บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไรโซเบียม มีจุดประสงค์สำคัญคือเพื่อเข้าใจถึงการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืชตระกูลถั่ว ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางด้านการเกษตรกรรม ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีบทบาทในการกระตุ้นหรือยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจิเนสซึ่งทำหน้าที่โดยตรงในการตรึงไนโตรเจน เมตาบอลิสมของไนเตรตโดยเฉพาะกระบวนการ denitrification ในเชื้อไรโซเบียมเป็นปัจจัยหนึ่งที่อาจมีผลต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Daniel และคณะ, 1980) แต่ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสกับไนโตรจิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของกระบวนการทั้งสองยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน (Antoun และคณะ, 1980; Vasconcelos และคณะ, 1980)

Rigaud และคณะ (1973) พบผลการทดลองที่ขัดแย้งกับ Vance และคณะ (1979) กล่าวคือ Rigaud และคณะ (1973) พบว่า มีความสัมพันธ์แบบแปรตามกัน (positive correlation) ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสของแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วเหลืองที่เกิดจากเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ CC 705 และ CBI 809 จึงตั้งสมมติฐานว่าเอนไซม์ไนเตรตในแบคทีรอยด์ทำหน้าที่เกี่ยวกับ nitrate respiration เป็นแหล่งของ reducing power ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำในปมรากและผลิต ATP สำหรับใช้ในปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้ยังช่วยให้แบคทีรอยด์สามารถดำรงชีพอยู่ได้ในสภาวะดังกล่าว (Zablotowicz และ Focht, 1979; Daniel และคณะ, 1980) แต่ Vance และคณะ (1979) พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสในปมรากมีความสัมพันธ์แบบผกผันกัน (negative correlation) โดยตั้งสมมติฐานอธิบายปรากฏการณ์ที่พบว่า เอนไซม์-ไนเตรตรีดัคเทสจะทำหน้าที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนทดแทนให้กับพืชในขณะที่แอคติวิตีของไนโตร-จิเนสลดลง

ในการวิจัยนี้ได้สร้างสมมติฐานว่า ผลขัดแย้งที่เกิดขึ้น ปัญหาที่เกิดจากการศึกษาไนเตรต-รีดัคเทส หรือเอนไซม์อื่น ๆ ของไรโซเบียมในปมรากจะพบปัญหาคือ แบคทีรอยด์ที่สกัดจากปมรากมีปริมาณน้อยมาก และมักจะถูกปนเปื้อนด้วยโปรตีนหรือเอนไซม์จากปมรากพืช ดังนั้นจึงพยายาม

เลี้ยงแบคทีเรีย เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 ขึ้นในหลอดทดลอง โดยสร้างสภาวะในหลอดทดลองให้คล้ายกับในปมรากมากที่สุด เพื่อเหนี่ยวนำไนเตรตรีดัคเทสขึ้นมา สภาวะหนึ่งในปมรากซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงไรโซเบียมในหลอดทดลองก็คือ ปริมาณออกซิเจนที่จำกัดภายในปมราก (Dilworth และ Aplleby, 1979) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงไนโตรเจนของแบคทีรอยด์ โดยมี leghemoglobin ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ แบคทีรอยด์ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ในโตรจิเนสไม่ทนทานต่อออกซิเจน จึงพยายามเลียนแบบสภาวะนี้ขึ้นในหลอดทดลอง (ไมโครแอโรบิก) พบว่า ในสภาวะดังกล่าวโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสขึ้นได้ (รูปที่ 2) แต่ไนเตรตไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์นี้ในสภาวะแอโรบิก (รูปที่ 1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับใน E. coli K12 ซึ่ง G. Giordano และคณะ (1978) ได้แสดงให้เห็นว่า ออกซิเจนเป็นตัวกดดันการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสที่ถูกเหนี่ยวนำในหลอดทดลองนี้จัดเป็นประเภท dissimilatory enzyme ทำหน้าที่ในกระบวนการหายใจของเชื้อในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เช่นเดียวกับใน E. coli, P. perfectomarinus และ P. mirabilis (C.C. Delwiche และ B.A. Bryan, 1976; Michael W.W. Adams และ L.E. Mortenson, 1982) ทั้งนี้ด้วยเหตุผลดังนี้

1. รูปแบบการเกิดเอนไซม์เหมือนรูปแบบการเจริญของเชื้อที่เกิดเฉพาะในสภาวะไมโครแอโรบิก (หรือสภาวะปราศจากออกซิเจน) ที่มีไนเตรต และไม่มีการเจริญในช่วงต้น (lag peroid) ซึ่งเป็นลักษณะของแอโรบิกแบคทีเรียเมื่อถูกเปลี่ยนให้อยู่ในสภาวะไมโครแอโรบิก (หรือสภาวะปราศจากออกซิจน) เช่น ใน P. perfectomarinus

2. รูปแบบของการเจริญของเชื้อและแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสเหมือนกับรูปแบบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์เมตดีไฮโดรจิเนส (รูปที่ 16) ซึ่งเป็นเอนไซม์บ่งชี้ (marker enzyme) ของกระบวนการหายใจในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่มีไนเตรตของ E. coli และ P. mirabilis โดยรับอิเลคตรอนจากฟอร์มเมต แล้วส่งผ่านไซโตโครมชนิดบีไปยังอนุมูลไนเตรต โดยใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส (C.C. Delwiche และ B.A. Bryan, 1976; J.A. Demoss และคณะ, 1981; G.R. Chaudhry และ C.H. MacGregor, 1983; W.J. Ingledew และ R.D. Poole. 1984)

ผู้เขียนได้พยายามที่จะหาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N และไนเตรตรีดัคเทสต่อไป โดยแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองมีตำแหน่งในการทำงานร่วมกันบนผนังเซลล์ แต่ไม่ประสพความสำเร็จ เนื่องจากเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N ไม่เสถียรขณะสกัด อย่างไรก็ตาม เราสามารถแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ทั้งสองทำงานร่วมกันในการขนส่งอิเลคตรอนจากฟอร์มเมตไปยังไนเตรต (รูปที่ 17) กล่าวคือ เมื่อให้ฟอร์มเมตแก่เซลล์ ไนเตรตในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40

3. โดยใช้เอนไซม์เอทีพีเอสเป็นเอนไซม์บ่งชี้ตำแหน่ง ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไนเตรต-รีดัคเทสนี้มีลักษณะเป็นเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อเซลล์เหมือน dissimilatory nitrate reductase จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น E. coli, P. mirabilis และ B. cereus (Payne, 1973; D.M. Yordy และ K.L. Ruoff, 1981) ทั้งนี้หากเป็น assimilatory nitrate reductase จะมีสมบัติเป็น soluble enzyme ดังรายงานใน Azotobacter, Chlorella และ Neurospora (M.G. Guerrero และคณะ, 1981; C.J. Kay และ M.J. Barber, 1986)

อย่างไรก็ตาม ยังพบแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนไซโตซอล (ส่วนใส 100,000xg) อีกร้อยละ 21 (ตารางที่ 3) เอนไซม์ในส่วนนี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ให้ชัดเจนว่าเป็น assimilatory nitrate reductase หรือ dissimilatory nitrate reductase ที่หลุดออกมาจากส่วนเยื่อเซลล์ขณะทำการสกัด ถึงแม้ว่าเอนไซม์จากไซโตซอลจะมี pH optimum เท่ากับเอนไซม์จากเยื่อเซลล์ แต่ออกซิเจนไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้เหมือนที่เกิดใน dissimilatory nitrate reductase

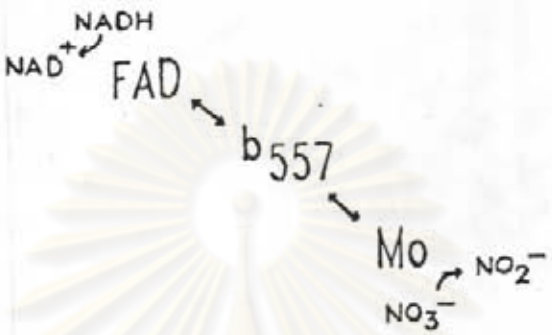
4. สมบัติที่เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนในอากาศ เป็นสมบัติที่จำเพาะของ dissimilatory nitrate reductase เช่นกัน (Stouthamer และคณะ, 1968; Enoch และ Lester, 1975; Payne, 1981; Knowles, 1982) คาดว่าออกซิเจนไปรบกวนการขนส่งอิเลคตรอนไปยังไนเตรต ซึ่งจากการทดลองของ Aefounder, P.R. และคณะ (1985) ศึกษา Paracoccus denitrificans พบว่า ไนเตรตรีดัคชันเกิดขึ้นมากน้อยเพียงใดขึ้นกับออกซิเดชันขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนนั้น

5. สมบัติที่สำคัญที่สุดที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบ dissimilatory nitrate reductase ในส่วนเยื่อเซลล์ได้แก่ ตัวให้อิเลคตรอน ใน assimilatory nitrate reduction (C.J. Kay และ M.J. Barber, 1986) มีการถ่ายทอดอิเลคตรอน ดังรูปที่ 27 โดยมี FAD

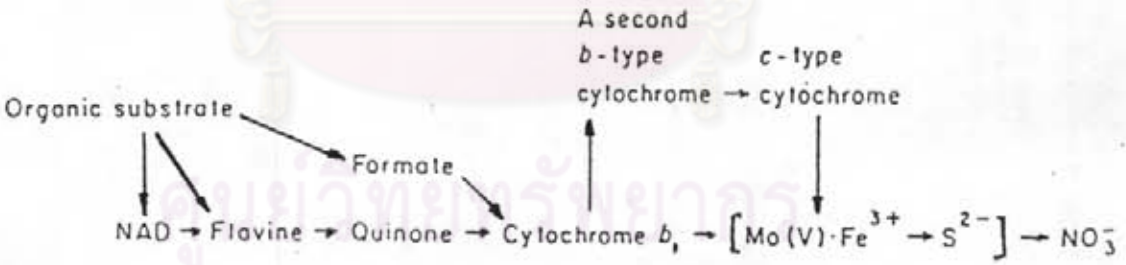
ไซโตโครมซนิดบีและโมลิบดีนัมเป็น prosthetic group ของเอนไซม์ ตัวให้อิเลคตรอนที่สำคัญได้แก่ NAD(P)H และ reduced Ferredoxin ส่วน dissimilatory nitrate reduction (Payne, 1973) ประกอบด้วย NADH, Flavin และ quinones เป็น cofactor ทำหน้าที่ขนส่งอิเลคตรอนไปยังไนเตรต มีกระบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอน ดังรูปที่ 28 สามารถรับอิเลคตรอนจากตัวให้อิเลคตรอนได้หลายชนิด ได้แก่ ฟอร์มเมต กลูโคส และซัคซิเนต ซึ่งถ่ายทอดอิเลคตรอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน ความสามารถในการใช้ตัวให้อิเลคตรอนของแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน เช่น ฟอร์มเมตเป็นตัวให้อิเลคตรอนที่ดีที่สุดสำหรับ E. coli และ NADH เป็นตัวให้อิเลคตรอนที่ดีที่สุดสำหรับ K. aeruginosa เป็นต้น (B.A. Bryan, 1981) ในการศึกษาตัวให้อิเลคตรอนชนิดต่าง ๆ แก่เอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์พบว่า ตัวให้อิเลคตรอนสำหรับ dissimilatory nitrate reductase ได้แก่ NADH, เมทธิลไวโอโลเจน, เบนซิล-ไวโอโลเจน, โซเดียมซัคซิเนต, โซเดียมฟอร์มเมต สามารถทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอนแก่เอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์ด้วย

การศึกษาหาค่าทางจลศาสตร์ Michaelis Menten constant (K_m) ของเอนไซม์จากส่วนเยื่อเซลล์ คำนวณได้โดยประมาณเป็น 1×10^{-4} โมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับ dissimilatory nitrate reductase ใน E. coli ในขณะที่ assimilatory nitrate reductase ใน Neurospora มีค่า 1.4×10^{-3} โมลาร์ (S. Taniguchi และ E. Itagaki, 1969) ซึ่งสนับสนุนว่าไนเตรตรีดัคเทสนี้เป็น dissimilatory nitrate reductase

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นนี้ทำให้เราแน่ใจว่า ถึงแม้เราจะไม่สามารถทำให้เซลล์แตกได้ทั้งหมด (ตารางที่ 3) แต่ผลการทดลองดังกล่าวก็ชี้ให้เห็นว่าไนเตรตรีดัคเทสส่วนมากหรือทั้งหมดในเซลล์เป็นเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อเซลล์ และทำหน้าที่เกี่ยวกับการหายใจในสภาวะปราศจากออกซิเจน (Nitrate respiration) เราได้พยายามที่จะสกัดเอนไซม์ออกจากเยื่อเซลล์เพื่อนำมาศึกษาทางจลศาสตร์ ด้วยวิธีต่าง ๆ กล่าวคือ ใช้ดีเทอร์เจนท์ เช่น ดีออกซีโคเลต (deoxycholate) ร้อยละ 1.5 และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีของ P. Forget (1974) หรือ triton X-100 ร้อยละ 2 ตามวิธีของ G. R. Chaudhry และ C. H. MacGregor (1983) หรือดีออกซิโคเลต (1 มก./มล.) กับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (30% saturation) ตามวิธีของ H.G. Enoch และ R.L. Lester (1975) หรือสกัดด้วยความร้อน 60 °ซ ในโปตัสเซียมไนเตรต ตามวิธีของ C.H. MacGregor และคณะ (1974) แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เพราะเอนไซม์ไม่เสถียรในสภาวะดังกล่าว



รูปที่ 27 การถ่ายทอดอิเลคตรอนใน assimilatory nitrate reduction



รูปที่ 28 กระบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอนใน dissimilatory nitrate reduction

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือ การติดตามเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสจากแบคทีรอยด์ในปมราก เพื่อระบุชนิดของไนเตรตรีดักเทสในปมรากนั้น ดังนั้นหากสามารถวัดแอคติวิตีและศึกษาสมบัติเอนไซม์จากเซลล์สมบูรณ์ได้แล้ว ก็ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องสกัดเอนไซม์จากเยื่อเซลล์เลย และข้อดีอีกประการหนึ่งคือ สามารถล้างแบคทีรอยด์ให้พ้นจากการปนเปื้อนของโปรตีนหรือเอนไซม์จากส่วนของพืชได้ด้วย ทำให้สามารถสรุปผลของไนเตรตรีดักเทสในแบคทีรอยด์ได้ชัดเจนขึ้น

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถทำการวัดและศึกษาสมบัติของไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สมบูรณ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนกับในส่วนเยื่อเซลล์ เพียงแต่ต้องใช้เวลาในการอินคิวเบตเซลล์กับสับสเตรตและตัวให้อิเลคตรอนนานขึ้นจาก 4 นาที เป็น 30 นาทีเท่านั้น และไม่เป็นความเร็วเริ่มต้น(initial velocity) เหมือนการวัดในเยื่อเซลล์ ทั้งนี้เพราะจะต้องใช้เวลาส่วนหนึ่งในการขนส่งไนเตรตและตัวรับอิเลคตรอนเข้าไปยังเอนไซม์ในเซลล์ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จะไม่ใช้ในการหาค่าคงที่ต่าง ๆ ทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ แต่จะนำมาใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการติดตามและศึกษาสมบัติในการใช้ตัวให้อิเลคตรอนของเอนไซม์เท่านั้น

มีจุดที่น่าสนใจควรกล่าวถึงไว้ที่นี้คือ ในการวัดแอคติวิตีจากเซลล์โดยตรงนั้น เวลาที่เซลล์ใช้ขนส่งไนเตรตจนถึงระดับอิ่มตัวของเอนไซม์แล้วเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ได้สมบูรณ์คือ 15 นาที (รูปที่ 7) แต่สำหรับซัคซิเนต หรือ NADH คือ 30 นาที (รูปที่ 8 และ 12) ดังนั้นเราจึงเลือกเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตเซลล์กับสับสเตรทและตัวให้อิเลคตรอนภายใต้บรรยากาศของอาร์กอนเป็น 30 นาทีเสมอ ระบบที่ใช้นี้เหมาะสมที่จะใช้กับเอนไซม์ในช่วงความเข้มข้นของเซลล์ เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีน 0.3 มก./มล. ส่วนการวัดจากเยื่อเซลล์นั้นมีความเร็วเริ่มต้นเพียง 4 นาที ระบบนี้เหมาะสมที่จะใช้วัดเอนไซม์ เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีน 0.1 มก./มล.

ในการศึกษาโดยใช้ตัวให้อิเลคตรอนชนิดต่าง ๆ สนับสนุนว่า ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์และส่วนเยื่อเซลล์เป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากรูปแบบตัวให้อิเลคตรอนของเอนไซม์จากแหล่งทั้งสองเหมือนกัน (ตารางที่ 4 และ 5) และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนแบคทีรอยด์จากปมราก-ถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์ ก็พบรูปแบบการใช้ตัวให้อิเลคตรอน (ตารางที่ 7) เหมือนแบคทีเรียในหลอดทดลองทุกประการ แสดงว่าเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และเป็น dissimilatory nitrate reductase การศึกษาดังกล่าวนอกจากจะสามารถระบุชนิดของไนเตรตรีดักเทสแล้ว ยังชี้ให้เห็นประโยชน์ว่าเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงใน

ภาวะไมโครแอโรบิกสามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วในการศึกษาเอนไซม์-ไนเตรตรีดัคเทสได้เป็นอย่างดี

เมื่อ inoculate รากถั่วเหลืองด้วยเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 พบเอนไซม์นี้ในส่วนแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีและไม่มีไนเตรต (ตารางที่ 6) แสดงว่าไนเตรตรีดัคเทสมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีพของแบคทีรอยด์ในปมราก และอาจมีบทบาทต่อการตรึงไนโตรเจน แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสและปริมาณไนเตรตในส่วนแบคทีรอยด์จากปมรากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์ มีค่าสูงกว่าของปมรากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีไนเตรต แสดงว่ามีการขนส่งไนเตรตเข้าสู่ปมราก และไนเตรตนี้สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์ให้เพิ่มขึ้นได้ เอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นนี้มีสมบัติในการรับอิเลคตรอนจากตัวให้อิเลคตรอนชนิดต่าง ๆ เหมือน dissimilatory nitrate reductase จากเยื่อเซลล์ทุกประการ (ตารางที่ 7) ประกอบกับฟอร์มเมตสามารถเพิ่มแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนนี้ด้วย (รูปที่ 26) จึงสนับสนุนว่า เอนไซม์ไนเตรตรีดัค-เทสในส่วนแบคทีรอยด์นี้เป็น dissimilatory nitrate reductase โดยเป็นแหล่งพลังงานและมีความสำคัญต่อการดำรงชีพและการตรึงไนโตรเจนของแบคทีรอยด์ ทั้งนี้จากการทดลองของ Ryle และคณะ (1979) พบว่า ถั่วเหลือง, white clover และ cowpea เมื่อตรึงไนโตรเจนจะใช้คาร์บอนในการหายใจมากกว่าปกติ ร้อยละ 11-13 และ reducing equivalent สำหรับเอนไซม์ไนโตรจิเนสของแบคทีรอยด์ R. Leguminosarum ได้มาจากกระบวนการหายใจของแบคทีรอยด์ (Laane และคณะ, 1978) จากการคำนวณพบว่าพลังงานที่ได้จากการหายใจของปมรากถั่วเหลืองจะใช้ไปสำหรับการตรึงไนโตรเจนถึงร้อยละ 52 และการรักษาสภาพของปม (nodule maintenance) อีกร้อยละ 22 (R.M. Rainbird และคณะ, 1984) ถึงแม้ Harper (1974) และ Lahav (1976) จะพบว่าพืชมีไนเตรตรีดัคเทสทั้งสองชนิด และสามารถเหนี่ยวนำไนเตรตรีดัคเทสขึ้นได้ในปมราก ในการทดลองนี้กลับพบว่าไนเตรตรีดัคเทสของพืชจากปมรากไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำขึ้นได้ด้วยไนเตรต ความเข้มข้นสูงถึง 6 มิลลิโมลาร์ แต่จากการที่น้ำหนักต้นถั่วเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนในขณะที่แอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นคงเดิม ชี้ให้เห็นว่า เมื่อไนเตรตถูกดูดซึมเข้าสู่รากจะถูกลำเลียงขึ้นไปยังส่วนยอดและใบของพืช และเหนี่ยวนำให้เกิด assimilatory nitrate reductase ในส่วนดังกล่าว (Richard และคณะ, 1986)

ผลการทดลองและคำอธิบายข้างบนนี้สอดคล้องกับสมมติฐานเรื่อง carbohydrate deprivation ซึ่งอธิบายว่า คาร์โบไฮเดรตในส่วนของปมรากถูกลำเลียงขึ้นไปเพื่อใช้ในการสร้างพลังงานและ reducing power แก่ nitrate assimilation ในส่วนใบ น้ำหนักและจำนวนปมจึงลดลง ซึ่งตรงกับงานวิจัยนี้ กล่าวคือ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ในขณะที่น้ำหนักต้นถั่วเพิ่มขึ้นนั้น ไนเตรตกลับทำให้น้ำหนักปมและจำนวนปมลดลงถึง 3 เท่า อย่างมีนัยสำคัญ ยังมีสมมติฐานที่นำมาอธิบายผลของไนเตรตต่อน้ำหนักปมอีกอันหนึ่งว่า ไนเตรตสามารถรบกวนการขนส่งกรดอะมิโนและ Ureide ในไซเลม ซึ่งจะมีผลต่อการลำเลียงคาร์โบไฮเดรตที่สร้างจากการสังเคราะห์แสงในส่วนใบมายังราก ขนาดของปมจึงลดลง อย่างไรก็ตาม สมมติฐานเหล่านี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ให้แน่ชัด

นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ไม่เกี่ยวข้องกับการลดลงของน้ำหนักปมที่เกิดเนื่องจากไนเตรต เพราะสามารถพบการลดลงของน้ำหนักปม เนื่องจากไนเตรตได้ในแบคทีรอยด์ของไรโซเบียมหลาย species ที่ไม่มีไนเตรตรีดัคเทส (Streeter, 1985)

สำหรับ dissimilatory nitrate reductase ที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นนั้น กล่าวได้ว่าไม่มีความสัมพันธ์ทั้งแบบแปรตามหรือผกผันกับไนโตรจิเนส กล่าวคือแม้ไนเตรตรีดัคเทสจะเพิ่มปริมาณขึ้นถึง 2 เท่า แอคติวิตีของไนโตรจิเนสยังคงเดิม สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าไนไตรต์ซึ่งเป็นผลิตผลของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ไม่ใช่ตัวยับยั้งของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (Manhart และ Wong, 1980; Stephen และ Neyra, 1983; Streeter, 1985)

ดูเหมือนว่าไนเตรตรีดัคเทสที่เพิ่มขึ้นน่าจะใช้ทำงานให้แก่แบคทีรอยด์ เป็นไปได้อย่างยิ่งว่า ในสภาวะที่แบคทีรอยด์อยู่ในปมรากที่มีไนเตรตความเข้มข้นสูงนั้น เซลล์ต้องใช้พลังงานในการควบคุมปริมาณไนเตรตภายในเซลล์ (Buzt และ Jackson, 1977) ไนเตรต-รีดัคเทสอาจเป็นตัวการสำคัญในการสร้างพลังงานอันนี้นั่นเอง

จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรต (6 มิลลิโมลาร์) ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณไนเตรตที่อยู่ในดินของประเทศไทย (ตารางที่ 1) ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของไนโตรจิเนส จึงเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรม เนื่องจากผลของไนเตรตต่อการเจริญและแอคติวิตีของไนโตรจิเนสของปมรากนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อไรโซเบียมที่ inoculated (Streeter, 1985)

สรุปผลการทดลอง

เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ<u>เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม</u> สายพันธุ์ 122 ภายใต้สภาวะไมโคร-แอโรบิก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ พบว่า

1. การเจริญของเชื้อต้ากว่าในสภาวะแอโรบิกและไม่มีการเจริญในช่วงต้น (lag peroid) แต่มีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสสูงกว่าในสภาวะแอโรบิก

2. รูปแบบการเจริญของเชื้อและแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสและฟอร์มเมต-ดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N คล้ายกัน บ่งชี้ให้เห็นหน้าที่ของเอนไซม์ในการหายใจแบบใช้ไนเตรต (nitrate respiration) นอกจากนี้ฟอร์มเมตยังสามารถเพิ่มแอคติวิตีของไนเตรตได้ถึงร้อยละ 40

3. ออกซิเจนสามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนตะกอน 100,000xg ร้อยละ 65 .

4. แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทสและเอทีพีเอสสูงสุดในส่วนตะกอน 100,000xg อธิบายได้ว่าไนเตรตรีดัคเทสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ที่ส่วนเยื่อเซลล์ และเป็น dissimilatory nitrate reductase

5. สภาวะเหมาะสมสำหรับการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สภาพ intact คือปริมาณโปรตีนของเซลล์ในช่วง 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เวลา 30 นาที ซึ่งเพียงพอสำหรับการขนส่งหรือแพร่สารตั้งต้น (โปตัสเซียมไนเตรต) และตัวให้อิเลคตรอน เช่น NADH หรือโซเดียมซัคซิเนต เข้าสู่เซลล์ได้ถึงความเข้มข้นอิ่มตัวของเอนไซม์ หากเก็บไว้ในรูปของเซลล์ เอนไซม์จะมีความเสถียรสูงสุด โดยที่เก็บได้นานถึง 15 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี

6. สภาวะเหมาะสมสำหรับวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์ คือ ปริมาณโปรตีนในช่วง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 7.5 มิลลิ-โมลาร์ ความเร็วเริ่มต้นภายใน 4 นาที pH ที่ให้แอคติวิตีสูงสุดคือ 7.5

7. การเก็บรักษาส่วนเยื่อเซลล์ สามารถทำได้โดยเก็บในสารละลายโปตัสเซียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้อาร์กอนหรือไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 0 °ซ และ 4 °ซ แต่แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเหลือร้อยละ 60 เมื่อเก็บเป็นเวลานาน 10 วัน

8. ผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อไนเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์และเซลล์สมบูรณ์

มีรูปแบบความสามารถของตัวให้อิเลคตรอนเรียงลำดับจากสูงไปต่ำเหมือนกัน ดังนี้ NADH(0.3 มิลลิโมลาร์) เบนซิลไวโอโลเจน (0.05 มิลลิโมลาร์) เมทธิลไวโอโลเจน (1 มิลลิโมลาร์) โซเดียมซัคซิเนต (12.5 มิลลิโมลาร์) และโซเดียมฟอร์มเมต(5 มิลลิโมลาร์) แสดงว่าไนเตรตรีดัคเทสที่ศึกษาในส่วนเยื่อเซลล์และเซลล์สมบูรณ์เป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นสามารถศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสนี้ในเซลล์สมบูรณ์ได้

การศึกษาเกี่ยวกับไนเตรตรีดัคเทสในปมรากถั่วเหลืองที่ inoculated ด้วยเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต พบว่า

1. ต้นถั่วเหลืองจะไม่เกิดปมราก ถ้าเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตตั้งแต่เริ่มปลูกและ inoculated เชื้อ แม้จะใช้เพียงความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงต้องปลูกต้นถั่วเหลืองให้เกิดปมรากก่อน (ประมาณ 14 วัน) จึงเปลี่ยนเป็นอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต

2. ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนโฮโมจิเนตของปมรากถั่วเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์ มีค่าแอคติวิตีสูงกว่าในสภาวะอื่น แสดงว่าไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์นี้ให้เกิดในปมรากได้

3. แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทสสูงสุดในส่วนแบคทีรอยด์ และสูงกว่าในส่วนโฮโมจิเนตและส่วนของพืช และแอคติวิตีทั้งหมดในแบคทีรอยด์สูงกว่าในส่วนของพืชถึง 8 เท่า แสดงว่าไนเตรตรีดัคเทสที่ถูกเหนี่ยวนำนี้อยู่ในส่วนแบคทีรอยด์ของปมราก

4. การพบแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสและปริมาณไนเตรตในส่วนแบคทีรอยด์จากปมรากของต้นถั่วที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต แสดงว่าไนเตรตรีดัคเทสมีบทบาทสำคัญต่อการคงอยู่ของแบคทีรอยด์ และอาจมีบทบาทต่อการตรึงไนโตรเจนด้วย

5. การศึกษาผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์ของปมรากที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีรูปแบบความสามารถของตัวให้อิเลคตรอนเรียงลำดับจากสูงไปต่ำ เช่นเดียวกับในเซลล์สมบูรณ์และส่วนเยื่อเซลล์ แสดงว่าไนเตรตรีดัคเทสจากปมรากเป็น dissimilatory nitrate reductase ดังนั้นสามารถใช้การศึกษาไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์ของเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะไมโครแอโรบิกที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์ แทนการศึกษาเอนไซม์นี้ในส่วนแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วได้

การศึกษาผลของไนเตรตต่อน้ำหนักปม จำนวนปม และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่น การวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไนเตรตมีผลทำให้จำนวนปมและน้ำหนักปมลดลง แต่ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของไนโตรจิเนส นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ไนเตรตรีดักเทสในส่วนแบคทีรอยด์สูงขึ้น ซึ่งยืนยันว่าไนเตรตสามารถเหนี่ยวนำไนเตรตรีดักเทสในส่วนแบคทีรอยด์ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย