล์ที่มีพลาสมิดนี้ปริมาณมากด้วยจึงทำให้กระบวนการทรานสฟอร์เมชั่นยุ่งยาก ด้วยเหตุนี้จึงใช้วิธีนำพลาสมิด pCK3 เข้าเซลล์ Azotobacter 2 วิธีการ คือการคอนจูเกชั่นโดยใช้ helping plasmid ที่ชื่อ pRK2013 พา pCK3 เข้าเซลล์ ในการวิจัยนี้ก็ได้อาศัยวิธีการดังกล่าวพบว่าประสิทธิภาพของการคอนจูเกชั่นของ A. vinelandii และ A. chroococcum เท่ากับ 1.8×10^8 และ 6.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (มิได้รายงานไว้ในผลการทดลอง) ในขณะเดียวกันได้มีการรายงานว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ Azotobacter โดยเตรียม competent cells ด้วยการเลี้ยงเซลล์ของ Azotobacter ใน TF medium (Glick และคณะ, 1985; Page, 1981; David และคณะ, 1981; Page และคณะ, 1979; 1978; Page และ Sadoff, 1976 a; b)

น่าสังเกตว่า TF medium เป็นอาหารที่ขาดอิออนเหล็ก ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ที่สำคัญของไซโตโครม และเนื่องจาก Azotobacter เป็นแบคทีเรียที่จะเจริญได้เมื่อมีออกซิเจนอยู่เท่านั้น ดังนั้นการเลี้ยงในอาหารที่ขาดอิออนเหล็กจึงอาจทำให้รูปแบบการเจริญผิดแปลกไปเพราะความผิดปกติของไซโตโครมที่อาจเกิดขึ้นได้ แต่จากผลการทดลองนั้นได้ค่าความขุ่นของการเจริญในอาหารที่มีและไม่มีอิออนเหล็กเทียบเท่ากัน Page และ Tigerstrom ได้รายงานว่าเยื่อเซลล์ของ Azotobacter ที่เจริญในอาหารที่ขาดอิออนเหล็กมีโปรตีนเพิ่มขึ้น 4 ชนิด มีขนาด 9,300, 8,500, 7,700 และ 60,000 dalton และโปรตีนเหล่านี้อาจมีส่วนช่วยให้เซลล์ของ Azotobacter เหมาะในการรับดีเอนเอก็ได้ (Page และ Tigerstrom, 1982; Page และ Huyer, 1984)

อนึ่งข้อได้เปรียบของการทำทรานสฟอร์เมชั่นแทนคอนจูเกชั่นคือทำให้ศึกษาผลของพลาสมิด pCK3 ได้โดยตรงไม่ต้องพะวงถึงผลกระทบของพลาสมิด pRK2013 ซึ่งเป็น helping plasmid ที่มียีนต้านยาคานามัยซินอยู่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกทรานสฟอร์-

แมนท์มาศึกษาแทนคอนจูแกนท์อีกครั้งหนึ่งที่พบว่ามีความแตกต่างกันในแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ กล่าวคือ แม้ว่าจะเตรียม competent cells ด้วยกระบวนการเดียวกัน และทำทรานส์ฟอร์เมชั่นด้วยวิธีการเหมือนกันทุกอย่าง แต่ทว่าประสิทธิภาพของการทรานส์ฟอร์เมชั่นก็แตกต่างกันคือเท่ากับ 1.2×10^9 และ 2×10^7 เซลล์ต่อกรัมของพลาสมิดสำหรับ A. vinelandii และ A. chroococcum ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าจำนวน competant cells ของ A. vinelandii และ A. chroococcum มีปริมาณแตกต่างกัน เนื่องจากได้เลือกทรานส์ฟอร์แมนท์บนอาหารที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ 2 รูปแบบคือ รูปแบบที่หนึ่งเสริมด้วยเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานามัยซิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่ปรากฏทรานส์ฟอร์แมนท์เลยในรูปแบบที่สองเสริมด้วยเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ทรานส์ฟอร์แมนท์ยืนได้ หลายหลังจากการสุ่มทรานส์ฟอร์แมนท์ของ Azotobacter ทั้ง 2 ชนิด ๆ ละ 25 สายพันธุ์มาทำให้บริสุทธิ์แล้ว ในขั้นแรกก็ได้พยายามเจริญสายพันธุ์ทั้ง 50 สายพันธุ์ในอาหารที่มีทั้งเตรทตราซัยคลินและคานามัยซินอย่างละ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดยืนได้เลย ในขณะทำการทดลองอยู่แม้จะยังไม่พบว่าสายพันธุ์ของทรานส์ฟอร์แมนท์สามารถต้านทานคานามัยซินได้ แต่ก็พบว่าในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Ammonimum acetate เสริมอยู่ 15 มิลลิโมลาร์นั้นทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii และ A. chroococcum มีค่า ARA เท่ากับ 33-60 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ซึ่งแม้ว่าจะเป็นค่าแอคติวิตีที่ต่ำแต่ก็สูงมากเมื่อเทียบกับ WT ซึ่งไม่ให้ค่า ARA เลย เมื่อเป็นเช่นนี้ก็น่าจะหมายความว่าได้แยกสายพันธุ์ที่การถอดรหัสของไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดันได้แล้ว ถ้าเป็นจริงสายพันธุ์ที่ได้ควรจะต้านยาคานามัยซินด้วย เพราะยีน nif A และยีนต้านยาคานามัยซินอาศัยโปรโมเตอร์เดียวกัน ด้วยเหตุนี้จึงได้พยายามลดปริมาณของคานามัยซินลงมาจนในที่สุดได้พบความแตกต่างระหว่าง WT และทรานส์ฟอร์แมนท์เมื่อลดปริมาณของคานามัยซินจนเหลือเพียง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นว่า เมื่อการเจริญของทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3 เข้าสู่ stationary phase ค่า ARA จะค่อนข้างคงที่ต่างจาก WT เป็นการยืนยันว่าในทรานส์ฟอร์แมนท์มีการสร้างโปรตีนจากยีน nif A ในพลาสมิด pCK3 มากระตุ้นการถอด

รหัสเอนไซม์ไนโตรจิเนสนอกเหนือจากที่ถูกกระตุ้นให้สร้าง โดยยีน ntr ใน Azotobacter เอง นี้เป็นข้อบ่งชี้ว่ายีน nif A ใน pCK3 น่าจะเป็นตัวการสำคัญในการปลดปล่อยยีนโครงสร้างไนโตรจิเนสใน Azotobacterทั้งสองชนิด แม้ว่าสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้จะไม่ได้เป็น Nif⁻ เช่นเดียวกับสายพันธุ์ที่ Kennedy และ Robson ใช้ในการศึกษาผลของยีน nif A ที่มีอยู่ในพลาสมิด pCK1 (Kennedy และ Robson, 1983)

การที่ทรานสฟอร์แมนท์ของ Azotobacter ต้านยาคานามัยซินได้น้อยเพียง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของ Azotobacter ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ซึ่งเป็น Nif⁺ สามารถสร้างโปรตีนของ nif L ได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูง ทำให้การจับของโปรตีนของ nif A ที่สร้างจากพลาสมิด pCK3 กับโปรโมเตอร์ของยีนไนโตรจิเนสอื่น ๆ ถูกแย่งโดยโปรตีนของ nif L ที่สร้างจากโครโมโซมของเซลล์ Azotobacter เอง หรืออีกประการหนึ่งอาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพในการถอดรหัสของ pCK3 ในเซลล์ของ Azotobacter ต่ำเพราะความไม่เหมาะสมระหว่าง RNA polymerase ของ Azotobacter กับโปรโมเตอร์ของ pCK3 ก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากได้แยกทรานสฟอร์แมนท์ของ Escherichia coli ที่มีพลาสมิด pCK3 ตัวเดียวกันนี้ได้และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเตรทตราซัยคลิน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและคานามัยซินถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการที่ Kennedy และ Drummond สามารถแยกคอนจูแกนท์ของ Azotobacter ที่มี pCK3 ได้ และสามารถต้านยาคานามัยซินได้ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kennedy และ Drummond , 1985) ในงานวิจัยนี้จึงได้พยายามสร้างมิวแทนท์ที่ยีนไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดันซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสสูงขึ้น โดยวางเป้าหมายว่าอย่างน้อยให้ได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถต้านยาคานามัยซินได้ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลักการที่ใช้ก็คือ การกลายพันธุ์ทรานสฟอร์แมนท์ของ Azotobacter ที่มีพลาสมิด pCK3 ด้วย NTG สิ่งที่ต้องเผชิญหน้าก็คือการที่แบคทีเรียจะสามารถต้านคานามัยซินได้โดยการถูกกลายพันธุ์ที่โครโมโซมแทนการกลายพันธุ์ที่พลาสมิด pCK3และ Azotobacterก็มีโครโมโซม

จำนวนมากถึง 40 เท่าของ E. coli (Robson, 1984; Sadoff และคณะ, 1979) ด้วยเหตุนี้จึงต้องวางเงื่อนไขการเลือกมิวแทนท์โดยการตั้งสมมติฐานว่า มิวแทนท์ที่ถูกกลายพันธุ์บนพลาสมิด pCK3 จะสามารถต้านยาคานามัยซินได้ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จะไม่สามารถต้านยาคามามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ ทั้งนี้เพราะโปรโมเตอร์ของพลาสมิด pCK3 ซึ่งได้มาจากพลาสมิด pRK290 นั้น ไม่เอื้ออำนวยที่จะทำให้แบคทีเรียต้านยาคานามัยซินได้ดีมาก

ผลการทดลองที่ได้ตรงกับสมมติฐานที่ตั้งไว้คือในจำนวนประมาณ 4,000 โคโลนีที่ต้านคานามัยซิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้นั้น มีเพียง 19 โคโลนีที่ไม่สามารถต้านคานามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์แล้วยังต้องปรับตัวต่อไปอีก ดังนั้นเมื่อทำการทดลองผ่านไปจึงเหลือเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่มีแนวโน้มว่าจะถูกกลายพันธุ์บนพลาสมิด pCK3 คือ TF239(pCK3*)

ครั้นเมื่อนำ TF239(pCK3*) ไปทำการทดลอง ได้พบคุณสมบัติของการเป็นออกโซโทรป จึงตัดสินใจสกัดพลาสมิดออกมาและทำทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่ Azotobacter WT ใหม่ ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำได้และยังสามารถต้านคานามัยซินได้ถึง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย จากผลการย่อย pCK3 และ pCK3* ด้วย Restricition endonuclease ที่ชื่อ EcoRI และ Sal I ไม่ปรากฏความแตกต่างของพลาสมิดทั้งสอง แต่จากผลการเปรียบเทียบค่า ARA ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 มิลลิโมลาร์เป็นสารต้นตอไนโตรเจน พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii และ A. chroococcum คือ TF2(pCK3*) และ TFC2(pCK3*) ตามลำดับ มีค่า ARA สูงสุดเท่ากับ 0.84 และ 0.78 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่ WT ไม่พบค่า ARA เลย และ TF23(pCK3) ซึ่งเป็นทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3 ของ A. vinelandii มีค่า ARA สูงสุดในภาวะเดียวกันเพียง 0.063 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง จะเห็นว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3* มีค่า ARA สูงกว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3 ถึง 13 เท่า แสดงว่าภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG ได้มีเบสบางตัวที่โปรโมเตอร์ของยีน nif A และยีนต้านยาคานามัยซินของ pCK3 เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ RNA polymerase ของ Azotobacter จับกับโปรโมเตอร์ของ

pCK3* ได้ดีขึ้น สามารถถอดรหัสยีน nif A และให้โปรตีนของ nif A ไปกระตุ้นการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนสได้มากขึ้น ทำให้ได้สายพันธุ์ของ Azotobacter ที่มีสมบัติปลดปล่อยการถอดรหัสไนโตรจิเนสได้ดีขึ้น

Sweet และ Burris ได้รายงานในปี 1981 ว่าอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณต่ำ ๆ (ไม่เกิน 0.2 มิลลิโมลาร์) มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ Rhodospirillum rubrum ในปี 1984 Ceijudoและคณะก็รายงานปรากฏการณ์ทำนองเดียวกันใน A. vinelandii และในปี 1986 Hartmann และคณะได้รายงานปรากฏการณ์นี้ใน Azospirillum spp. อีกด้วย รายงานเรื่องนี้นับว่าน่าสนใจมากเพราะไม่พบปรากฏการณ์นี้ใน Klebsiella pneumoniae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาผลของอนุมูลอัมโมเนียมต่อการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนส ถึงแม้ว่ากลไกการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสนี้จะยังไม่ทราบรายละเอียดแน่ชัดแต่เนื่องจากพบว่าไม่มีปรากฏการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นกับเอนไซม์ที่สกัดออกมาจากเซลล์ และเมื่อใช้ตัวยับยั้งในกระบวนการสะสมอนุมูลอัมโมเนียม เช่น L-methionine -DL-sulfoximine, L-methionine sulfone เป็นต้น เซลล์จะไม่ถูกยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนส จึงมีสมมติฐานเกี่ยวกับปรากฏการณ์นี้ว่าเกิดจากเมตาบอไลท์ของอนุมูลอัมโมเนียมที่สะสมอยู่ภายในเซลล์เป็น Feedback inhibition (Laane และคณะ, 1980; Sweet และ Burris, 1981; Gordon และคณะ, 1981; Cejudo และคณะ, 1984; Hartmann และคณะ, 1986) เมื่อสร้างทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3* ที่การถอดรหัสไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดันได้ จึงน่าจะศึกษาผลการยับยั้งของอนุมูลอัมโมเนียมในทรานสฟอร์แมนท์เพื่อเปรียบเทียบกับ WT โดยใช้ Ammonium chloride 0.03, 0.05, 0.07 และ 0.15 มิลลิโมลาร์ เติมลงในคัลเจอร์ที่เจริญในสารอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจนจนถึงระยะที่มีค่า ARA สูงสุด โดยมี control คือไม่มี Ammonium chloride คำนวณค่า Ki จากการทำ Dixon plot และพบว่า Ki ของ A. vinelandii WT เท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ของ Ammonium chloride ส่วน Ki ของ TF2(pCK3*) เท่ากับ 0.18 มิลลิโมลาร์ของ Ammonium chloride จะเห็นว่า Ki ของ TF2(pCK3*) มากเป็น 2 เท่าของ WT แสดงว่าการยับยั้งแอคติวิตีของไนโตรจิเนสใน TF2(pCK3*) มีแนวโน้มว่าต้องใช้อนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูงกว่า WT จึงจะให้ผลในการยับยั้งเท่ากัน

หรืออาจกล่าวได้ว่าในเซลล์ของ TF2(pCK3*) มีเอนไซม์ไนโตรจิเนสมากกว่า WT

เนื่องจากอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยได้ทำรายได้เข้าประเทศถึง 12,897 ล้านบาทในปี พ.ศ. 2525 นับเป็นอันดับที่สามรองจากข้าวและมันสำปะหลัง (เกษม, 2527) และยังให้ผลผลิตอื่น ๆ เช่น อัลกอฮอล์ หรือใช้เป็นวัตถุดิบผลิตสารเคมีบางชนิดอันได้แก่ สารเคลือบผิว เป็นต้น แม้แต่ชานอ้อยก็ใช้เป็นเชื้อเพลิง ทำเยื่อกระดาษ พลาสติค หรือปุ๋ยได้ แต่ต้นทุนในการปลูกอ้อยสูงมากถึง 2,500 บาทต่อไร่ ซึ่งในตัวเลขนี้ยังไม่รวมค่าตัดและค่าขนส่ง ถ้าสามารถเพิ่มผลผลิตหรือลดค่าใช้จ่ายในการซื้อปุ๋ยลงได้จะช่วยให้ต้นทุนในการปลูกอ้อยต่ำลง ปริมาณการใช้ปุ๋ยในการปลูกอ้อยจะแตกต่างกันไปตามสภาพของดินและสำหรับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจะใช้ค่าอินทรียวัตถุในดินเป็นเกณฑ์ (ยงยุทธ, 2528) โดยที่ค่าอินทรียวัตถุ 1-5% จะเทียบเท่ากับ 2 กรัมไนโตรเจน โดยทั่วไปในดินจะมีค่าอินทรียวัตถุอยู่ในช่วง 0.5-2.5% จึงเลือกปุ๋ยที่ใช้ในการปลูกอ้อยสูตร 12-10-18 หรือ 15-15-15 หรือ 14-9-20 (อุดม, 2529; เกษม, 2527 ; สถาบัตย์, 2527) ถ้าในพื้นที่ 1 ไร่ปลูกได้ประมาณ 3,000 ต้นและใช้ปุ๋ยสูตร 12-10-18 ประมาณ 50 กิโลกรัมต่อไร่แล้วอ้อย 1 ต้นจะใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 2 กรัม ในการวิจัยนี้เลือกใช้ Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์เป็นปุ๋ยไนโตรเจน เมื่อคำนวณจากความเข้มข้นและปริมาณของสารอาหารที่ใช้ปลูกอ้อยแต่ละต้นตั้งแต่เริ่มจนถึงเก็บผลใช้ปุ๋ยไปประมาณ 1.5 กรัมต่อต้น ซึ่งก็เป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่ชาวไร่อ้อยใช้ในการวิจัยนี้พบว่าเมื่อปลูกอ้อยในสารอาหารที่ปราศจาก Ammonium sulfate พบว่า A. vinelandii WT ทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบอ้อยเพิ่มขึ้น 56-105% แต่เมื่อมี Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์จะเพิ่มขึ้น 29-36% ในขณะที่ Jadhav และ Andhal พบว่าเพิ่มขึ้น 14% (Jadhave และ Andhal, 1976) ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากสภาพอากาศ พันธุ์ของอ้อยหรือแม้แต่สายพันธุ์ของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิจัยนี้ทำการทดลองใน Leonard jar และควบคุมสารอาหารที่ใช้ปลูกอ้อย อย่างไรก็ตามผลที่ได้นี้ก็ยืนยันว่า Azotobacter ช่วยเพิ่มผลผลิตของอ้อยได้ เพื่อให้การพิจารณาผลกระทบของ Azotobacter ต่ออ้อยสะดวกขึ้นจึงได้คำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งและ ARA ของอ้อยที่มี WT อยู่ร่วมด้วยเป็น 100 ดังในตารางที่ 20 และ 21

เมื่อพิจารณาผลกระทบของ Azotobacter สายพันธุ์ TF23(pCK3) และ TF2(pCK3*)

ที่มีต่อน้ำหนักแห้งของอ้อย พบว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ทั้งสองสายพันธุ์ ทำให้น้ำหนักแห้งของอ้อยสูงกว่า WT น่าสังเกตว่า แม้จะปลูกอ้อยในสารอาหารที่มี Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์ก็ยังสามารถวัดค่า ARA จากรากอ้อยที่ปลูกร่วมกับ WT ได้ ทั้งนี้ก็เพราะว่าอนุมูลอัมโมเนียมที่มีอยู่ในสารอาหารบางส่วนถูกอ้อยใช้ไป อย่างไรก็ตามพบว่าค่า ARA จากรากอ้อยที่ปลูกร่วมกับ WT ในสารอาหารที่มี Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์ลดลงจากในสารอาหารที่ไม่มี Ammonium sulfate ถึง 82-92% (คำนวณจากตารางที่ 16 และ 19) ในขณะที่ TF23(pCK3) จะลดลง 68% และ TF2(pCK3*) จะลดลงเพียง 24% ย่อมแสดงว่าอนุมูลอัมโมเนียมที่มีอยู่ในสารอาหารมีผลในการกดดันการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนสของ TF2(pCK3*) น้อยมากเมื่อเทียบกับ WT แม้จะอยู่ในสภาวะที่ต้องเจริญร่วมกับรากอ้อยก็ตาม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย