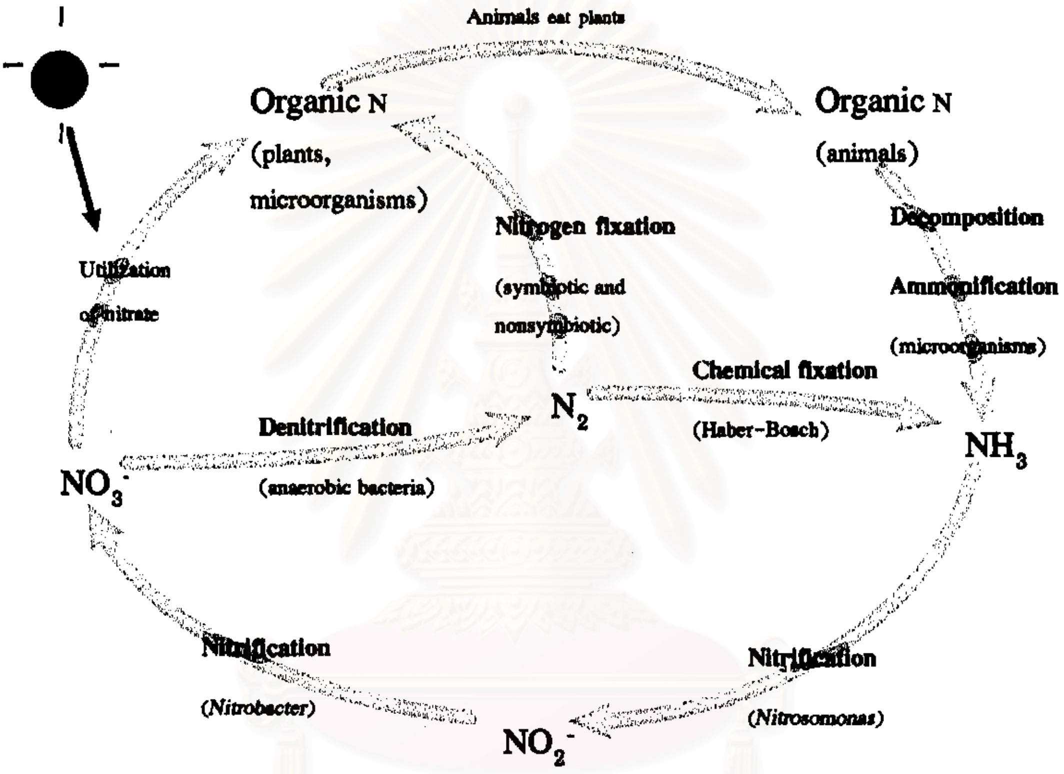
บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

ไนโตรเจนเป็นธาตุองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไนโตรเจนจะอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิค เป็นต้น สิ่งมีชีวิตจะสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนจากสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม เกลือไนเตรท และยูเรียเป็นต้น แต่เนื่องด้วยมีจุลินทรีย์บางประเภทสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน ซึ่งมีอยู่มากในชั้นบรรยากาศแต่พืชไม่สามารถนำมาใช้ได้ โดยจะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่แอมโมเนีย ซึ่งพืชและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นสามารถนำมาใช้สังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต ไนโตรเจนจึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ มีจุลินทรีย์เพียงบางชนิดมีความสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียได้โดยอาศัยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ซึ่งแอมโมเนียนี้พืชสามารถนำไปใช้ได้ แอมโมเนียที่เกิดขึ้นในดินอาจเปลี่ยนเป็นสารประกอบอื่นโดยรวมตัวกับไฮโดรเจนอิออน (hydrogen ion) เป็นแอมโมเนียมอิออน (ammonium ion) ซึ่งจะจับตัวกับอนุภาคของดินที่มีประจุลบ แล้วถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) โดยกระบวนการไนตริฟิเคชั่น (nitrification) ของแบคทีเรียพวกไนตริฟายอิ่ง (nitrifying bacteria) หลังจากนั้นพืชจะดูดซึมไนเตรทแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ในพืช เมื่อสัตว์ที่กินพืช (herbivore) กินเข้าไปก็จะได้รับสารประกอบอินทรีย์จากพืชโดยผ่านทางสายใยอาหาร (food web) หลังจากนั้นเมื่อพืชและสัตว์ตายลงก็จะมีจุลินทรีย์มาทำหน้าที่ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ มีการปลดปล่อยไนโตรเจนออกมาในรูปของแอมโมเนียโดยผ่านกระบวนการแอมโมนิฟิเคชั่น (ammonification) แล้วแบคทีเรียพวกไนตริฟายอิ่งก็จะเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปของไนเตรทซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ได้ และไนเตรทเหล่านี้ยังสามารถเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศโดยอาศัยกระบวนการดีไนตริฟิเคชั่น (denitrification) ได้อีกด้วย กระบวนการดังกล่าวได้แสดงไว้ในวัฏจักรของไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 1 (Nester และคณะ, 1995)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 วัฏจักรของไนโตรเจน (Nester และคณะ, 1995)

กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียม ซึ่งสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นสามารถนำไปใช้ได้ กระบวนการตรึงไนโตรเจนสามารถจำแนกได้ 2 วิธี คือ

1. กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมี (Chemical nitrogen fixation)

Fritz ในปีหนึ่ง ๆจะเกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมีประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (Kim และ Rees, 1994) กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนทางอุตสาหกรรม ซึ่งปรับปรุงโดย Haber และ Karl Bosch เมื่อต้นศตวรรษที่ 20 จึงเรียกว่ากระบวนการฮาร์เบอร์-บอสส์ (Haber-Bosch process) ปฏิกิริยาก.ารเกิดกระบวนการนี้ใช้น้ำมันเชื้อเพลิงเผาก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศให้รวมตัวเป็นแอมโมเนีย ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$3H_2 + N_2 \text{------>} 2NH_3 \quad \Delta G^{\circ} = -33.39 \text{ kJ Mol}^{-1}$$

แต่การเกิดปฏิกิริยานี้ต้องการพลังงานกระตุ้นสูง จำเป็นต้องทำภายใต้สภาวะที่มีความดัน 20-80 MPa และอุณหภูมิสูง 300-600 องศาเซลเซียส โดยมีโลหะเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา (metal catalyst) โดยน้ำมันเชื้อเพลิง 1.5 กิโลกรัม จะผลิตแอมโมเนียได้ 1 กิโลกรัม (Nutman, 1976) การผลิตปุ๋ยไนโตรเจนวิธีนี้มีกระบวนการผลิตที่ใช้วัตถุดิบที่มีราคาแพง และอาจเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม (Shanmugan และ Valentine, 1975) ซึ่งอาจส่งผลให้ราคาปุ๋ยที่ผลิตได้มีราคาแพงตามไปด้วย

ในปี ค.ศ. 1975 Chatt และคณะจึงได้ทำการวิจัยเพื่อปรับปรุงกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมี โดยใช้ organo-metallic complex ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับบริเวณที่เร่ง (active site) ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) ทำให้ไม่ต้องใช้พลังงานสูงในการกระตุ้นให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำงาน ทำให้ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนเกิดได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง (mild condition) และสามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีนี้สามารถลดต้นทุนในการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนลงไปได้มาก

นอกจากนี้กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมีอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างก๊าซไนโตรเจนและก๊าซออกซิเจนในชั้นบรรยากาศได้เป็นออกไซด์ (oxide) ของไนโตรเจน ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีฟ้าผ่า หรือแสงอัลตร้าไวโอเลต จากการศึกษาพบว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนนี้จะเกิดขึ้นประมาณ 44×10^6 เมตริกตันต่อปี (Burns และ Hardy, 1975) โดยคิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นทั้งหมด

2. กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (Biological nitrogen fixation)

กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด คือประมาณ 175x10^{6} เมตริกตันต่อปี (ชัชชัย สิมะสาธิตกุล, 2521) โดยอาศัยกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศได้ เราเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าไดอะโซโทรป (diazotroph) (Bums และ Hardy, 1975) ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้ไปเป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้สังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีนต่อไปได้ กลุ่มจุลินทรีย์พวกนี้จะประกอบไปด้วยแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท ดังแสดงในตารางที่ 1 (Sprent, 1979)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Sprent, 1979)

ชนิดของประชากรจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
<u>Non-photosynthetic, Non-filamemtous forms</u> **Pseudomonadaceae** *Pseudomonas azotogensis*	พบในดิน แหล่งน้ำจืด และแหล่งน้ำเค็ม
Azotobacteraceae	พบในดิน น้ำ ใบ และบริเวณผิวราก ทุกสปีชีร์จะมีการตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ออกซิเจน
Azotobacter sp. *Azomonas sp.* *Azotococcus sp.*	พบในดินที่มีความเป็นด่าง
Beijerinckia sp. *Derxia sp.*	พบในดินที่มีความเป็นกรด
Rhizobiaceae *Rhizobium sp.*	จะตรึงไนโตรเจนโดยจะอยู่ร่วมกับปมรากของพืช เจริญในที่ที่มีออกซิเจนเล็กน้อย

ตารางที่ 1(ต่อ)

ชนิดของประชากรจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
Bacillaceae	
Bacillus sp.	พบเห็นได้ทั่วไป
Bacillus polymyxa	ส่วนมากสามารถตรึงไนโตรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
Bacillus megaterium	สามารถตรึงไนโตรเจนได้เล็กน้อย
Bacillus macerans	
Clostridium pasteurianum *Clostridium butyricum* *Clostridium sp.*	พบในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม ตะกอน ลำไส้เล็กและอุจจาระของสัตว์ บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย หรือไม่มีออกซิเจนได้
Desulfotomaculum sp.	พบที่ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ โดยเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
Enterobacteriaceae	
Klebsiella pneumoniae *Enterobacter aerogenes* *Enterobacter cloacae* *Erwinia herbicola*	พบที่ใบ บริเวณผิวของปมรากพืช อุจจาระและลำไส้ใหญ่ของคน
Citrobacter freundii *Citrobacter intermedius* *Escherichia coli* *Escherichia intermedia*	พบที่ใบ บริเวณผิวของปมราก อุจจาระ และลำไส้ใหญ่ของคน
Spirillaceae	
Spirillum lipoferum	เจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่บริเวณที่มีการตรึงไนโตรเจนจะต้องการ ออกซิเจนในปริมาณน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของประชากรจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
Uncertain family	
Desulfovibrio vulgaris *Desulfovibrio desulfuricans* *Desulfovibrio gigas*	พบในดินที่เปียกชื้น แหล่งน้ำจืด และน้ำเค็มที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้
Methylosinus trichosporium	พบในดิน และน้ำ สามารถใช้มีเธนได้ มีการเจริญและตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน
Thiobacillus ferrooxidans	พบในน้ำที่มีความเป็นกรด และมีปริมาณอิออนสูง เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่ตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย
<u>Photosynthetic forms</u> **Rhodospirillaceae** *Rhodospirillum rubrum* *Rhodomicrobium sp.* *Rhodopseudomonas capsulata* *Rhodopseudomonas spheroides*	โดยปกติต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะต้องมีแสงด้วยจึงจะเจริญได้
Chromatiaceae *Chromatium sp.*	พบในดินโคลน ดินที่มีความชื้น แหล่งน้ำจืด และน้ำเค็มที่มีซัลไฟด์เป็นปริมาณมาก สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
Chlorobiaceae *Chlorobium limicola*	พบในดินโคลน ดินที่มีความชื้น แหล่งน้ำจืด และน้ำเค็มที่มีซัลไฟด์เป็นปริมาณมาก สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของประชากรจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
Actinomycetes and associated spp. Filamemtous forms *Mycobacterium flavum* *Corynebacterium autotrophicum*	พบในดินที่มีความเป็นกรด

การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถแบ่งตามลักษณะการอยู่ร่วมกันได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ

1. การตรึงไนโตรเจนโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่เจริญร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiotic nitrogen fixation) โดยเฉพาะพืชซึ่งมีคลอโรฟิลด์ซึ่งใช้แสงในการสังเคราะห์อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตให้จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการตรึงไนโตรเจน และไนโตรเจนที่ตรึงได้บางส่วนนี้พืชก็สามารถนำไปใช้ได้ (Thomson และTroch, 1973) โดยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ร่วมกัน จุลินทรีย์ที่รู้จักกันดีในกลุ่มนี้ได้แก่ *Rhizobium* sp. ซึ่งเจริญอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่วแล้วทำให้รากพืชตระกูลถั่วเกิดปมราก (root nodule) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้น จุลินทรีย์แต่ละชนิดก็จะมีความจำเพาะกับพืชแตกต่างกันไป เช่น *Rhizobium japonicum* ก็จะมีความจำเพาะกับถั่วเหลือง เชื้อที่เจริญอยู่ภายในปมรากนี้ก็จะมีรูปร่างแตกต่างกันไปตามระยะเวลาการเจริญของปมราก เช่นเป็นท่อนตรง ท่อนโค้ง ท่อนรูปอักษร L, T, Y, X ซึ่งเรียกว่าแบคทีรอยด์ (bacteroid) แต่ถ้าเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีรูปร่างเป็นท่อนและไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2536)

2.การตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่อย่างอิสระในธรรมชาติ (non-symbiotic nitrogen fixation) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

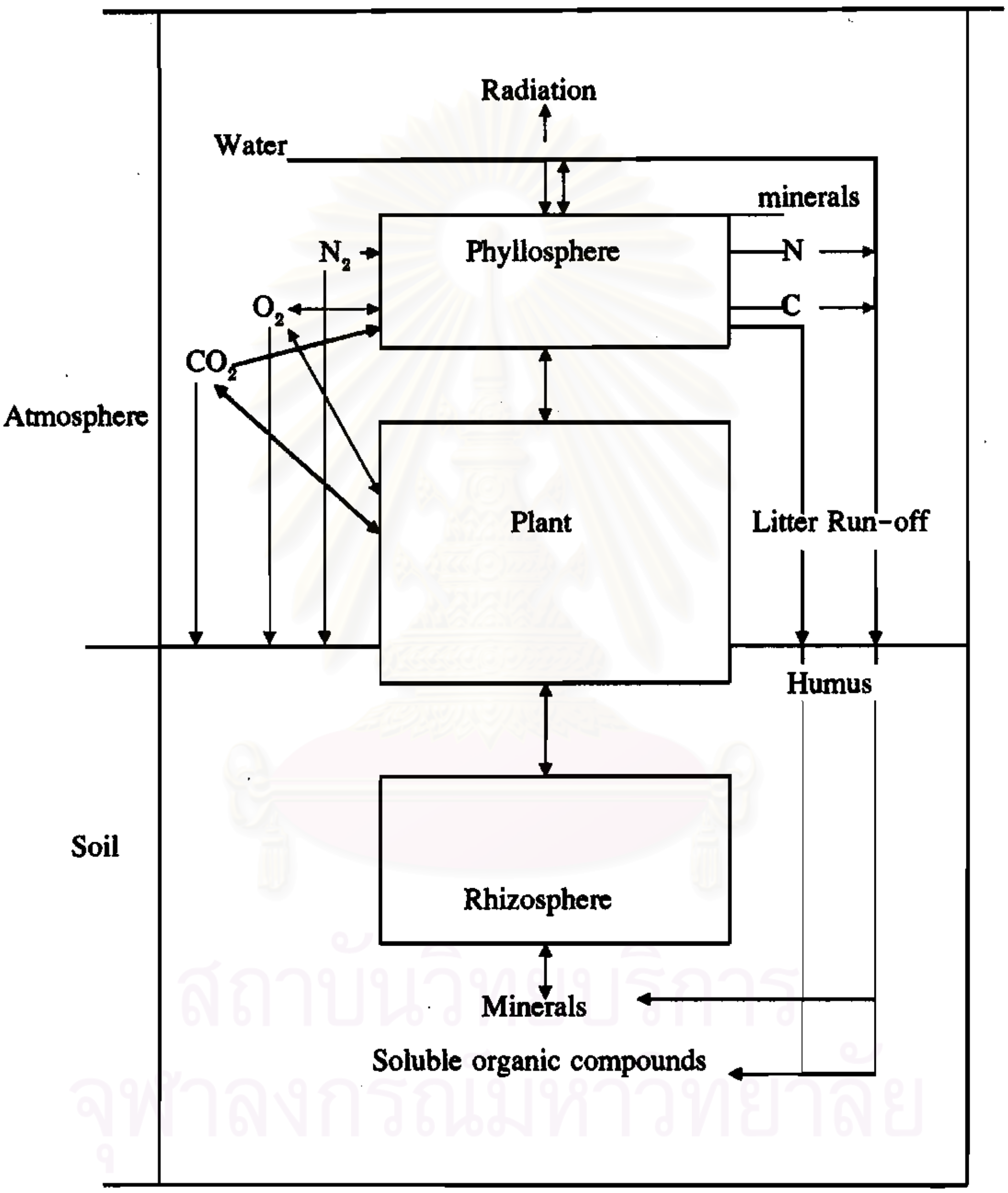
2.1 กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน ได้แก่ *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp., *Mycobacterium* sp., แบคทีเรียกลุ่ม methane

oxidizing bacteria, *Spirillum lipoferum* และสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนได้ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย เช่น *Anabaena* sp. และ*Nostoc* sp.

2.2 กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ได้แก่ *Klebsiella* sp., *Bacillus polymyxa, Bacillus macerans* และ *Escherichia coli* ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน (*nif* gene) จาก *Klebsiella pneumoniae* (Dixon และ Postgate, 1971) และสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนได้ ได้แก่ *Rhodospirillum* sp. และ *Rhodopseudomonas* sp.

2.3 กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ขาดออกซิเจนได้แก่ *Clostridium pasteurianum, Clostridium butyricum, Desulfotomaculum* sp., *Desulfovibrio* sp. และสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนได้ ได้แก่ *Chloropseudomonas* sp., *Chromatium* sp. และ *Chlorobium* sp.

นอกจากการจำแนกการตรึงไนโตรเจนตามลักษณะการอยู่ร่วมกันแล้ว ยังอาจจำแนกตามลักษณะของแหล่งที่อยู่อาศัยได้อีกด้วย ในระบบนิเวศน์จะมีความสัมพันธ์กันระหว่างบริเวณรากและบริเวณใบพืชดังแสดงในรูปที่ 2 (Quispel, 1974) ซึ่งอาจจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือการตรึงไนโตรเจนบริเวณราก (Rhizosphere) และ การตรึงไนโตรเจนบริเวณใบ (Phyllosphere) ซึ่งบริเวณใบนี้เป็นแหล่งที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เนื่องจากมีแหล่งน้ำซึ่งได้มาจากน้ำฝน หมอก และน้ำค้าง แหล่งแร่ธาตุ สารอาหารที่ให้พลังงาน อุณหภูมิที่เหมาะสม และการที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ ซึ่งการหมุนเวียนสารอาหารไปยังส่วนต่าง ๆของพืชก็เกิดขึ้นเมื่อมีฝนตกและชะสารอาหารต่าง ๆที่อยู่บนใบพืชไปสู่ดิน ซึ่งจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่รอบ ๆรากสามารถนำไปใช้ได้ นอกจากนี้แสงก็ยังมีผลต่อการเจริญของพืชเนื่องจากพืชจะสังเคราะห์แสงและมีการลำเลียงอาหารไปยังส่วนต่าง ๆของพืชต่อไป



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง Phyllosphere กับ Rhizosphere ในระบบนิเวศน์ (Quispel, 1974)

1. การตรึงไนโตรเจนบริเวณราก (nitrogen fixation in the rhizosphere)

การตรึงไนโตรเจนบริเวณรากนี้อาจจำแนกได้เป็น 2 บริเวณคือบริเวณรอบรากชั้นใน (inner rhizosphere) ซึ่งเป็นส่วนที่ติดกับผิวราก และบริเวณรอบรากชั้นนอก (outer rhizosphere) เป็นดินที่อยู่รอบ ๆราก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเจริญอยู่ในบริเวณชั้นในของราก ในปี ค.ศ. 1904 นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้ทำการศึกษาถึงการตรึงไนโตรเจนบริเวณรอบ ๆรากนี้เกิดขึ้นในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ และรากมีการหายใจทำให้ปริมาณออกซิเจนบริเวณนั้นลดต่ำลง ซึ่งเป็นผลดีกับจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่อาศัยอยู่รอบ ๆราก ทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถทำงานได้ดี จากปริมาณการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด 55 kg ha^{-1} a^{-1} การตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่รอบ ๆรากจะเกิดขึ้นเป็นปริมาณมาก โดยจะมีส่วนน้อยเพียง 4-5 กิโลกรัมเท่านั้นที่ไม่ได้เกิดจากการตรึงไนโตรเจนบริเวณราก (Harris และ Dart, 1973) บริเวณรากพืชจะมีจุลินทรีย์เจริญอยู่อย่างหนาแน่นกว่าบริเวณอื่น โดยจะมีทั้งพวกแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท (ดังแสดงในตารางที่ 1) แบคทีเรียที่รู้จักกันดีได้แก่ พวก *Rhizobium* ซึ่งจะอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว และสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่ว (เย็นใจ วสุวัติ, 2522, สมศักดิ์ วังใน, 2523, Burns และ Hardy, 1975) ขณะที่รากพืชเจริญเติบโตอยู่รากพืชจะปล่อยสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่าง ๆออกมารอบ ๆรากซึ่งสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ได้แก่กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ กรดอะมิโน น้ำตาล โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ (Egeraat, 1972) สารประกอบเหล่านี้จะเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในดิน ทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้มีการตรึงไนโตรเจนได้สูงขึ้นด้วย และในขณะเดียวกันพวก *Rhizobium* ก็จะให้สารประกอบไนโตรเจนที่ตรึงได้บางส่วนแก่พืช นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสกุล Pseudomonas Arthrobacter, Agrobacterium, Azotobacter, Mycobacterium, Flavobacterium, Cellulomonas และ Micrococcus อยู่ที่บริเวณรากนี้อีกด้วย

2. การตรึงไนโตรเจนบริเวณใบพืช (nitrogen fixation in the phyllosphere)

ในปีค.ศ. 1974 Ruinen ได้ศึกษาการตรึงไนโตรเจนที่บริเวณผิวใบของ Psychotria และ Ardisia โดยพบว่ามีแบคทีเรียพวก *Enterobacteriaceae* และ *Azotobacteriaceae* อาศัยอยู่บริเวณใบพืชที่เจริญอยู่ในสภาวะที่มีความชื้นสูง จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนใบไม้ที่พบในป่าประเทศอินโดนีเซีย ได้แก่ *Beijerinckia* และ *Azotobacter* นอกจากนี้ยังอาจพบแบคทีเรียในจีนัสอื่นร่วมด้วย เช่น *Pseudomonas, Pseudobacterium, Phytomonas, Erwinia* และ *Sarcina* และในป่ามอสประเทศเปอโตริโกจะพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้แก่ *Anabaena, Calothrix, Nostoc, Scytonema* และ *Tolypothrix* (Alexander, 1930) โดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่บนใบจะทำหน้าที่ควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen) โดยเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่สร้างสปอร์ได้จะสร้างสารที่เรียกว่า ไฟโตอะเลคซิน (phytoalexin) ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ เช่นในถั่ว (*Pisum satirum*) จะมีจุลินทรีย์ *Aschachyta pisi* และ *Penicillium expansum* เจริญอยู่และมีการสร้างไพซาติน (paisatin) ซึ่งเป็นสารในพวกไฟโตอะเลคซินออกมาด้วย (Kuc, 1966) นอกจากนี้ในพืชบางชนิดจะมีการสูญเสียคาร์โบไฮเดรตไป โดยการหลุดร่วงของใบหรือการที่ใบขาดสารอาหารก็จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถเจริญได้ในที่มีอัตราส่วน C : N สูง (Silver, 1977) อัตราการตรึงไนโตรเจนจะเกิดสูงเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือมีแสง อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณไนโตรเจนที่พอเหมาะ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ และปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ ดังนั้นถ้ามีการเจริญอยู่ร่วมกันอย่างหนาแน่นซึ่งจะทำให้ปริมาณออกซิเจนลดต่ำลง จุลินทรีย์กลุ่มอื่นอาจไม่สามารถเจริญได้แต่จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจะเจริญได้ดี (Ruinen, 1975)

บริเวณผิวใบเป็นแหล่งที่อยู่ที่ดีของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการทำกิจกรรมต่าง ๆของจุลินทรีย์โดยมีน้ำเป็นแหล่งให้แร่ธาตุ มีสารอาหารให้พลังงาน มีปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำ และมีอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยสารที่พืชสะสมจนเกินความต้องการก็จะถูกขับออกมา เพื่อปรับปริมาณสารภายใน และภายนอกให้มีความสมดุลกัน (Turkey, 1970) ดังนั้นในน้ำที่ชะล้างต้นไม้นี้ก็จะมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ออกมาด้วย เช่น สารอาหารหลัก (macro nutrients) สารอาหารรอง (micro nutrients) และสารเมตาโบไลซ์ต่าง ๆ

วิธีวัดอัตราการตรึงไนโตรเจน

การวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็จะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไปจึงต้องเลือกให้เหมาะสมกับลักษณะของงาน วิธีการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนมีดังต่อไปนี้

1.วิธีวัดทางอ้อมโดยดูการเจริญ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของแบคทีเรีย เช่นดูการเพิ่มของชีวมวล (biomass) หรือความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนเนื่องจากมีการเจริญของสิ่งมีชีวิต โดยเทียบกับการทดลองชุดมาตรฐาน ส่วนในสาหร่ายอาจใช้วิธีดูการเกิดเฮทเทอโรซีสต์ (heterocyst) และในพืชตระกูลถั่วอาจใช้วิธีดูจำนวนปมรากที่เกิดขึ้น

2.การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาล (Kjeldahl method) ซึ่งวิธีนี้ค่าที่ได้อาจน้อยกว่าค่าที่เป็นจริงเนื่องจากไนโตรเจนบางส่วนจะสูญเสียไปโดยกระบวนการดีไนตริฟิเคชั่น และไม่สามารถใช้วัดไนโตรเจนในปริมาณที่ต่ำได้

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิเคราะห์ ^{15}N หรือ ^{13}N เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศที่มี ^{15}N หรือ ^{13}N แล้วตรวจหาปริมาณ ^{15}N หรือ ^{13}N ในเซลล์โดยใช้แมสสเปคโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) หรือใช้ optical mass emission เพื่อวัดปริมาณ ^{15}N หรือ radioactive counting เพื่อวัดปริมาณ ^{13}N แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูงและสารประกอบไนโตรเจนบางส่วนอาจสูญเสียไปในกระบวนการดีไนตริฟิเคชั่น แต่มีข้อดีคือ มีความไวสูงโดยการใช้ ^{13}N จะมีความไวสูงกว่าการใช้ ^{15}N แต่จะมีครึ่งชีวิต (half life) สั้นกว่า (Hardy และคณะ, 1972)

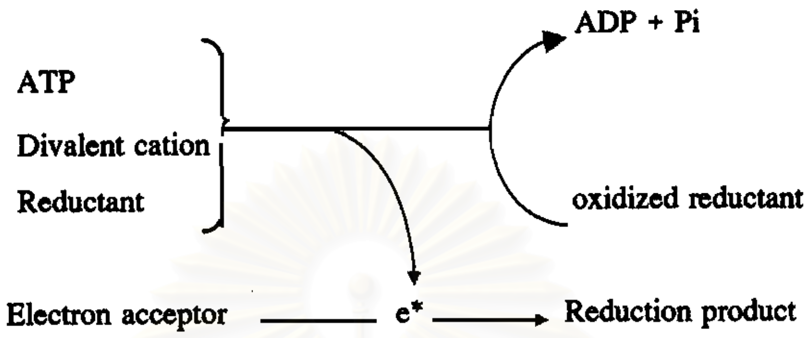
3.การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยดูจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ที่สามารถรีดิวซ์ซับสเตรท (substrate) อื่นๆนอกจากไนโตรเจนได้ (Burns และ Hardy, 1975) ทำให้ค้นพบวิธีวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนวิธีอื่นอีกหลายวิธี เช่น การ

วัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซธิลีน รีดักชั่น (Acetylene Reduction Assay) ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือราคาถูก มีความไวสูง รวดเร็ว และใช้ทักษะเพียงเล็กน้อย (Sprent, 1979) แต่มีข้อเสียคือ เอธิลีนและอะเซธิลีนสามารถละลายน้ำได้ ถ้าทำการทดลองในที่ที่มีความชื้นสูงจะทำให้ได้ปริมาณเอธิลีนน้อยกว่าความเป็นจริง

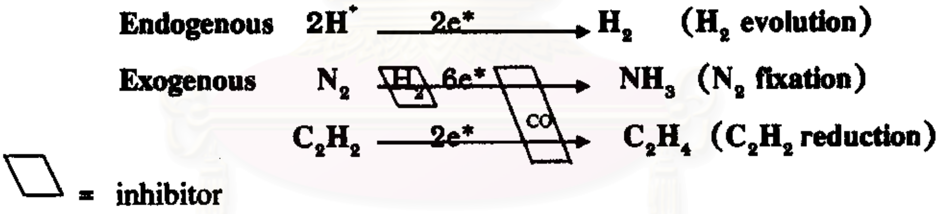
หลักการของการวิเคราะห์วิธีอะเซธิลีน รีดักชั่น

เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่เป็นเอนไซม์สำคัญในปฏิกิริยาของการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย ซึ่งเซลล์ของไนตริฟายอิ่งแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนภายในเซลล์ ดังนั้นถ้าตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสนี้ จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนั้นสามารถจะตรึงไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศได้ ในขณะที่การตรวจหาปริมาณเอนไซม์ไม่สามารถทำได้โดยตรงจากการวัดปริมาณก๊าซไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ได้โดยตรง แต่เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสยังสามารถรีดิวซ์ก๊าซอะเซธิลีน (acetylene) ให้เป็นก๊าซเอทิลีน (ethylene) แล้วปล่อยออกสู่บรรยากาศได้เช่นเดียวกับการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน และในทางทฤษฎีจำนวนโมลของก๊าซอะเซธิลีนที่ถูกรีดิวซ์นั้นก็มีค่าสมดุลกับก๊าซไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์นี้ (ดังแสดงในรูปที่ 3) (Hardy และคณะ, 1972) แต่การรีดิวซ์อะเซธิลีนนั้นต้องอาศัยอิเลคตรอน 2 ตัวในปฏิกิริยา ในขณะที่การรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียต้องการอิเลคตรอนถึง 6 ตัว ดังนั้นการเปลี่ยนค่าของอะเซธิลีนที่ถูกรีดิวซ์ไปเป็นค่าของไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ จึงต้องนำ 3 ไปหารค่าที่ได้จากการรีดิวซ์อะเซธิลีน

ก)



ข)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในการเกิดอะเซธิลีน รีดักชั่น (Hardy และคณะ, 1972)

ก) การกระตุ้นอิเลคตรอน (electron activation)

ข) ปฏิกิริยารีดักชั่นของซับสเตรท (substrate reduction)

ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจน

1. สารประกอบไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจนจะมีผลต่อการตรึงไนโตรเจน โดยการตรึงไนโตรเจนจะถูกยับยั้งเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารประกอบไนโตรเจนสูง ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในสิ่งมีชีวิตที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระโดยสารประกอบไนโตรเจน จะทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสหยุดทำงานชั่วคราว (temporary inactivation) เนื่องจากมีผลต่อเอนไซม์ 2 ชนิด คือ

1. เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส รีดักเทส เอดีพี ไรโบซิล ทรานเฟอเรส (dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase, DART) โดยการเติม ADP ให้กับไดไนโตรจีเนส รีดักเทส ในสภาวะที่มีแอมโมเนียมสูงทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสหยุดทำงานชั่วคราว

2. เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส รีดักเทส แอคติเวตติ่ง ไกลโคไฮโดรเลส (dinitrogenase reductase activating glycohydrolase, DRAG) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของ ADP-ribosylation เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมลดลง ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำงานได้ตามปกติ ซึ่งจะพบได้ใน *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azospirillum spp.* และ *Azorhizobium caulinodans* (Roberts และคณะ, 1990)

ผลของสารประกอบไนโตรเจนที่มีต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ เช่นใน *Azotobacter* หากเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นมากกว่า 50 มิลลิโมลาร์ จะไม่เกิดการตรึงไนโตรเจนขึ้น (Kennedy, 1970)

2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิยังมีอิทธิพลต่อเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนโดยตรงอีกด้วย นั่นคือทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลงหรือหยุดชะงักได้ (สมศักดิ์ วังใน, 2541) เช่นในถั่วเหลืองสาเหตุที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ลดลงหรือหยุดชะงักเมื่ออุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า 20-30 องศาเซลเซียส นั้นอาจอธิบายได้ดังนี้คือ เมื่ออุณหภูมิต่ำเกินไปนั้นปฏิกิริยาหรือกระบวนการทางชีวเคมีโดยทั่วไปจะช้าลงหรือหยุดชะงักลง แต่เอนไซม์จะไม่ถูกกระทบกระเทือนโดยตรง และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะมีกิจกรรมลดลงตามปกติของกระบวนการทางชีวเคมีทั่วไป แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นมาก ๆเอนไซม์จะเปลี่ยนคอนฟิกูเลชั่น (configuration) โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงนี้เรียกว่า denaturation การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ไนโตรจีเนสนี้ทำให้กิจกรรมลดลงหรือหยุดชะงัก นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิสูง ๆนั้นการปลดปล่อยก๊าซไฮโดรเจน โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสยังเป็นไปในอัตราที่สูงด้วย และเนื่องจากไฮโดรเจนที่ถูกปลดปล่อยออกมานี้ก่อให้เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนและถ้าเกิดขึ้นมาก ๆ อาจจะทำให้การตรึงไนโตรเจนหยุดชะงักหรือช้าลง ดังนั้นการเร่งการปลดปล่อยไฮโดรเจน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในอุณหภูมิสูง จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่จะใช้อธิบายว่าทำไมการตรึงไนโตรเจนในดินหรือสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง จึงเป็นไปในอัตราที่ต่ำกว่าในดินที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า ปกติอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ก็จะแตกต่างกันไป (Kuo และ Boersma, 1971; Beck และ Vangnai, 1985) เช่นแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส

3. แรงดันของออกซิเจน

อิทธิพลของก๊าซออกซิเจนที่มีต่อการตรึงไนโตรเจนถือว่ามีความสำคัญมาก เพราะว่าการตรึงไนโตรเจนจะเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพนั้น ปริมาณของออกซิเจนจะต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสมไม่มากหรือน้อยเกินไปทั้งนี้เพราะถ้าออกซิเจนมากเกินไปจะกระทบกระเทือนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งไวต่อออกซิเจนเป็นอย่างมาก และถ้าออกซิเจนมีน้อยเกินไปก็อาจไม่พอกับความต้องการของเซลล์ซึ่งใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับ

อิเล็กตรอนในการหายใจ และการสร้าง ATP เพราะฉะนั้นปริมาณของออกซิเจนต้องมีปริมาณที่พอเหมาะจริง ๆ เช่น ในปมรากพืชตระกูลถั่วต้องการออกซิเจนประมาณ 0.5 atm ซึ่งเป็นระดับที่พอเหมาะนี้ เหมาะสมกับการหายใจของแบคทีรอยด์และกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Gurris, 1956; Bergersen, 1962b) เชื่อกันว่าเป็นหน้าที่ของเลคฮีโมโกลบิน (leghaemoglobin) แต่อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ของออกซิเจนเข้าสู่ปมนั้นก็ขึ้นอยู่กับระดับของออกซิเจนที่มีอยู่ภายในและภายนอกปมด้วย จากผลของการทดสอบปรากฏว่าในปมที่มีเลคฮีโมโกลบินอย่างสมบูรณ์นั้นจะต้องมี pO_2 รอบ ๆ ปมอยู่ระหว่าง 0.9-1.0 บรรยากาศ pO_2 ภายในปมจึงจะมีอยู่ประมาณ 0.5 บรรยากาศ

โครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase Structure)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย ดังสมการ (Voet และ Voet, 1997)

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP + 16\ H_2O \text{ -----> } 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

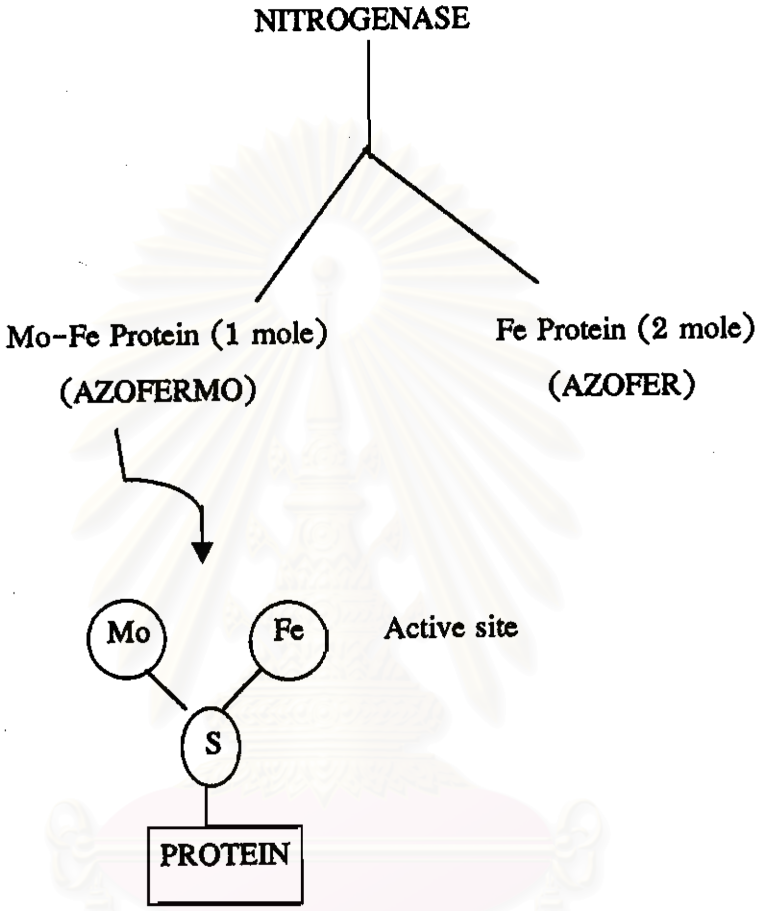
ซึ่งอาจแบ่งได้เป็นปฏิกิริยาย่อย ๆ 2 ปฏิกิริยา ได้แก่

$$N_2 + 6e^- + 12ATP + 8H^+ \text{ ------> } 2NH_4^+ + 12ADP + 12Pi$$

$$2H^+ + 2e^- + 4\ ATP \text{ ------> } H_2 + 4ADP + 4Pi$$

เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีนที่มีโมลิปดีนัมและเหล็ก (Mo-Fe Protein) และโปรตีนที่มีเหล็ก (Fe Protein) รวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่ค่อนข้างสลับซับซ้อน (Mortenson และคณะ, 1967) องค์ประกอบส่วนที่อยู่ในรูปของ Mo-Fe Protein มีชื่อเรียกว่าอะโซเฟอร์โม (azofermo) ซึ่งเดิมเรียกว่าโมลิบโดเฟอร์ริดอกซิน (Molybdoferredoxin) (รูปที่ 4) และส่วนที่เป็น Fe Protein มีชื่อเรียกว่า อะโซเฟอร์ (azofer) เดิมเรียกว่า อะโซเฟอร์ริดอกซิน (azoferredoxin)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 องค์ประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Mortenson and Jeng, 1967, Koch และคณะ, 1967, Hardy และคณะ, 1971, Leigh ,1971)

การเรียกชื่อองค์ประกอบทั้งสองชนิดของเอนไซม์ไนโตรจีเนสว่า อะโซเฟอร์โมและอะโซเฟอร์นี้โดยมีผู้เสนอขึ้นในปี ค.ศ. 1971 (Hardy และคณะ, 1971; Leigh, 1971) ทั้งนี้เพราะชื่อเดิมนั้นทำให้เกิดการสับสนกับเฟอร์ริดอกซิน (ferredoxin) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด ในโมเลกุลของเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีสัดส่วนของอะโซเฟอร์โม และอะโซเฟอร์เท่ากับ 1:2 สำหรับโปรตีนของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นแบบที่เรียกว่า "iron-sulfur type" คือมีกำมะถันเป็นตัวเชื่อมระหว่างโปรตีนกับโมลิปดินัมและเหล็ก น้ำหนักโมเลกุลของไนโตรจีเนสเท่ากับ 220,000 ส่วนที่เป็นอะโซเฟอร์โมเท่ากับ 270,000 (สองโมเลกุลเชื่อมติดกัน ฉะนั้น 1 โมเลกุลเท่ากับ 135,000) และส่วนที่เป็นอะโซเฟอร์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 40,000 ความสามารถในการลดออกซิเจนให้กับก๊าซไนโตรเจนของไนโตรจีเนสเมื่อคิดเป็น specific activity รวมเท่ากับ 225 nmoles N_2 reduced/min/mg และของอะโซเฟอร์โม และอะโซเฟอร์เท่ากับ 360 และ 530 nmoles N_2 reduced/min/mg ตามลำดับ

กระบวนการหรือปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส

กระบวนการหรือปฏิกิริยาการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนซึ่งกระตุ้นโดยเอนไซม์นั้นจะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัย 1) ตัวให้อิเลคตรอน (electron donor) 2) ตัวรับอิเลคตรอน (electron acceptor) 3) แหล่งพลังงาน ซึ่งได้แก่ ATP (adenosine-5-triphosphate และ 4) divalent metal ion เช่น Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}, Fe^{++} และ Ni^{++} ซึ่งช่วยทำให้ ATP ทำหน้าที่ได้ตามปกติ ปฏิกิริยาโดยทั่วไปอาจเขียนได้ดังต่อไปนี้ (Mortenson, 1964b; Mortenson, 1966)

$$N_2 + 6e^- + 12ATP + 8H^+ \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 2NH_4^+ + 12ADP + 12Pi$$

$$2H^+ + 2e^- + 4ATP \xrightarrow{\text{nitrogenase}} H_2 + 4\ ADP + 4Pi$$

จากปฏิกิริยาข้างบนจะเห็นได้ว่า การรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนจำนวน 1 โมเลกุลนั้น จะ

ต้องใช้อิเลคตรอนซึ่งผ่านมาทางเอนไซม์ไนโตรจีเนส จำนวน 6 อิเล็กตรอน และใช้ ATP จำนวน 12 mole จากผลการทดลองพบว่า อิเลคตรอนซึ่งไหลผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพื่อรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนนั้น ถ้าอิเลคตรอนไหลผ่านจำนวน 1 อิเลคตรอน จะต้องอาศัยพลังงาน 2 ATP จึงได้แอมโมเนีย 2 โมล นอกจากนี้โปรตอน (proton, H^+) ที่เหลือ 2 โปรตอน (เฉพาะปฏิกิริยาที่แสดงอาจมากหรือน้อยกว่านี้ก็ได้) จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสเช่นเดียวกัน ให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจน (H_2) และถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ต่อไป โดยในสมการหรือปฏิกิริยา Pi หมายถึง inorganic phosphate

นอกจากก๊าซไนโตรเจนแล้ว ยังปรากฏว่ามีสารเคมีตัวอื่น ๆ อีกที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนในกระบวนการหรือปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส ตัวรับอิเลคตรอนเหล่านี้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ได้แก่ N_2, N_3, N_2O, HCN, CH_3CN, CH_3NC, CH_2CHCN, C_2H_2 และ $2H^+$ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถรีดิวซ์สารเคมีอื่น ๆ โดยใช้อิเลคตรอนจำนวนต่าง ๆกัน เป็นที่น่าสังเกตุว่าจากการที่ทราบถึงความสามารถในการรับอิเลคตรอนของสารเคมีหรือซับเสตรทเหล่านี้ โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำให้ค้นพบวิธีตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ หรือการตรึงก๊าซไนโตรเจนได้โดยทางอ้อม และเป็นวิธีที่รวดเร็วค่อนข้างแน่นอนและสะดวก นั่นคือการรีดิวซ์อะเซธิลีน โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสนี้จะเป็นไปในอัตราที่เร็วมากประกอบกับการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซธิลีนที่เหลือและเอทิลีนที่เกิดขึ้นก็ทำได้อย่างสะดวกโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) และนอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของอะเซธิลีนที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณของก๊าซไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ไปด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงตัวรับอิเล็กตรอนหรือซับเสตรท, ผลที่เกิดขึ้น และจำนวนอิเล็กตรอนที่ใช้ในปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Fottrell, 1968, Dilworth, 1966, Hardy และ Knight, 1966 และ Schollhorn และ Burris, 1966)

ตัวรับอิเลคตรอนหรือ substrate	ผลที่เกิดขึ้น	จำนวนอิเลคตรอนที่ใช้
N_2	$2NH_3$	6
N_3	$N_2.NH_3$	2
N_2O	$N_2.H_2O$	2
HCN	CH_4NH_3	6
	$CH_3.NH_2$	4
CH_3CN	$C_2H_6.NH_3$	6
CH_3NC	$CH_3NH_2.CH_4$	6
	$C_2H_6.C_2H_4$	8, 10
	$C_3H_8.C_3H_6$	12, 14
CH_2CHCN	$C_3H_6.NH_3$	6
	C_3H8	8
C_2H_2	C_2H_4	2
$2H^+$	H_2	2

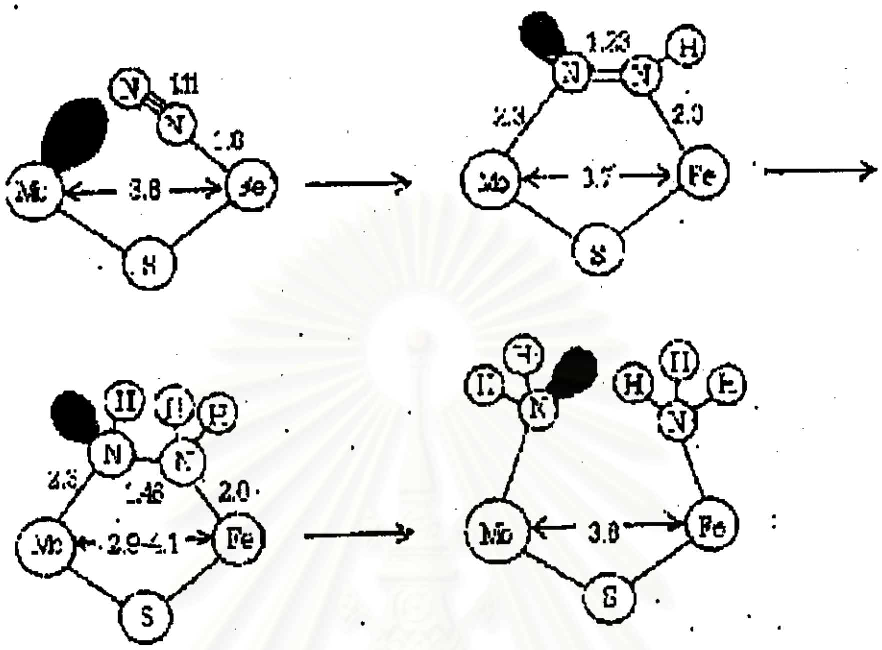
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลวิธีของกระบวนการที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (mechanism of nitrogenase action)

ปัจจุบันทฤษฎีเกี่ยวกับกระบวนการหรือปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส มีชื่อเรียกว่า "two site hypothesis" นั่นคือตำแหน่งที่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นบนโมเลกุลของเอนไซม์ไนโตรจีเนส มีอยู่สองตำแหน่งและจากการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ "inhibitor" ปรากฏว่าตำแหน่งที่หนึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่ทำปฏิกิริยากับคาร์บอนมอนนอกไซด์ (carbonmonoxide) ซึ่งเรียกว่า "Carbonmonoxide insensitive" โดยตำแหน่งนี้ก็คือส่วนที่ Fe เป็นองค์ประกอบอยู่ ส่วนตำแหน่งที่สองเป็นตำแหน่งที่มีการทำปฏิกิริยากับคาร์บอนมอนนอกไซด์ ซึ่งเรียกว่า "Carbonmonoxide sensitive" โดยตำแหน่งนี้ก็คือส่วนของเอนไซม์ที่มี Mo เป็นองค์ประกอบอยู่นั่นเอง (Bergersen, 1963)

การรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสนั้น ขั้นแรกทีเดียวเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง CO insensitive นั่นคือตำแหน่งที่มี Fe เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งแสดงถึงปฏิกิริยาขั้นเริ่มแรกระหว่างก๊าซไนโตรเจนกับเอนไซม์ไนโตรจีเนส ตลอดจนสารมัธยันต์ (intermediate) ที่เกิดขึ้นก่อนที่ก๊าซไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย (ส่วนของเอนไซม์ที่แสดงไว้เป็นส่วนของ Mo และ Fe ที่จับกันโดยมีกำมะถันเป็นตัวเชื่อม ส่วนนี้เป็นส่วนที่อยู่ใน pocket ของโปรตีน โดยก่อให้เกิด dimension ที่สามารถทำปฏิกิริยาหรือรับเอาซับเสตรทเฉพาะที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้เท่านั้น) จะเห็นได้ว่าในขั้นแรกนั้นก๊าซไนโตรเจนจะจับกับ Fe ในสภาพที่เป็นเส้นตรงก่อนที่จะมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนมาจาก Mo ทำให้เกิด "dinuclear diimide" (dinuclear ของ Mo และ Fe) (diimide, HNNH) และในขณะเดียวกันนี้จะมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนมาเรื่อย ๆ จากส่วนที่เป็นโปรตีนผ่าน Mo ทำให้เกิดเป็นไฮดราซีน (hydrazine, H_2NNH_2) และแอมโมเนีย เมื่อพันธะระหว่าง N คือ (N-N) แตกออกและเนื่องจากไดอิมีด (diimide) และไฮดราซีนเกิดขึ้นในระยะที่ก๊าซไนโตรเจนกำลังถูกรีดิวซ์เป็นแอมโมเนียนี่เอง ทำให้มีผู้เสนอว่า ไดอิมีด และไฮดราซีนเป็นสารมัธยันต์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน

สำหรับตำแหน่งบนโมเลกุลของเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยากับซับเสตรทอื่น ๆ นั้นจะแตกต่างกันไป เช่น ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) เกิดที่ตำแหน่งของ Fe, คาร์บอนมอนนอกไซด์จะเกิดที่ตำแหน่งของ Mo, อะเซธิลีนจะเกิดที่ตำแหน่งของ Mo



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาขั้นแรกที่เกิดขึ้นระหว่างก๊าซไนโตรเจน กับเอนไซม์ไนโตรจีเนส และสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น (Mortenson, 1966)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้างโปรตีนจากแอมโมเนียที่เกิดจากการตรึงไนโตรเจน

ในพืชและพวกโปรคาริโอตจะมีวิถีทางในการนำแอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ โดยหลังจากที่ก๊าซไนโตรเจนรับอิเลคตรอนจากเอนไซม์ไนโตรจีเนส และถูกรีดิวซ์เป็นแอมโมเนียแล้ว แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่าง ๆที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิสมที่เกิดในเซลล์ของแบคทีรอยด์ โดยที่แบคทีรอยด์จะได้รับสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆมาจากพืชแล้วเปลี่ยนให้เป็น

กรดอินทรีย์ เช่นกรดแอสปาติก (aspartic acid) กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (α-ketoglutaric acid) (Leaf และคณะ, 1959) เช่น

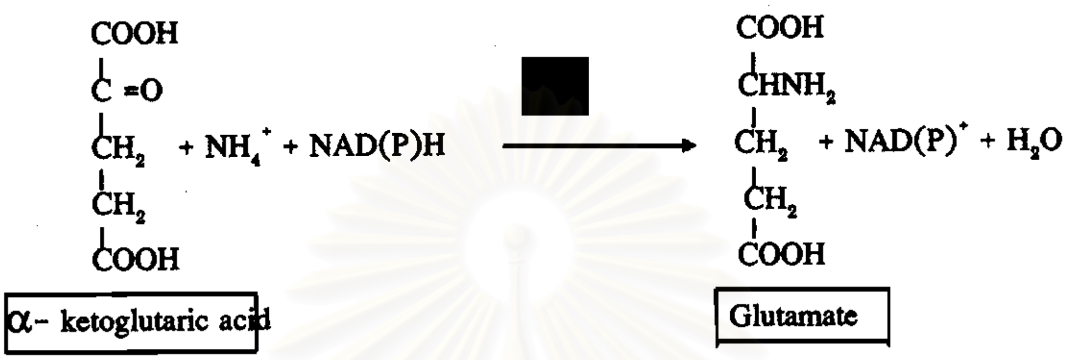
1. การที่แอมโมเนียมอิออนไปรวมตัวกับกรดα-คีโตกลูตาริก (α-ketoglutaric acid) แล้วเปลี่ยนเป็นกลูตาเมต โดยอาศัยเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase, GDH)ดังแสดงในรูปที่ 6ก. (Giller และWilson, 1991)

2. การที่กรดα-คีโตกลูตาริกรวมตัวกับแอมโมเนียมที่ได้จากกลูตามีน โดยอาศัยเอนไซม์กลูตามีน-2-ออกโซกลูตาเรต-อะมิโนทรานเฟอเรส (glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase, GOGAT) ทำให้ได้กรดกลูตามิก 2 โมเลกุล ซึ่งกรดกลูตามิกนี้สามารถนำมาเวียนใช้เป็นตัวรับแอมโมเนียมอิออน ซึ่งเมื่อกรดกลูตามิกรวมตัวกับแอมโมเนียมอิออนโดยอาศัยเอนไซม์กลูตามีน ซินทีเทส (glutamine synthetase, GS) ควบคู่กับการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของ ATP จะได้เป็นกลูตามีนซึ่งจะนำไปเวียนใช้เป็นตัวให้แอมโมเนียมอิออนในการสร้างกรดกลูตามิกต่อไป ซึ่งกรดกลูตามิกที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในขบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น ออร์นิทีน (ornithine) อาร์จินีน (arginine) และโปรลีน (proline) ได้ต่อไป ดังรูปที่ 6ข. (Giller และWilson, 1991)

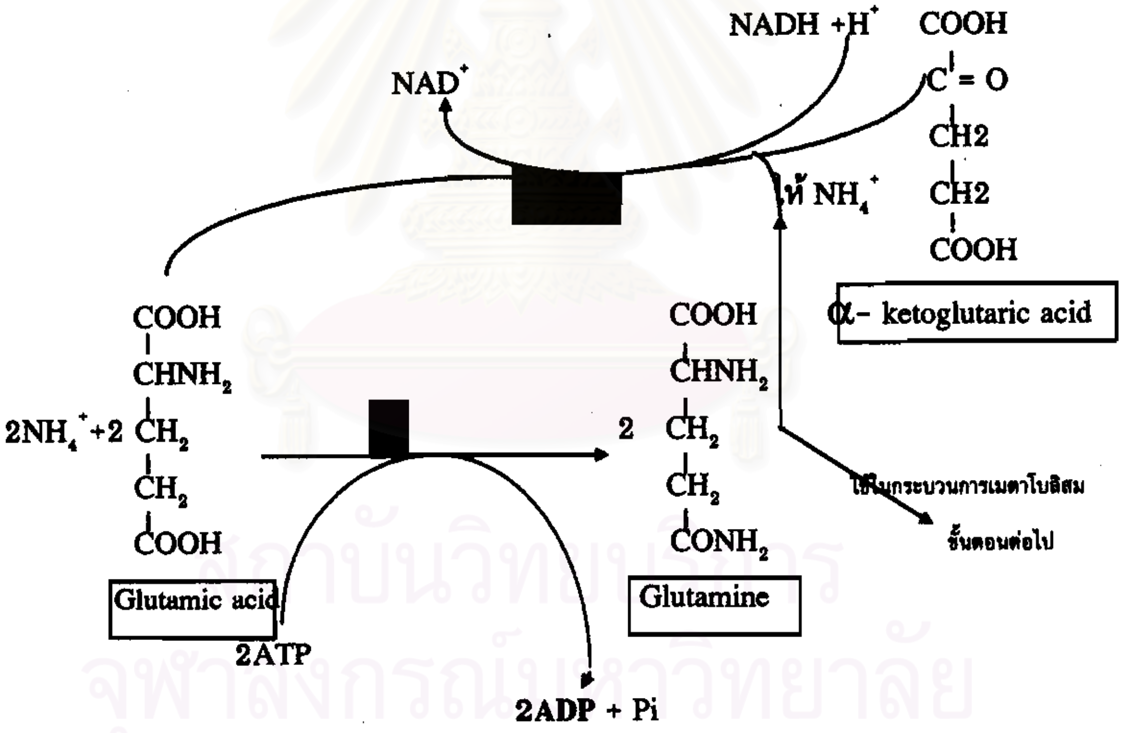
วิธีการป้องกันไม่ให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะสัมผัสกับออกซิเจน

1. การหลีกเลี่ยงการที่จะสัมผัสกับออกซิเจน ดังเช่นพวกที่เจริญอยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเช่น *Clostridium pasteurianum* พวกที่เจริญอยู่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเช่น *Klebsiella pneumoniae* โดยมีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นตัวควบคุมให้สังเคราะห์เอนไซม์นี้ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำเท่านั้น (Gussin และคณะ, 1986) โดยปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมคือ 0.03 μM ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนในน้ำซึ่งมีค่าถึง 225 μM (Hill, 1992)

ก)



ข)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ GDH, GS และ GOGAT (Giller และ Wilson, 1991)

ก) กลไกการทำงานของเอนไซม์ glutamate dehydrogenase (GDH)

ข) กลไกการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) และ glutamine-2-oxoglutamate aminotransferase (GOGAT)

2. การหลีกเลี่ยงที่จะสัมผัสกับออกซิเจนในสิ่งมีชีวิตที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งโดยปกติจะมีการหายใจเกิดขึ้น ถ้ามีออกซิเจนน้อยเกินไป ก็จะไม่เกิดการหายใจ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้ามีออกซิเจนมากเอนไซม์ไนโตรจีเนสก็จะไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นกิจกรรมของไนโตรจีเนสจะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณน้อย (microaerobic condition) เท่านั้น เช่นในพวก *Azospirillum brasilense* จะหลีกเลี่ยงโดยเคลื่อนตัวไปอยู่ในบริเวณที่มีแรงดันออกซิเจนต่ำ บางพวกอาจมารวมตัวเป็นโคโลนี พวกที่อยู่ใจกลางของโคโลนีก็จะมีแรงดันออกซิเจนต่ำ ซึ่งมักพบในพวกไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยว และ *Derxia gummosa* (Giller และ Wilson, 1991)

3. การสร้างผนังเซลล์ที่ออกซิเจนแพร่ผ่านไม่ได้เพื่อป้องกันออกซิเจน เช่นใน *Frankia* ที่สร้างเวสซิเคิล (vesicle) หรือในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นสาย (filamentous cyanobacteria) ที่สร้างเฮทเทอโรซีสต์ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ มีซองไขมัน (envelop) ที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ และไกลโคลิปิด (glycolipid) ซึ่งทำให้ออกซิเจนไม่สามารถแพร่ผ่านได้ (Giller และ Wilson, 1991)

4. การสร้างกลไกในการป้องกันออกซิเจนแพร่ผ่านชั้นคอร์เทค (cortex) ของปมราก โดยเซลล์ในชั้นคอร์เทคชั้นใน (inner cortex) จะเรียงตัวอัดกันแน่น โดยไม่มีช่องว่างคั่น นอกจากนี้เซลล์แบคทีเรียจะสร้างแผ่นเมนเบรน (membrane) มาห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนผ่านเข้าไป (Witty และMinchin, 1990) กลไกในการป้องกันออกซิเจนอีกอันหนึ่งคือ การที่ภายในปมรากจะมีเลคฮีโมโกลบินกระจายอยู่ ซึ่งเลคฮีโมโกลบินนี้จะมีความสามารถในการจับออกซิเจนได้สูง ช่วยดึงออกซิเจนออกจึงทำให้ไนโตรจีเนสไม่สัมผัสกับออกซิเจน (Giller และ Wilson, 1991)

5. การสร้างกลไกในการป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจนในพวก *Azotobacter* จะมีการป้องกันแบบอัตโนมัติ (auto-protection) โดยอาศัยเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสซึ่งจะเปลี่ยนออกซิเจนให้อยู่ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) แล้วเปลี่ยนไปเป็นน้ำต่อไปโดยเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส(supperoxide dismutase) (Hill, 1992)

ข้าว

ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2540 มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับ 4 โดยมีมูลค่าการส่งออกถึง 65,093.4 ล้านตัน เนื่องจากข้าวเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงประชากรเกือบครึ่งโลก ข้าวเป็นพืชเขตร้อนที่ต้องการอุณหภูมิ และความชื้นสูงสำหรับการเจริญเติบโต ข้าวจัดอยู่ในวงศ์ (family) Gramineae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* ซึ่งมีลักษณะเด่นคือ ดอกเป็นดอกเดี่ยว (ไสว พงษ์เก่า, 2534) นอกจากนี้ข้าวยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 พวกคือ

1. ข้าวปลูก (cultivated rice) ได้แก่ *Oryza sativa* ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด และ *Oryza glaberrima* มีปลูกเฉพาะแถบตะวันตกของทวีปแอฟริกาเท่านั้น

2. ข้าวป่า (wild rice) มีลักษณะเป็นวัชชพืช เมล็ดเล็ก ร่วงง่าย และเมล็ดมีหาง (awn) เท่าที่พบในประเทศไทยมี 5 species คือ *Oryza perennis, Oryza fatus, Oryza officinalis, Oryza granulata* และ *Oryza ridleyi*

ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกข้าว

1.ดิน

ข้าวเป็นพืชที่สามารถขึ้นได้ที่ระดับน้ำทะเลจนถึงที่สูง 2,500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และขึ้นได้ในดินชนิดต่าง ๆตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว มีความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 3-10

2. ปริมาณน้ำฝน

ข้าวไร่เป็นข้าวที่ใช้น้ำน้อยกว่าข้าวชนิดอื่น แต่ปริมาณน้ำฝนในแต่ละเดือนที่ทำให้ข้าวไร่งอกงามดีก็ไม่ควรน้อยกว่า 200 มิลลิเมตร

3. ปริมาณน้ำ

ข้าวเป็นพืชที่ต้องการน้ำมาก ในการเตรียมดินแปลงกล้าจะใช้น้ำ 150-200 มิลลิเมตร และน้ำสำหรับเลี้ยงกล้าเป็นเวลา 30-40 วัน ประมาณ 250-400 มิลลิเมตร

ความต้องการน้ำตั้งแต่ปักดำจนกระทั่งเก็บเกี่ยวอยู่ในระหว่าง 800-1,200 มิลลิเมตร และการใช้น้ำประจำวันในอัตรา 6-10 มิลลิเมตร

4. แสงอาทิตย์

แสงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการให้ผลผลิตของข้าว ในฤดูฝนเนื่องจากมีเมฆหมอกมากทำให้ความเข้มของแสงน้อยกว่าในฤดูแล้ง ทำให้ผลผลิตต่ำกว่าในฤดูแล้ง แสงมีความจำเป็นมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงการเริ่มสร้างดอกจนกระทั่ง 10 วันก่อนเมล็ดแก่

5. ความยาวของวัน

โดยทั่วไปข้าวเป็นพืชที่ต้องการช่วงความยาวของวันที่สั้น (short day) และมีความไวต่อช่วงแสง ดังนั้นถ้ามีวันยาว (long day) จะทำให้ต้นข้าวไม่ออกดอกหรือออกดอกล่าช้าออกไป

6. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมและทำให้ผลผลิตของข้าวสูงจะอยู่ในช่วง 25-33 องศาเซลเซียส

7. ลม

ลมอ่อนที่พัดในช่วงการเจริญจะช่วยทำให้ผลผลิตของข้าวสูงขึ้น เพราะอากาศที่พัดผ่านต้นข้าวจะช่วยนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้แก่ต้นข้าว แต่ถ้าลมแรงไปจะทำให้ต้นข้าวหักล้มได้

ชนิดของปุ๋ยและการใช้ปุ๋ยกับต้นข้าว

1.การให้ปุ๋ยอินทรีย์ (organic fertilizer) (ไสว พงษ์เก่า, 2534)

การใส่ปุ๋ยอินทรีย์ เช่นปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมักจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของดิน ทำให้ดินร่วนซุย แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก เนื่องจากมีธาตุอาหารต่ำกว่าปุ๋ยเคมี การใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะทำให้การใช้ปุ๋ยเคมีมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ดังนั้นในดินทั่ว ๆไปการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีจะทำให้ได้ผลดีที่สุด

2. การใช้ปุ๋ยเคมี หรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ (chemical fertilizer) (ไสว พงษ์เก่า, 2534)

ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียม เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก และดินนาส่วนใหญ่จะขาดหรือมีไม่เพียงพอ ในแปลงนาทั่วไปจะมีการตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน และฟอสฟอรัสสูงกว่าโปแตสเซียม วิธีการใส่ปุ๋ยเคมีตามทฤษฎีจะใส่ทั้งหมด 4 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ในระยะปักดำหรือก่อนปลูก ใส่ปุ๋ยทุกชนิดลงไปในแปลงเป็นปุ๋ยรองพื้น (basal application)

ปุ๋ยไนโตรเจน 1/4 ของทั้งหมด

ปุ๋ยฟอสเฟต ทั้งหมดที่ใช้

ปุ๋ยโปแตสเซียม 3/4 ของทั้งหมด

ครั้งที่ 2 ในระยะข้าวแตกกอ ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 1/4 ของทั้งหมด

ครั้งที่ 3 ในระยะ 12 วันก่อนดอกบาน ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 1/4 ของทั้งหมด เพื่อขยายขนาดดอก

ครั้งที่ 4 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโปแตสเซียมที่เหลือ เป็นปุ๋ยรองพื้นในระยะดอกบาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย