หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 Azotobacter ในฐานะแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระหรือที่นิยมเรียกว่า 'diazotroph' นั้น อาจแบ่งได้ 3 ประเภท ตามความสามารถในการใช้ตัวรับอิเลคตรอนเพื่อการเจริญเติบโต ได้แก่

1.1.1 แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนเท่านั้นจึงจะเจริญได้ (Obligatory aerophilic bacteria) ได้แก่ Azotobacter แบคทีเรียประเภทนี้จะตรึงไนโตรเจนได้เฉพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

1.1.2 แบคทีเรียที่เจริญได้โดยปราศจากออกซิเจนเท่านั้น (Obligatory anaerophilic bacteria) ได้แก่ Clostridium แบคทีเรียประเภทนี้จะตรึงไนโตรเจนได้เฉพาะในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนเท่านั้น

1.1.3 แบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative bacteria) ได้แก่ Klebsiella แบคทีเรียประเภทนี้จะตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนเท่านั้น ทั้ง ๆ ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนอีกด้วย

Azotobacter spp. เป็นแบคทีเรียกรัมลบ มี 4 ชนิดคือ A.beijerinckii, A. paspali, A. chroococcum และ A.vinelandii ในธรรมชาติอาจแยก Azotobacter ได้จากดินหรือบริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere) บนผิวของรากพืช (Rhizoplane)(Dayan และคณะ, 1977; Greaves และ Darbyshire, 1972; Northcote และ Pickett-Heaps, 1966) หรือแม้แต่ในบริเวณเนื้อเยื่อของรากพืชด้วย (Patel และคณะ, 1985) โดยหลักการ อาจแยก Azotobacter spp. จากพืชตัวอย่าง โดยนำส่วนของรากพืชมาวางพาดบนจานอาหารสูตรของ Burk ซึ่งไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน เมื่อมีโคโลนีเกิดขึ้นจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์และคัดแยกแบคทีเรียนั้นต่อไป Azotobacterที่เจริญในสภาพอิสระจะสร้างเมือก(slime)

ออกมามาก บางชนิดก็ให้เม็ดสีต่าง ๆ กัน ลักษณะของเซลล์เป็นรูปกลมรี แต่อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาวะแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ Azotobacter จะสร้าง cyst และจะทนอยู่ในสภาพ cyst จนกว่าจะมีสารอาหารที่มีกลูโคสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอนจึงจะเปลี่ยนกลับเป็น vegetative cells อีกครั้งหนึ่ง (Wyss,et al, 1961) ในปีค.ศ. 1980 Partriquin และคณะได้นำท่อนพันธุ์อ้อยที่กำลังงอกมาแยกแบคทีเรีย และพบว่ามี Azotobacter อยู่ภายใน parenchyma cell เป็นจำนวนมาก แต่พบไม่มากนักในท่อน้ำท่ออาหาร เช่นเดียวกับรายงานของ Purches ในปีเดียวกัน ในปีค.ศ. 1985 Patelและคณะได้กล่าวว่า การที่แบคทีเรียเข้าไปในเนื้อเยื่อของรากพืชช่วยให้ได้รับสารอาหารจากพืชอย่างสม่ำเสมอ และสะดวกในการเคลื่อนย้ายอนุมูลอัมโมเนียมที่แบคทีเรียตรึงได้ สำหรับ Azotobacter สามารถตรึงไนโตรเจนได้อย่างน้อย 10 มิลลิกรัมของไนโตรเจนต่อกรัมของสารตั้งต้นคาร์บอน (Buchanan และ Gibbons, 1974)

ในการศึกษาผลกระทบของการตรึงไนโตรเจนต่อพืชนั้น ก็ทำได้โดยอาศัยการติดตามวัฏแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่นเช่นเดียวกับแบคทีเรียอื่น ๆ นอกจาก Azotobacter จะให้ผลกระทบต่อการตรึงไนโตรเจนแล้วยังให้ออร์โมนที่จำเป็นแก่พืชด้วยได้แก่ Gibberellin (GA3), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Cytokinin (Patel, 1969; Brown และ Burlingham, 1968; Brown, 1976; Jain และ Patriquin, 1984; 1985) ซึ่งออร์โมนเหล่านี้จะช่วยกระตุ้นการสร้างรากฝอยทำให้มีการดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น ในปีค.ศ. 1983 Gonzalez-Lopez และคณะได้พบว่า Azotobacter ยังสามารถสร้างวิตามินซึ่งจะช่วยให้พืชเจริญได้ดีขึ้นอีกด้วย

1.2 บทบาทของ Azotobacter ต่อพืชเศรษฐกิจ

เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของพืชธาตุหนึ่ง ซึ่งถ้าพืชขาดไนโตรเจนจะทำให้แคระแกรนไม่เจริญเติบโตและใบเหลืองซีด (ถวิล, 2528) ในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้ Harber Bosch Process ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีต้องใช้เชื้อเพลิงและต้นทุนการผลิตสูงทำให้ปุ๋ยมีราคาแพง ในธรรมชาติมีกระบวนการทางชีวภาพที่เปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศเป็นอนุมูลอัมโมเนียมเรียกว่า 'กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Biological Nitrogen Fixing Process) ซึ่งในกระบวนการนี้จะประกอบด้วย

ปฏิกิริยาสำคัญคือ ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixing Reaction) ปฏิกิริยานี้เป็นการเปลี่ยนแปลงของก๊าซไนโตรเจนไปเป็นอนุมูลอัมโมเนียมโดยใช้พลังงานในรูปของ ATP และอำนาจรีดิวซ์ (reducing power) โดยมีเอนไซม์ไนโตรจิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังสมการ (Postgate, 1982)

$$N_2 + 29\ ATP + 6\ \bar{e} + 6\ H^+ \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 2NH_3 + 29\ ADP + 29Pi$$

แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ร่วมกับพืช เช่น Rhizobium มาใช้ประโยชน์กับพืชตระกูลถั่ว ก็ตาม แต่พื้นที่ปลูกพืชตระกูลถั่วมีเพียง 10%ของพื้นที่ปลูกพืชทั้งหมดในโลกเท่านั้น (F.A.O., 1984) ดังนั้น จึงมีความหวังว่าจะนำแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระมาทำปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตของพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ Azotobacter จึงเป็นความหวังอันหนึ่ง Tilak และคณะพบว่า Azotobacter ช่วยให้ผลผลิตของข้าวโพดเพิ่มขึ้นถึง 16.1% (Tilak และคณะ, 1982) Zora และคณะก็พบว่า Azotobacter ช่วยให้ผลผลิตของข้าวโพดเพิ่มขึ้นเช่นกัน(Zora และคณะ, 1984) ได้มีรายงานว่า Azotobacter ช่วยลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการปลูกข้าวโพดลงประมาณครึ่งหนึ่ง (Ishac และคณะ, 1984) ในประเทศไทยก็ได้มีการทดลองปลูกข้าวโพดร่วมกับ Azotobacterโดยปลูกในสภาพไร่กสิกรที่จังหวัดปราจีนบุรี พบว่าผลผลิตของข้าวโพดเพิ่มขึ้น 93-133 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งเทียบเท่ากับการใส่ปุ๋ยอัมโมเนียมซัลเฟตถึง 20 กิโลกรัมต่อไร่(บรรหารและคณะ, 2527)

นอกจากนี้ยังพบว่า Azotobacter ช่วยเพิ่มผลผลิตของพืชอื่น ๆ เช่น ผลผลิตของข้าวฟ่างเพิ่มขึ้น 6.2% (Tilak และคณะ, 1982) ผลผลิตของข้าวสาลีเพิ่มขึ้น 4.8-8.8% (Malik และคณะ, 1985) ในปีค.ศ. 1960 Rubenchick ได้ใช้ Azotobacterในรูปของปุ๋ยชีวภาพให้ชื่อว่า Azotobacterin ในการเพิ่มผลผลิตของ หัวผักกาดหวาน แครอท กะหล่ำปลี และทานตะวัน (Rubenchick, 1960)

สำหรับผลของ Azotobacterต่ออ้อยนั้น Jadhav และ Andhal ได้ปลูกอ้อยร่วมกับ Azotobacter พบว่าให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 14% (Jadhav และ Andhal, 1976) 12% ของพื้นที่ปลูกอ้อยในโลกอยู่ที่บราซิลและคิดเป็นพื้นที่ถึง 2.3 ล้านเฮกตาร์ Ruschel และ Vose ได้ประมาณว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนสามารถให้ปุ๋ยไนโตรเจนได้ถึง 16.66 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ (Ruschel และ Vose, 1982) ดังนั้นสำหรับพื้นที่ 2.3 ล้านเฮกตาร์จะได้รับปุ๋ย

ไนโตรเจนจากยบวนการตรึงไนโตรเจนถึง 39,000 ตัน เมื่อคิดราคาปุ๋ยไนโตรเจนในปี 1981 ที่บราซิล ปุ๋ยยูเรียมีราคา 0.68 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัมและปุ๋ยอัมโมเนียมซัลเฟตมีราคา 1 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม ยบวนการตรึงไนโตรเจนสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยอัมโมเนียมลงถึง 26.5 และ 39 ล้านเหรียญสหรัฐใน 12% ของพื้นที่ปลูกข้าวในโลก (Vose, 1983)

1.3 <u>เปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ Azotobacter กับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตร-เจนได้กลุ่มอื่น ๆ</u>

เอนไซม์ไนโตรจิเนสของ <u>Azotobacter</u> spp. ได้รับการทำให้บริสุทธิ์ (Bulen และคณะ, 1965; Kelly, 1968) และพบว่าประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วนเช่นเดียวกับเอนไซม์ไนโตรจิเนสจาก <u>Klebsiella pneumonaiae</u>, <u>Clostridium pasteurianum</u> (Carnahan และคณะ, 1960) หรือ <u>Rhizobium japonicum</u> (Koch และคณะ, 1967) ดังในตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าสมบัติของส่วนประกอบทั้งสองของเอนไซม์ไนโตรจิเนสจาก <u>Azotobacter</u>, <u>Klebsiella</u>, <u>Clostridium</u> หรือ <u>Rhizobium</u> มีความคล้ายคลึงกันมาก เอนไซม์ไนโตรจิ-เนสของ <u>Azotobacter</u> มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นค่อนข้างกว้างสามารถรีดิวซ์ไนโตรเจน อะเซทิลีน โปรตอนได้เช่นเดียวกับของ <u>Klebsiella pneumoniae</u> แต่สามารถถูกยับยั้งแอคติวิตีได้ด้วยอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณต่ำ ๆ (ต่ำกว่า 0.2 มิลลิโมลาร์ Ammonium chloride) (Laane และคณะ, 1980; Gordon และคณะ, 1981; Klugkist และ Haaker, 1984; Cejudo และคณะ, 1984) เช่นเดียวกับในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอื่น ๆ ได้แก่ <u>Rhodospi-rillum rubrum</u> (Sweet และ Burris, 1981) <u>Azospirillum</u> (Hartmann และคณะ, 1986) และพบว่าการยับยั้งนี้จะเกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้น ๆ แล้วแอคติวิตีของเอนไซม์ก็จะกลับคืนมา ซึ่งคาดว่าเนื่องมาจากอนุมูลอัมโมเนียมนั้นได้ถูกใช้หมดไปจากสารอาหารจึงไม่มีตัวยับยั้ง นอกจากนี้ยังพบการยับยั้งแอคติวิตีอันเนื่องมาจากอนุมูลไนเตรท และไนไตรท์ด้วย จากการศึกษาเอนไซม์ที่สกัดจากเซลล์ไม่พบการยับยั้งของอนุมูลเหล่านี้แต่อย่างใด และเมื่อใช้ตัวยับยั้งของกระบวนการสังเคราะห์ประกอบไนโตรเจนก็ไม่พบการยับยั้งเช่นกัน ทำให้คาดคะเนว่า การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสนั้นเกิดจากเมตาบอไลซ์ (metabolize) ของอนุมูลอัมโมเนียม ไนเตรท หรือไนไตรท์ (Cejudo และคณะ, 1984; Cejudo และ Paneque, 1986)

ตารางที่ 1 สมบัติของ Mo Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ [1]

Organism	Mo content g atom mol^{-1}	Fe content g atom mol^{-1}	Labile S^{2-} g atom mol^{-1}	Rel. mol. mass (Kdaltons)	Sub-unit (rel. mol. mass)	Best specific activity nmol C_2H_4 $min^{-1}mg^{-1}$
A. vinelandii	2	34-38	28	216-270	70	1400
A. chroococcum	2	>22	20	222	60	2000
K. pneumoniae	2	32±3	>16	218	50, 60	2150
C. pasteurianum	2	24	24	220	50, 60	2500
R. japonicum	>1	29	26	200	50	1000

(1) จาก Eady, R.R. and Smith, B.E. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. In A treatise on dinitrogen foxation, 1979, pp. 399-490, New York: Wiley Interscience

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สมบัติของ Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ[1]

Organism	Fe content g atom/mol^{1-}	S^{2-}content g atom/mol^{1-}	Rel. mol. mass	Sub-unit rel. mol. mass
A. chroococcum	4	3.9	65.4	~30
K. pneumoniae	4	3.85	66.8	~34
C. pasteurianum	4	4	56	~28
R. lupini	3.1	–	65	~32

(1) จาก Eady, R.R. and Smith, B.E. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. In A treatise on dinitrogen fixation, 1979, pp. 399-490, New York, Wiley Interscience

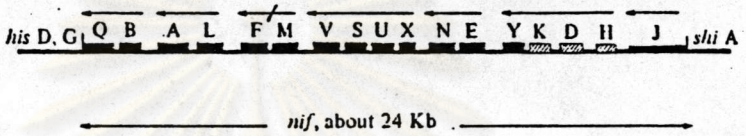
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter จะลดลงในสภาวะแวดล้อมที่มีอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูง (Tubb และ Postgate, 1973) อุณหภูมิสูง (Brooks และคณะ, 1984) pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mishustin และ Shil' Nikova, 1971) เช่นเดียวกับของ Klebsiella pneumoniae ถึงแม้ว่าเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ Azotobacter จะมีความทนต่อออกซิเจน (Oppenheim และคณะ, 1970) แต่ก็พบว่าการตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter จะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง (Robson, 1979; Dalton และ Postgate, 1968; 1969; Drozd และ Postgate, 1970) เช่นเดียวกับ Klebsiella pneumoniae

1.4 ยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส

เกี่ยวกับการจัดเรียงตัวของยีนของไนโตรจิเนสนั้นการศึกษาที่ลึกซึ้งมีอยู่เฉพาะใน Klebsiella pneumoniae ในปัจจุบันทราบแล้วว่า เอนไซม์ไนโตรจิเนสนี้มีอยู่ถึง 7 โอเปอรอน 17 ยีน (Dixon และคณะ, 1980) ลักษณะการเรียงตัวของยีนรวมทั้งทิศทางการถอดรหัส และความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับเอนไซม์ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 และตารางที่ 3 ภายหลังจากทราบตำแหน่งของยีนของไนโตรจิเนส จึงได้มีการตัดยีนของ Klebsiella pneumoniae M5a1 นำไปเชื่อมกับพลาสมิด Col E1 และในที่สุดก็นำไปตัดต่อกับพลาสมิดที่มีเซลล์เจ้าเรือนกว้างเป็นที่รู้จักกันดีคือ RP41 ซึ่งสามารถเคลื่อนเข้าเซลล์แบคทีเรียอื่น ๆ เป็นพลาสมิดที่มีเสถียรภาพสูงมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษายีนของไนโตรจิเนส

เมื่อเทคนิคของการตัดต่อยีน (Recombinant DNA Technics) แพร่หลายมากขึ้น จึงได้มีการตัดยีนไนโตรจิเนสแยกจากกัน พลาสมิดตัวสำคัญตัวหนึ่งซึ่งมียีน nif HDK ที่เป็นยีนโครงสร้างของโปรตีนหน่วยที่ 1 และหน่วยที่ 2 มีชื่อรู้จักกันดีว่า pSA30 จากพลาสมิดดีเอนเอตัวนี้ได้มีผู้นำไปใช้เป็น probe และ hybridize กับโครโมโซมของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ รวมทั้ง Azotobacter ด้วย(Jone และคณะ, 1984; Bishop และคณะ, 1985) จึงทำให้ทราบว่ายีนโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ Azotobacter นั้นก็คล้ายคลึงกับของ Klebsiella pneumoniae รวมทั้งยังทำให้คาดเดาได้ว่าการเรียงตัวของยีน nif HDK. ของ Azotobacter ก็ควรเหมือนกันกับของ Klebsiella pneumoniae M5a1 ด้วย



รูปที่ 1 ยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสใน Klebsiella pneumoniae M5a1 แสดงการเรียงตัวของ 17 ยีน ซึ่งมีขนาดประมาณ 24 kb เครื่องหมายลูกศรแสดงทิศทางของ transcription ของโอเปอรอนทั้ง 7 (จาก Postgate, J.R., 1982)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 โปรตีนต่าง ๆ จากยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส พร้อมทั้งหน้าที่ ได้จากการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนสของ Klebsiella pneumoniae M5a1 (จาก Kennedy และคณะ, 1981)

Gene	Rel. mol. mass of product ('000)	Function of product
Q	unknown	unknown
B	unknown	involved in synthesis or insertion of FeMoco of Kp1
A	57–60	regulatory
L	45–50	regulatory
F	c. 17	codes for a flavodoxin
M	28	activates Kp2
V	42	modifies substrate specificity of Kp1
S	18–45	unknown
U	22–32	unknown
X	18	unknown
N	50	as B
E	40–46	as B
Y	19–24	unknown
K	60	codes for β sub-unit of Kp1
D	56–60	codes for α sub-unit of Kp1
H	31–39	codes for sub-unit of Kp2
J	120	electron input into nitrogenase

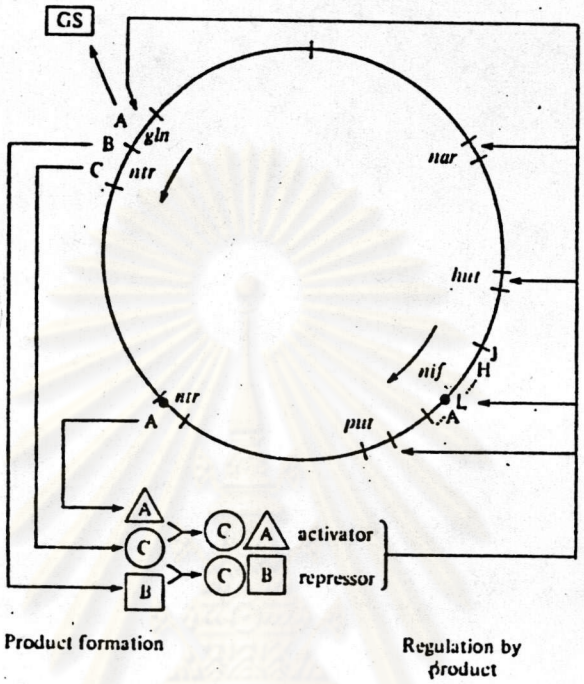
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 การควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนส

จากสิ่งวิทยาการตรึงไนโตรเจนของ Klebsiella pneumoniae M5a1 รวมทั้งแบคทีเรียอื่นทุกชนิดให้ผลตรงกันว่า ในสภาวะแวดล้อมที่มีอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูงเกิน 1 มิลลิโมลาร์หรือมีปริมาณสารตั้นต่อไนโตรเจนปริมาณสูงเกิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนี้ แม้ว่าแบคทีเรียจะเจริญได้ดีแต่จะไม่พบ ARA แต่อย่างใด รวมทั้งยังไม่พบการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนสด้วย (Drozd และคณะ, 1972; Tubb และ Postgate, 1973) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนสในระดับโมเลกุลกันมาก ตัวอย่างเช่น Magasanik ในปีค.ศ. 1977 ได้แสดงว่า Glutamine synthetase(GS) เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนส แต่ต่อมาภายหลังจึงทราบว่า GS ไม่ใช่ตัวควบคุมโดยตรง และ ในที่สุด Postgate ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับการควบคุมการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนสดังรูปที่ 2 กล่าวคือยีน ntr (nitrogen assimilation regulation) ซึ่งประกอบด้วย ntr A, B และ C (แต่เดิมมีชื่อว่า gln F, gln L และ gln G ตามลำดับ) (McFarland และคณะ, 1981) จะให้โปรตีนมาควบคุมการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนสโดยโปรตีนจาก ntr C และ ntr A ประกอบกันเป็นตัวกระตุ้น (activator) ส่วนโปรตีนจาก ntr C และ ntr B จะประกอบกันเป็นตัวกดดัน (repressor) ซึ่งการที่เซลล์จะสร้างตัวกระตุ้นหรือตัวกดดันนั้นขึ้นอยู่กับสภาพของสารอาหารสำหรับเซลล์ในขณะนั้น ๆ เช่นถ้ามีอนุมูลอัมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเซลล์มากก็จะสร้างตัวกดดันขึ้นมา ดังนี้เป็นต้น ตัวกดดันหรือตัวกระตุ้นที่เกิดขึ้นจะไปจับที่โปรโมเตอร์ของ nif L ซึ่งโอเปอรอน nif LA นี้ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไนโตรจิเนส (Drumnond และคณะ, 1983) โดยที่ยีน nif A (Ow และ Ausbel, 1983; Buchanan และคณะ, 1981) จะให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนส ส่วนยีน nif L (Merrick และคณะ, 1982) จะให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกดดันการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนส

1.6 พันธุวิศวกรรมของ Azotobacter

เนื่องจาก Azotobacter เป็นแบคทีเรียที่มีเมือกมาก ดังนั้นในการทำการทดลองเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ การแยกสายพันธุ์ จึงได้รับความยุ่งยาก นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่า Azotobacter มี Redundant gene (Robson, 1984; Sadoff และคณะ, 1979) ซึ่ง



รูปที่ 2 การควบคุมการถอดรหัสยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส โดยยีน ntr ซึ่งควบคุมเกี่ยวกับการนำเข้าของสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งนอกจากจะควบคุมยีนของเอนไซม์ไนโตร-จิเนส แล้วยังควบคุมยีน put (proline oxidation) ยีน hut(histidine oxidation) ยีน nar (nitrate reductase) และยีน gln A (glutamine synthase synthesis) อีกด้วย (จาก Postgate, J.R., 1982)

ทำให้การจัดการเกี่ยวกับยีนยากยิ่งไปอีก เพราะอุปสรรคดังกล่าวจึงทำให้การศึกษาเกี่ยวกับพันธุวิศวกรรมของ Azotobacter เป็นไปได้ช้า ในอดีตการเคลื่อนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ Azotobacterจะต้องใช้วิธีคอนจูเกชั่น และถ้าพลาสมิดนั้นไม่สามารถเคลื่อนตัวเข้าเซลล์เองได้ก็จะต้องใช้ helping plasmid ซึ่งที่นิยมใช้กันก็คือพลาสมิด pRK2013 และ RP4 ในปี 1981 David และคณะได้ใช้ RP4 ช่วยพาพลาสมิด RSF1010 ซึ่งมีสมบัติเป็น Tra^- คือไม่สามารถเคลื่อนตัวเข้าเซลล์เองได้ เข้าสู่เซลล์ของ A.vinelandii ได้ ซึ่งนับว่ามีประโยชน์มากเพราะจากพลาสมิด RSF1010 ได้ถูกนำไปสร้างพลาสมิดอื่น ๆ ได้แก่ pKT210, pKT211, pKT212 และ pKT214 สำหรับวิธีการทรานสฟอร์เมชั่นก็มีการศึกษามานานแล้ว (Page และ Sadoff, 1976 a; 1976 b; Page และ von Tigerstrom, 1978; Page, 1982) แต่ในการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอนเอเข้าสู่เซลล์ของ Azotobacter นั้นยังไม่มีวิธีที่เหมาะสม Page และ Tigerstrom ได้รายงานในปีค.ศ. 1979 ว่าการเตรียม competent cells โดยใช้ calcium chloride ซึ่งใช้ได้ผลดีกับ Escherichia coli นั้นใช้กับ Azotobacterไม่ได้ผล ได้มีการศึกษาและปรับปรุงวิธีการทรานสฟอร์เมชั่นจนในปีค.ศ. 1985 Glick และคณะได้ปรับวิธีการทรานสฟอร์เมชั่นของ Azotobacter โดยใช้เซลล์ที่เลี้ยงใน TF medium ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่ขาดอิออนเหล็กมาทำเป็น competent cells ผลจากการทดลองพบว่า สามารถเคลื่อนพลาสมิด RSF1010 ซึ่งมีขนาด 8.5 kb และพลาสมิดpGSS15 ซึ่งมีขนาด 11.4kb เข้าสู่เซลล์ของ A.vinelandii ได้ด้วยประสิทธิภาพ $3\text{-}4 \times 10^{-4}$ และ 2×10^{-2}เซลล์ต่อไมโครกรัมพลาสมิดต่อเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งนับว่าเป็นวิธีการทรานสฟอร์เมชั่นของ Azotobacter ที่ให้ผลดีที่สุดในขณะนี้

1.7 สมมติฐาน และวัตถุประสงค์ของการวิจัย

เนื่องจากการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนสนั้นถูกกระตุ้นได้ด้วยโปรตีนจากยีน nif A ดังนั้นการนำยีน nif A เข้าสู่เซลล์ในรูปของพลาสมิดซึ่งจะให้โปรตีนจากยีน nif A ได้ตลอดเวลาน่าจะช่วยให้การถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนสเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาด้วย สมมติฐานข้างต้นนี้ได้รับการยืนยันจากการนำยีน nif A ของ Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าสู่เซลล์ของ Klebsiella pneumoniae เอง และพบว่าสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนสได้ (Buchanan และคณะ, 1981) เมื่อเป็นเช่นนี้การนำยีน nif A ของ Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอื่น ๆ ก็อาจจะได้ผลได้

ซึ่ง Sundaresan และคณะได้นำยีน nif A จาก Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าสู่เซลล์ของ Rhizobium meliloti และพบว่าสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนสได้เช่นกัน (Sundaresan และคณะ, 1983) สำหรับ Azotobacter ก็ได้รับการศึกษาโดย Kennedy และ Robson พบว่าโปรตีนของ nif A สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจิเนสในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ และเนื่องจากการวิจัยนี้ได้ใช้หลักการเดียวกับ Kennedy และ Robson จึงจะนำรายละเอียดเกี่ยวกับเรื่องนี้มาอธิบายดังต่อไปนี้

Kennedy และ Robson ได้เคลื่อนพลาสมิด pCK1 ซึ่งมียีน nif A มาจาก Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าเซลล์ของ Azotobacter สายพันธุ์ที่เป็น Nif^- โดยความช่วยเหลือของ helping plasmid pRK2013 ได้คอนจูแกนท์ที่มีสมบัติ Nif^+ และสมบัติพิเศษคือสามารถถอดรหัสยีนไนโตรจิเนสได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอนุมูลอัมโมเนียมอยู่ด้วย

โดยการติดต่อส่วนตัวจึงทราบว่าKennedyได้สร้างพลาสมิด pCK3 ขึ้นมาทดแทน pCK1 ความแตกต่างของ pCK3 และ pCK1 ก็คือ pCK3 จะไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์เจ้าเรือน สมมติฐานจึงมีดังนี้ว่า ถ้าเคลื่อนพลาสมิด pCK3 เข้าเซลล์ Azotobacter สายพันธุ์ที่เป็น Nif^+ ซึ่งแยกมาจากรากอ้อยของดินในประเทศไทย โดยวิธีทรานสฟอร์เมชั่นก็น่าจะสร้างสายพันธุ์ของ Azotobacter ที่การถอดรหัสไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดันได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter spp. ซึ่งแยกจากรากอ้อยของดินในประเทศไทย

2. สร้างสายพันธุ์ Azotobacter spp. ซึ่งศึกษาจากข้อ 1 ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะที่มีอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูงโดยการใส่พลาสมิด pCK3เป็นหลัก

3. ศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของสายพันธุ์ใหม่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

4. เปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของสายพันธุ์ใหม่ขณะที่อยู่ร่วมกับรากอ้อย เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิมในสภาวะแวดล้อมที่มีอนุมูลอัมโมเนียม