บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 สรีระสมบัติของแบคทีเรียที่นำมาศึกษา

เนื่องจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่จะเป็นต้นบทในการวิจัยนี้นั้น ได้รับการจำแนกจากนักวิจัยของกรมวิชาการเกษตรว่าเป็นเพียง Azotobacter spp. (เศรษฐา, 2529) ในขั้นแรกจึงจำเป็นต้องศึกษา ชนิดและสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะบางตัวซึ่งสอดคล้องกับเป้าประสงค์ของงานวิจัยนี้

ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

3.1.1 ลักษณะของโคโลนี

จากแบคทีเรียทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่ามี Azotobacter spp. เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่ไวต่อยาคานามัยซินและเตรทตราซัยคลิน ครั้นเมื่อนำสายพันธุ์ทั้งสองมาเจริญในอาหารสูตรของ Burk ก็พบความแตกต่างในการสร้างรูปร่างของโคโลนี มีสายพันธุ์หนึ่งให้เม็ดสี (pigment) สีน้ำตาลดำและเมือกมาก ต่อมาพบว่าสายพันธุ์ชนิดนี้คือ Azotobacter chroococcum และสายพันธุ์ชนิดที่โคโลนีมีเมือกน้อยกว่า คือ Azotobacter vinelandii (รูปที่ 3)

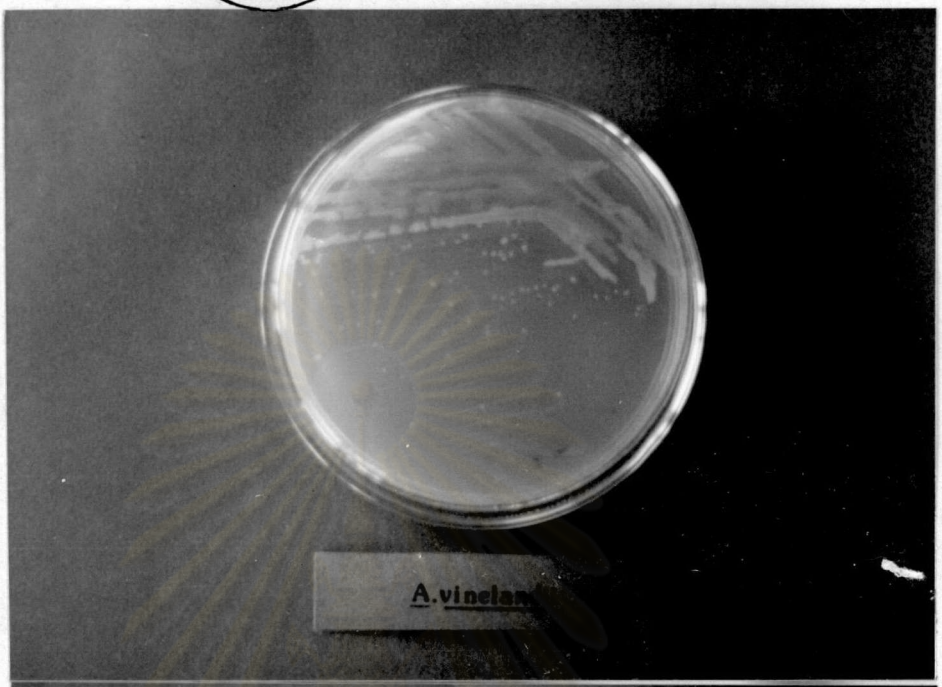
3.1.2 ความสามารถในการใช้สารต้นตอคาร์บอน

น้ำตาลตัวแรกที่นำมาทดสอบการจำแนกก็คือ Mannitol พบว่าในการเจริญในอาหารเหลวสูตรของ Burk ที่มี Mannitol 1% เป็นสารต้นตอคาร์บอนและ Bromothymol blue เป็นสีย้อม (pH indicator) เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที Azotobacter ทั้งสองชนิดเจริญได้ (รูปที่ 4) โดยที่สายพันธุ์มีเมือกน้อยให้คัลเจอร์สีเขียว อีกสายพันธุ์หนึ่งให้สีเหลือง

จากการทดลองโดยนัยยะเดียวกันเพียงแต่ใช้ Rhamnose 1% เป็นสารต้นตอคาร์บอน ครานี้พบว่าสายพันธุ์ที่มีเมือกน้อยเท่านั้นที่เจริญคือสีของคัลเจอร์จะเปลี่ยนสีจาก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

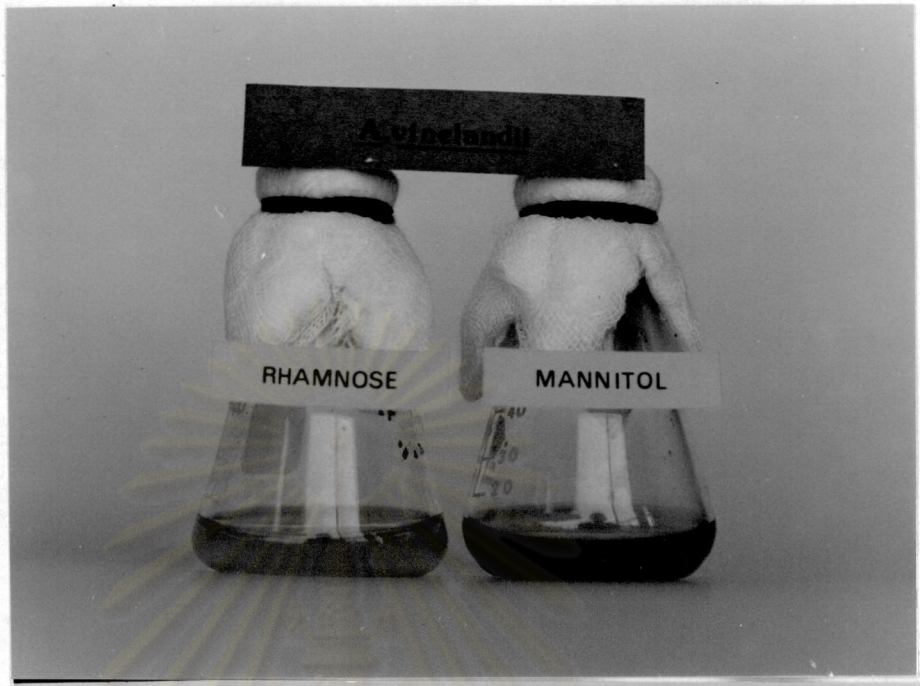
(3 ก.)



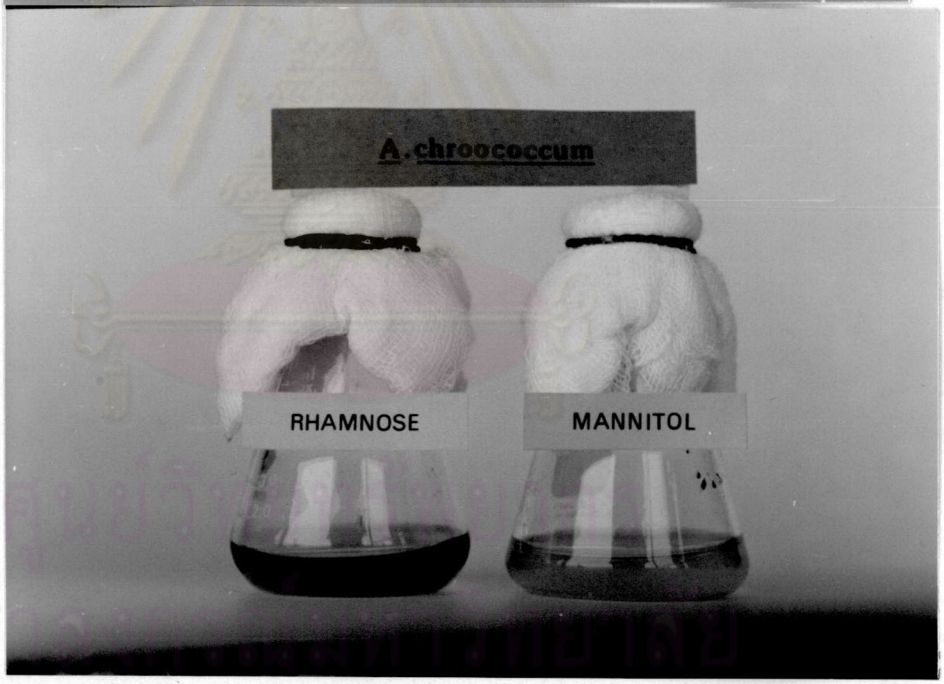
(3 ข.)

รูปที่ 3 ก. และ 3 ข. ลักษณะโคโลนีของ Azotobacter vinelandii และ Azotobacter chroococcum ซึ่งปลูกบนอาหารสูตร Burk บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน

(4 ก.)



(4 ข.)



รูปที่ 4 ลีของคัลเจอร์ของ A. vinelandii และ A. chroococcum ที่เจริญในอาหารสูตร Burk ที่มี 1% Rhamnose หรือ 1% Mannitol เป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที 2 วัน (4 ก.) A. vinelandii (4 ข.) A. chroococcum

สีฟ้าอมเขียวเป็นสีเหลืองและมีเซลล์ให้เห็นยัดได้ด้วยสายตา (รูปที่ 4)

เมื่อลองเปลี่ยนสารต้นตอคาร์บอนเป็นน้ำแป้ง และลังเกตการเจริญบนอาหารแข็งที่มีน้ำแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน ดราวนี้เฉพาะสายพันธุ์ที่มีเมือกมากและให้เม็ดสีสีน้ำตาลดำเจริญได้ ซึ่งทดสอบให้เด่นยัดขึ้นโดยการนำสารละลายไอโอดีนในโปรแตสเซียมไอโอไดด์เทราดทับจะเห็นสีขาวเด่นยัดขึ้นเฉพาะในสายพันธุ์ที่มีเม็ดสีเท่านั้น (รูปที่ 5) ผลการทดลองทั้งหมดสรุปรวมได้ในตารางที่ 4 และดังนั้นจึงสรุปว่า สายพันธุ์ที่จะนำมาวิจัย ณ ที่นี้มี 2 ชนิดคือ ชนิดที่เป็น Azotobacter chroococcum และชนิดที่เป็น Azotobacter vinelandii

3.1.3 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการวิจัยต้องการเคลื่อนพลาสมิด pCK3 ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะชนิดที่มียีนเครื่องหมาย คือยีนต้านยาเตรทตราซัยคลินและคานามัยซิน ดังนั้นในขั้นแรกจะต้องทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะทั้งสองที่สามารถระงับการเจริญของ Azotobacter ทั้งสองชนิดอย่างสิ้นเชิง จากการกระจายเซลล์ 10^7 เซลล์บนจานอาหารสูตรของ Bunk ที่มีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนและเสริมด้วยยาปฏิชีวนะเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าด้วยความเข้มข้นดังกล่าวสามารถระงับการเจริญของ A. vinelandii และ A. chroococcum ได้ (ตารางที่ 5)

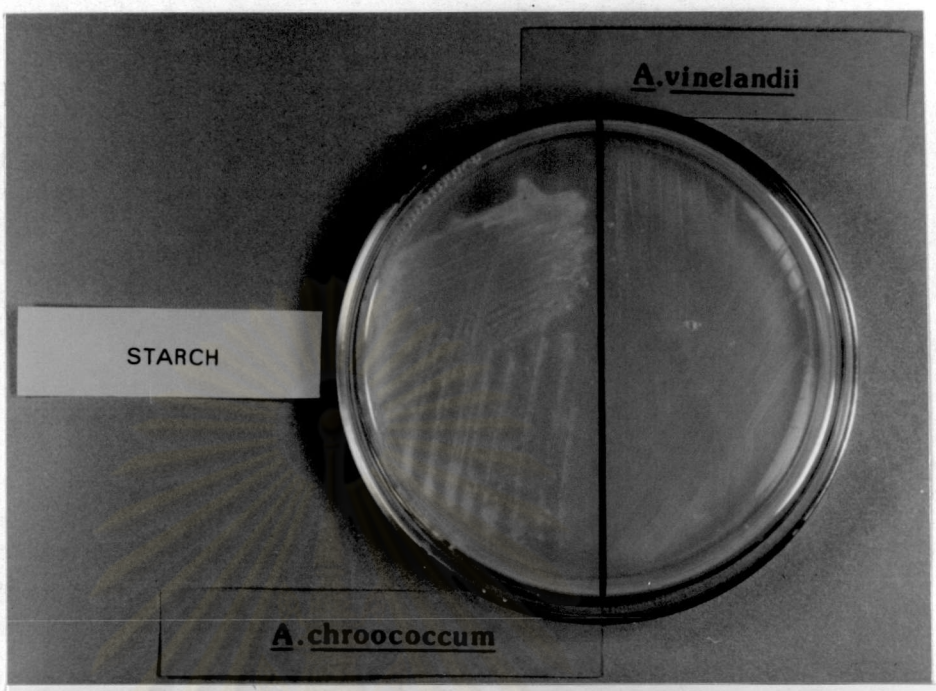
3.1.4 รูปแบบการตรึงไนโตรเจน

เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตและแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรเจนเนส จึงได้ติดตามความขุ่นของคัลเจอร์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่น (ARA) ในอาหารที่มีและไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน ผลการทดลองสรุปรวมในรูปที่ 6 - 9

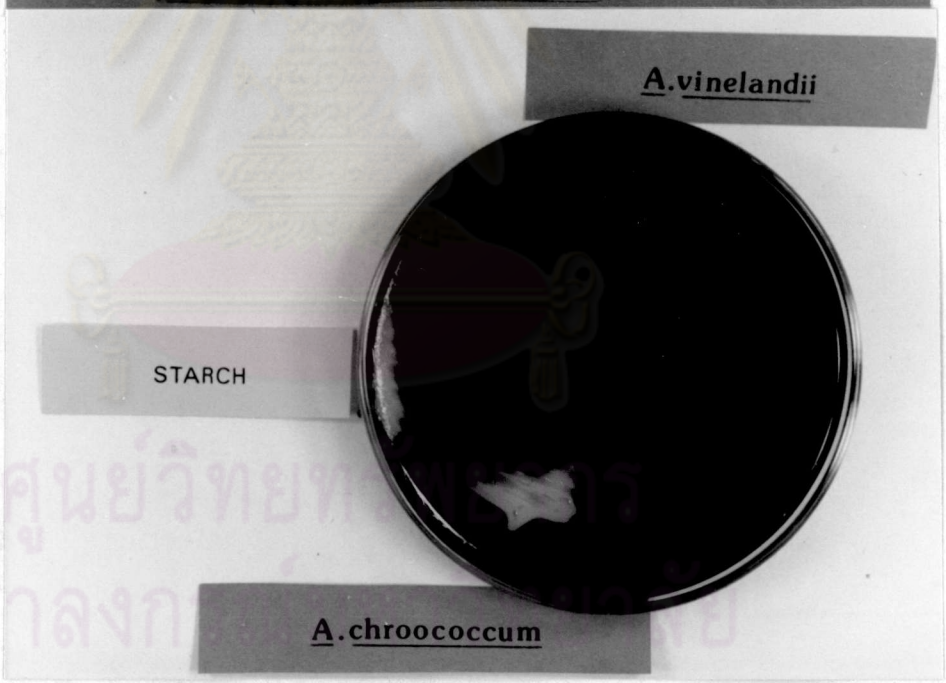
ก. ในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน

A. vinelandii สามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ความขุ่นสูงสุดเป็น 170 Klett unit ในระยะต้นของการเจริญค่า ARA เพิ่มขึ้นตาม

(5 ก.)



(5 ข.)



รูปที่ 5 ความสามารถในการใช้แป้งเป็นสารตั้นตอคาร์บอนของ A. vinelandii และ A. chroococcum สตรีคบนอาหารสูตร Burk ที่มี 1% น้ำแป้ง เป็นสารตั้นตอคาร์บอน (5 ก.) การเจริญของแบคทีเรียทั้งสอง บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน (5 ข.) นำเพลท (5 ก.) มาหยดสารละลายไอโอดีน จะเห็นสีน้ำเงินเข้มในบริเวณที่มีแป้ง ส่วนบริเวณที่ A. chroococcum เจริญอยู่ไม่เกิดสีเนื่องจากแป้งในบริเวณนั้นได้ถูกนำไปใช้

ตารางที่ 4 ความสามารถในการใช้สารต้นตอคาร์บอนของ Azotobacter vinelandii และ Azotobacter chroococcum เพื่อการเจริญเติบโต

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดของสารต้นตอคาร์บอน		
	แป้ง[1]	Mannitol[2]	Rhamnose[2]
A. vinelandii	ไม่เจริญ	เจริญ	เจริญ
A. chroococcum	เจริญ	เจริญ	ไม่เจริญ

(1) เป็นผลสรุปจากรูปที่ 4

(2) เป็นผลสรุปจากรูปที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความไวของ A. vinelandii และ A. chroococcum ต่อยาปฏิชีวนะ

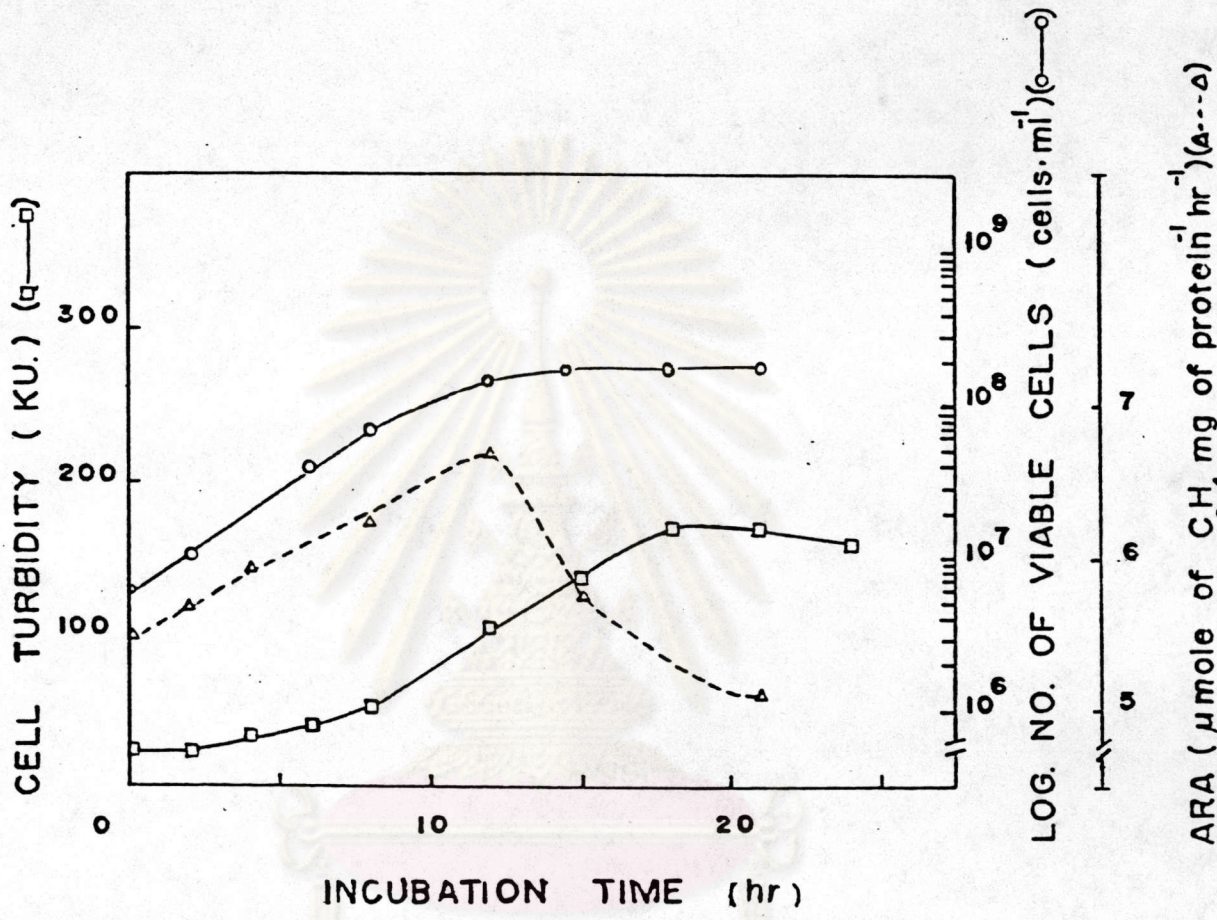
ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะ (1)	จำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในอาหารที่มีเตรทตราซัยคลินเข้มข้น 5 $\mu g.ml^{-1}$ (2)	จำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในอาหารที่มีคานามัยซินเข้มข้น 50 $ng.ml^{-1}$ (2)
A. vinelandii	1×10^7	0	0
A. chroococcum	1×10^7	0	0

(1) กระจายเซลล์ประมาณ 1×10^7 เซลล์บนจานอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะ บ่มที่ 30°ซ. 2 วัน

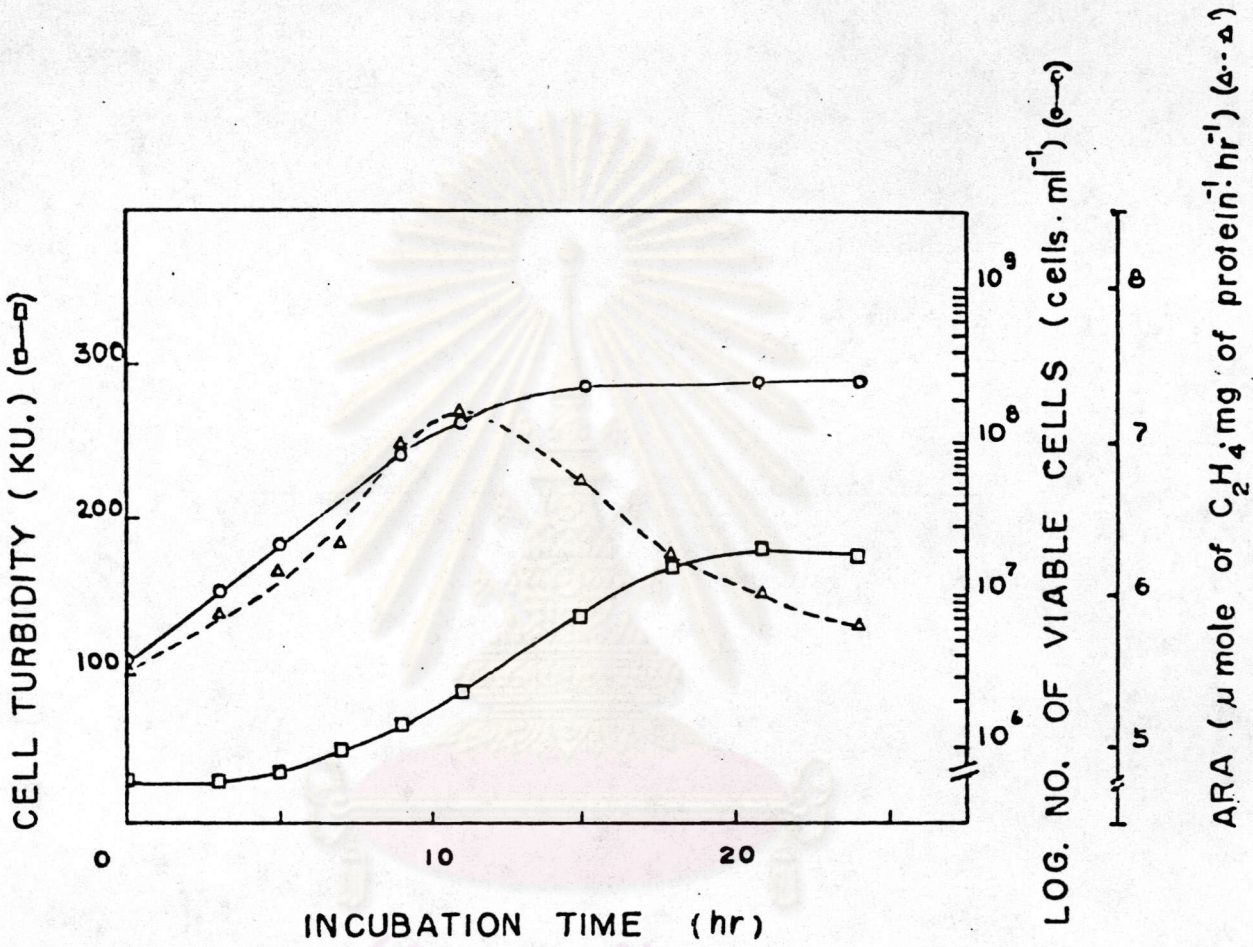
(2) กระจายเซลล์ประมาณ 1×10^7 เซลล์บนจานอาหารที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะความเข้มข้นตามที่ระบุไว้ บ่มที่ 30°ซ. 2 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i10299865

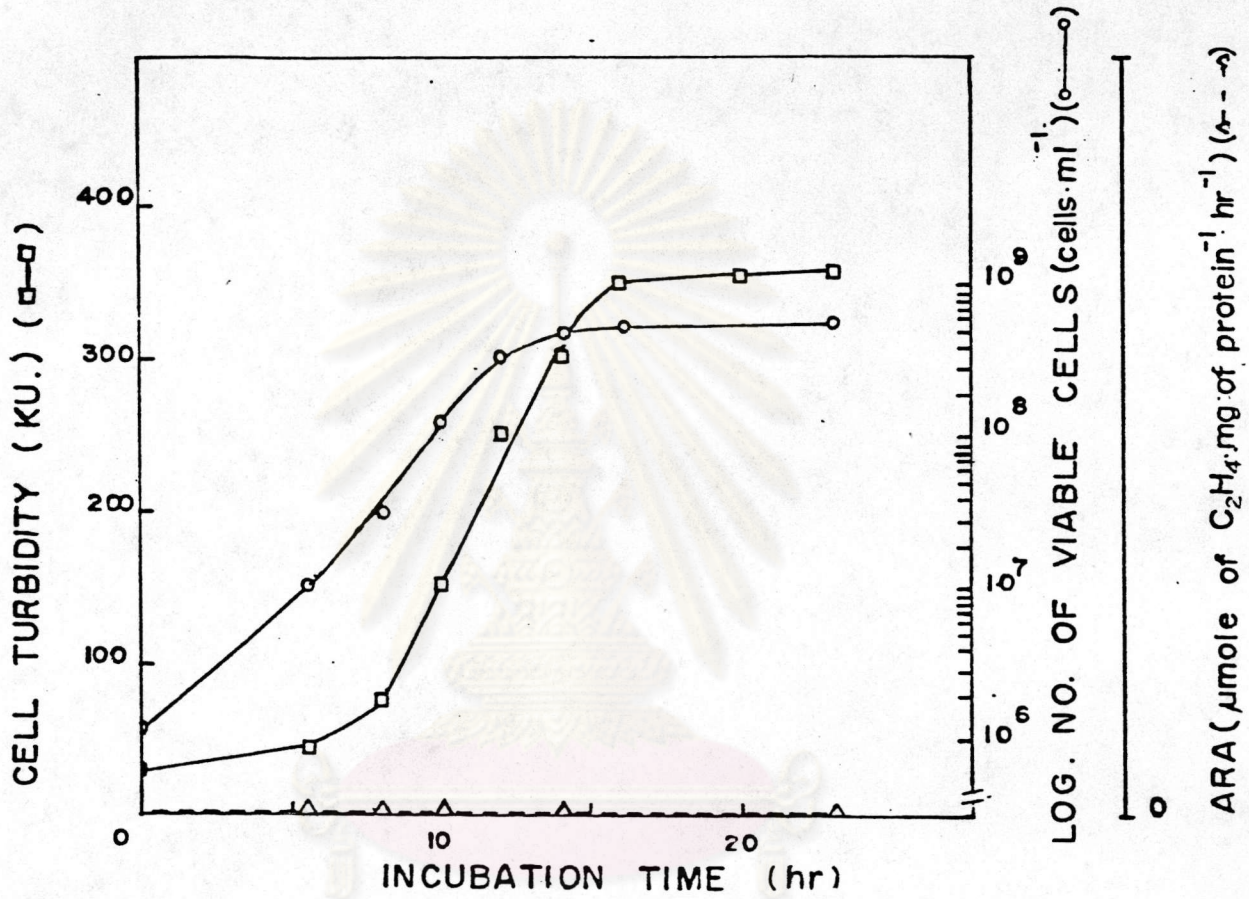


รูปที่ 6 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน-รีดัคชั่นของ A. vinelandii ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจนและมี 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

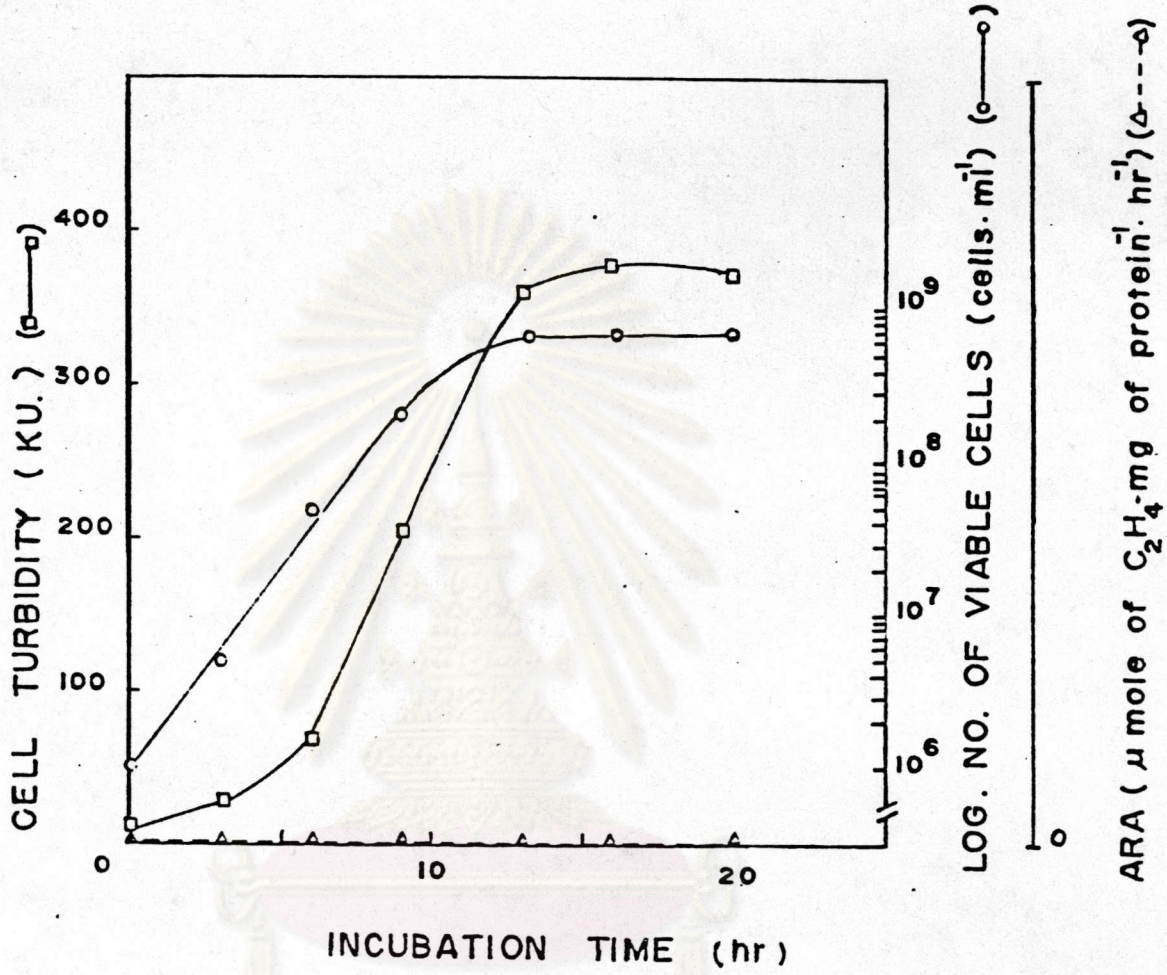


รูปที่ 7 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน-รีดัคชั่นของ A. chroococcum ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และมี 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน-รีดัคชั่นของ A. vinelandii ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน และ 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 9 รูปแบบของความยุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน-รีดัคชั่นของ A. chroococcum ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน และ 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ความขุ่นของคัลเจอร์และมีค่าสูงสุดในช่วงการเจริญที่ระยะการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 6.7 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ต่อจากนั้นค่า ARA กลับลดลงเมื่อความขุ่นของคัลเจอร์เพิ่มขึ้น มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 6)

ในทำนองเดียวกัน A. chroococcum ก็สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน โดยมีความขุ่นสูงสุดเป็น 180 Klett unit ARA เพิ่มขึ้นตามความขุ่นของคัลเจอร์จนมีค่าสูงสุด 7.2 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงในระยะการแบ่งตัวทวีคูณแล้วกลับลดลง ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับใน A. vinelandii และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุด 3×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 7)

ข. ในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน

Azotobacter ทั้งสองชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 มิลลิโมลาร์เป็นสารต้นตอไนโตรเจน และไม่ให้ค่า ARA ตลอดระยะการเจริญ

A. vinelandii มีค่าความขุ่นสูงสุดเป็น 360 Klett unit และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 6×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 8) สำหรับ A. chroococcum มีค่าความขุ่นสูงสุดเป็น 380 Klett unit และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 7×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 9) และพบว่า Doubling time ของ Azotobacter ทั้งสองชนิดในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนมีค่าเท่ากัน สำหรับในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจนนั้น Doubling time ของ A. vinelandii มีค่ามากกว่า A. chroococcum เล็กน้อย (ตารางที่ 6) น่าสังเกตว่าจำนวนเซลล์สูงสุดที่พบในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนจะน้อยกว่าในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน และ Azotobacter ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้เท่า ๆ กัน

3.2 สมบัติของพลาสมิด pCK3

pCK3 เป็นพลาสมิดพาหะอนุพันธ์ของ pRK 290 ที่มียีน nif A จาก Klebsiella pneumoniae ยีนต้านยาเตรทตราซัยคลินและคานามัยซินอยู่ด้วย การถอดรหัสของยีน nif A จะมีผลต่อการถอดรหัสของยีนต้านยาคานามัยซิน กล่าวคือ ถ้าไม่มีการถอดรหัสของยีน nif A

ตารางที่ 6 ลักษณะการเจริญของ A. vinelandii และ A. chroococcum[1]

ชนิดของอาหารและชื่อสายพันธุ์	Doubling Time[2] (hr.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (cell.ml^{-1})	แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของอะเซทิลีนรีดักชั่น (μmole of C_2H_4 mg of protein.$^{-1}$hr^{-1})
อาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน			
A. vinelandii	3.30	2×10^8	6.7
A. chroococcum	3.30	3×10^8	7.2
อาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน			
A. vinelandii	2.15	6×10^8	0.0
A. chroococcum	2.00	7×10^8	0.0

(1) เป็นผลสรุปจากรูปที่ 6 - 9

(2) ค่าของ Doubling time คำนวณได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก็จะไม่มีการถอดรหัสของยีนต้านยาคานามัยซินด้วย พลาสมิด pCK3 มีขนาด 27 kb มีตำแหน่งตัดสำหรับ Restriction enzyme ที่รู้จักว่า EcoRI และ SalI ดังรูปที่ 10 เพื่อทดสอบว่าพลาสมิดที่แยกมาศึกษาเป็น pCK3 จริงจึงได้ลองนำมาตัดด้วย EcoRI และ SalI พบว่าหลังจากย่อย pCK3 โดยสมบูรณ์แยกต่างหากจากกันจะพบยีนดีเอนเอ ปลายเปิดขนาด 27 kb แต่ถ้าย่อยด้วย EcoRI และ SalI ร่วมกันอย่างสมบูรณ์จะได้ยีนดีเอนเอขนาด 19 และ 8 kb ตามลำดับ (รูปที่ 11)

3.3 การสร้างทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3

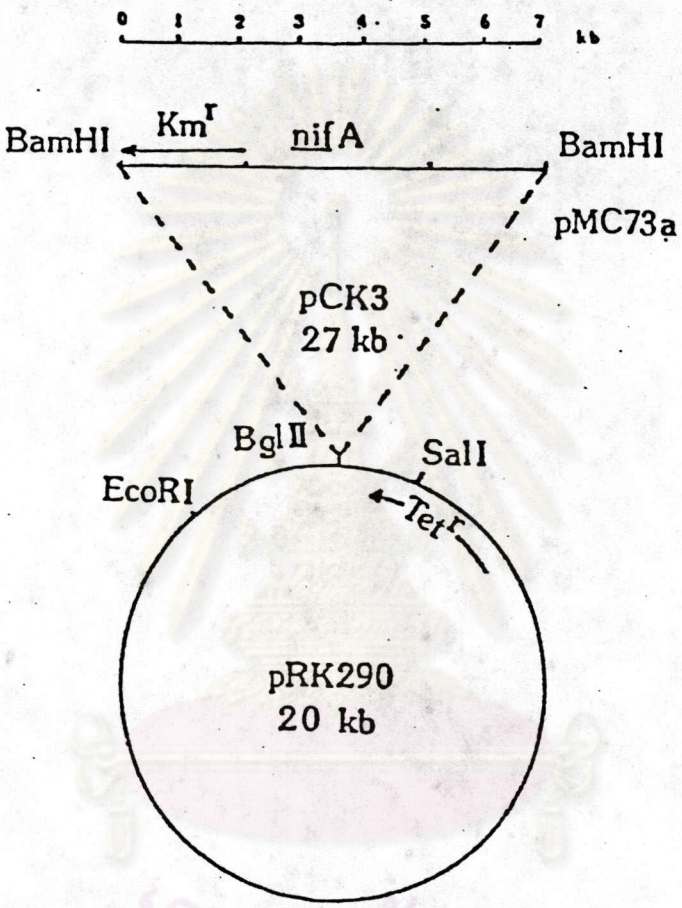
ได้เคลื่อน pCK3 เข้าสู่เซลล์ของ Azotobacter ด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชั่น ขั้นตอนในการเตรียม Competent cells ทำโดยเจริญ Azotobacter ใน TF medium ซึ่งเป็นอาหารที่ขาดอิออนเหล็ก

3.3.1 ผลของอิออนเหล็กต่อการเจริญของแบคทีเรีย

จากการเปรียบเทียบการเจริญของ Azotobacter ใน TF medium และ TF medium ที่เสริม Ferrous sulfate 18 มิลลิโมลาร์ ไม่พบความแตกต่างในรูปแบบของการเจริญแต่อย่างใด (รูปที่ 12)

3.3.2 ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์เมชั่น

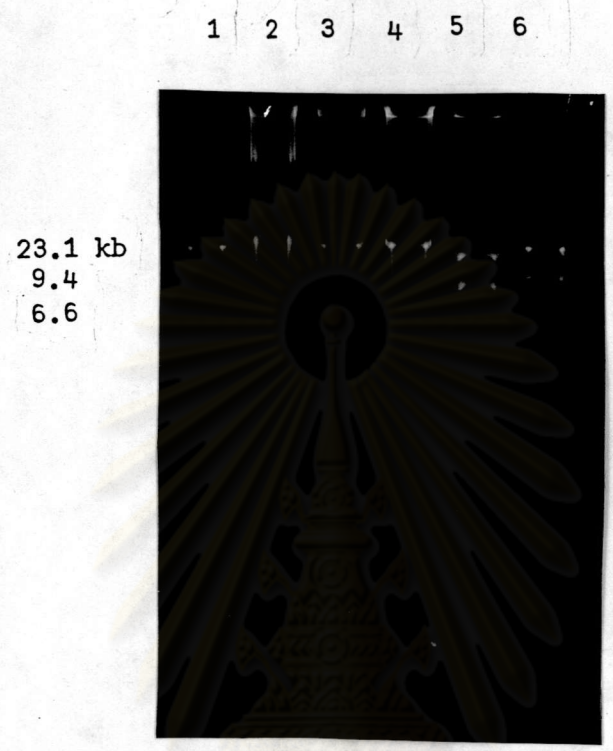
เมื่อทรานสฟอร์ม pCK3 เข้าสู่ Azotobacter ซึ่งเป็น Competent cells และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารแข็งที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ 2 แบบ คือ เสริมด้วยเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและคานามัยซิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเสริมด้วยเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพียงอย่างเดียว พบว่ามีทรานสฟอร์แมนท์เกิดขึ้นบนอาหารแข็งที่เสริมด้วยเตรทตราซัยคลินเพียงอย่างเดียว . โดยมีประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์เมชั่นของ A. vinelandii และ A. chroococcum เท่ากับ 1.2×10^9 และ 2×10^7 เซลล์ต่อกรัมของพลาสมิด ตามลำดับ



รูปที่ 10 แผนผังเรสติคยั่นของพลาสมิด pCK3 ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของพลาสมิด pRK290 BamHI , BglII , EcoRI, SalI เป็น Restriction endonucleases

Km^r และ Tet^r = สมบัติการทนทานต่อคานามัยซินและเตรทตราซัยคลิน ตามลำดับ

nif A = ยีน nif A



รูปที่ 11 ผลของการย่อยพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ด้วยเอนไซม์ EcoRI และ SalI บน 0.6% Agarose gel electrophoresis

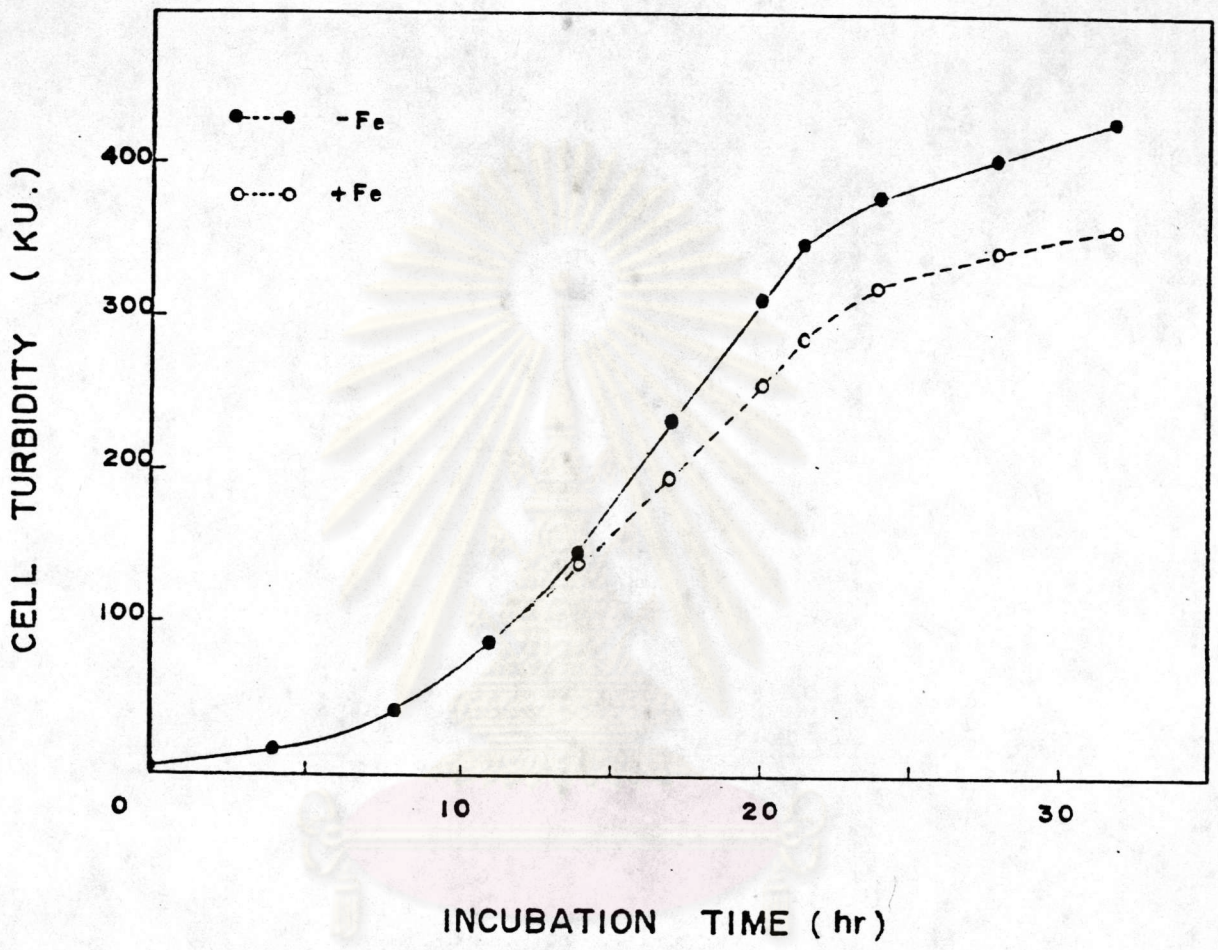
ช่องที่ 1, 6 คือ Standard λ-DNA ซึ่งย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ พลาสมิด ดีเอนเอ pCK3

ช่องที่ 3 คือ ยีนพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ซึ่งย่อยด้วย EcoRI ได้ยีนขนาด 27 kb

ช่องที่ 4 คือ ยีนพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ซึ่งย่อยด้วย SalI ได้ยีนขนาด 27 kb

ช่องที่ 5 คือ ยีนพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ซึ่งย่อยด้วย EcoRI และ SalI ได้ยีนขนาด 19 และ 8 kb



รูปที่ 12 รูปแบบของการเจริญของ A. vinelandii ใน TF medium (อาหารสูตรขาดอิออนเหล็ก) และ TF medium ที่เสริมด้วย Ferrous sulfate 18 mM เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.3.3 สมบัติของทรานสฟอร์มแมนท์ที่แยกได้

ก. ผลของยาปฏิชีวนะต่อการสร้างโคโลนี

เลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จาก Azotobacter ทั้งสองชนิดอย่างละ 25 ตัว ให้ชื่อว่า TF1(pCK3) ..... TF25(pCK3) สำหรับ A. vinelandii และ TFC1(pCK3) .....TFC25(pCK3) สำหรับ A. chroococcum หลังจากนำมาทำให้บริสุทธิ์และทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะเทียบกับสายพันธุ์ WT ผลการทดลองสรุปในตารางที่ 7 รูปที่ 13 และ 14 กล่าวคือ ยีดจำกัดความเจริญของทรานสฟอร์-แมนท์ทุกตัวจะอยู่ที่การเสริมยาปฏิชีวนะเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานา-มัยซิน 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7) เพื่อเป็นตัวอย่างผลการทดลองจึงได้ถ่ายภาพลักษณะการเจริญของทรานสฟอร์แมนท์บางตัวมาแสดงไว้ (รูปที่ 13, 14)

นอกจากนี้ยังได้สุ่มทรานสฟอร์แมนท์บางตัวมาสกัดพลาสมิดพาหะ pCK3 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งพบว่าทรานสฟอร์แมนท์ทุกตัวจะให้พลาสมิดขนาด 27 kb(รูปที่ 15)

ข. การตรึงไนโตรเจนในสภาพอิสระ

เพื่อทดสอบความสามารถในการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนส เมื่อมีและไม่มีสารต้นต่อไนโตรเจน จึงได้นำเซลล์ของ Azotobacter ทั้งสองชนิดมาทดสอบหาค่า ARA ผลการทดลองสรุปในตารางที่ 8

ในอาหารที่ปราศจากสารต้นต่อไนโตรเจน ทรานสฟอร์แมนท์ของ Azotobacter ทั้งสองชนิดจะให้ค่า ARA ที่ต่ำกว่า WT เล็กน้อย คืออยู่ในช่วง 200 - 300 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงสำหรับทรานสฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii และ 230 - 320 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงสำหรับทรานฟอร์แมนท์ของ A. chroococcum สำหรับ WT ของ A. vinelandii และ A. chroococcum มีค่า ARA เท่ากับ 325 และ 336 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัม-โปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่ในอาหารที่เสริมด้วย Ammonium acetate 15 มิลลิ-โมลาร์ค่า ARA ของ WT ไม่ปรากฏหรือคือเท่ากับศูนย์ในขณะที่ทรานสฟอร์แมนท์ทุกสายพันธุ์ของ Azotobacter ทั้งสองชนิดจะให้ค่าประมาณ 30 - 60 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง น่าสังเกตว่าค่า ARA ที่ได้จากสายพันธุ์ทรานสฟอร์แมนท์ทั้งหมด

ตารางที่ 7 ความไวของ Azotobacter spp. WT และทรานสฟอร์แมนท์ต่อยาปฏิชีวนะเตรทตราซัยคลิน และคานามัยซิน (1)

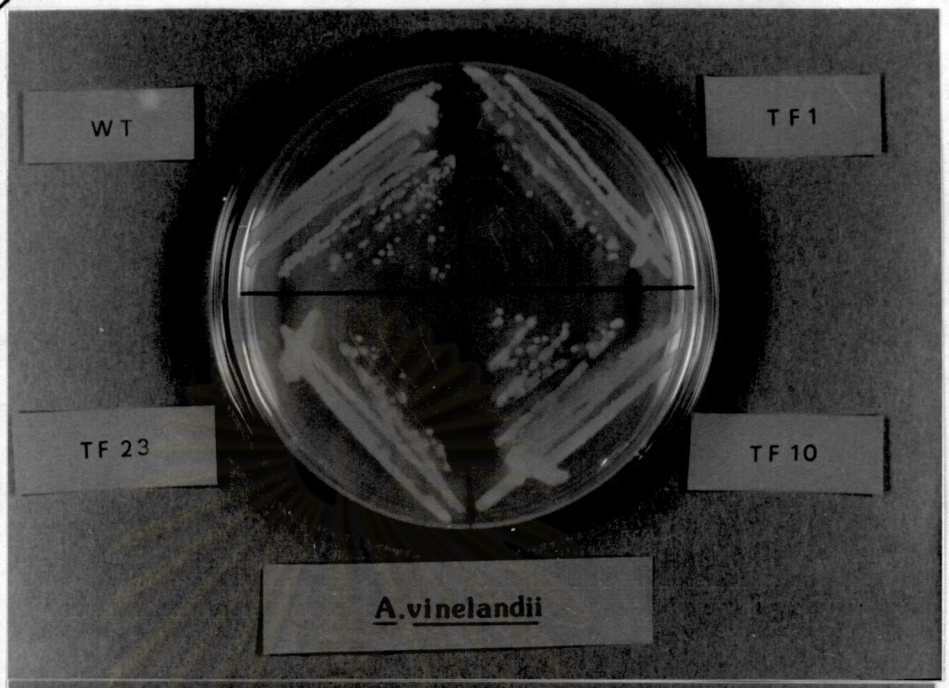
ชื่อสายพันธุ์	การเจริญในอาหารที่มีเตรทตราซัยคลินเข้มข้น 5 $\mu g.ml^{-1}$	การเจริญในอาหารที่มีคานามัยซินเข้มข้น 50 $ng.ml^{-1}$
A. vinelandii		
WT	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
TF1(pCK3)...TF25(pCK3)	เจริญ	เจริญ
A. chroococcum		
WT	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
TF1(pCK3)...TF25(pCK3)	เจริญ	เจริญ

(1) เลือกทรานสฟอร์แมนท์บางสายพันธุ์ ถ่ายภาพแสดงการเปรียบเทียบในรูปที่ 13 และ 14

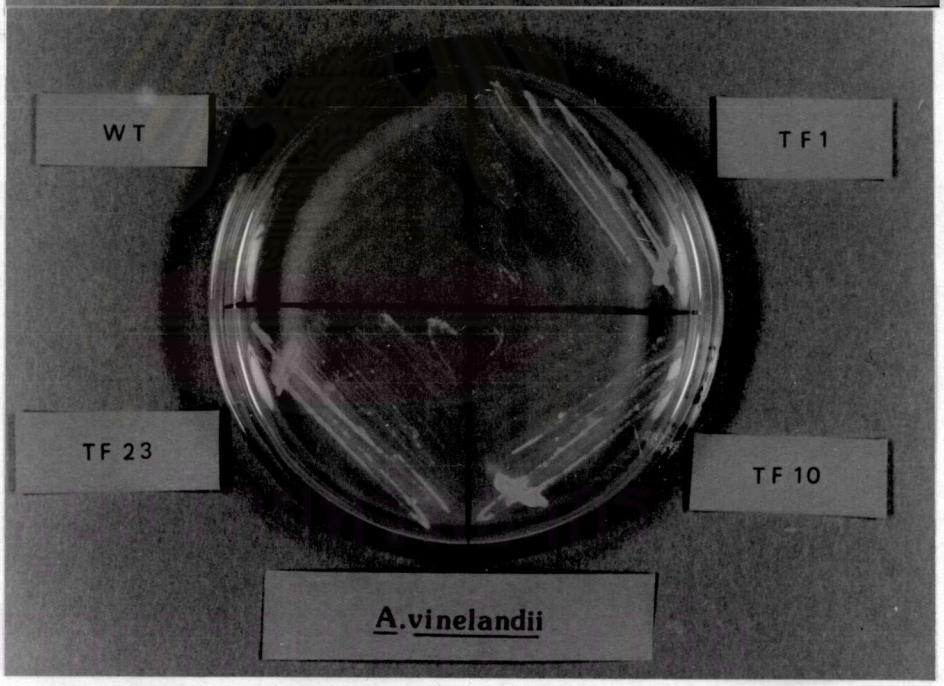
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(13 ก.)



(13 ข.)

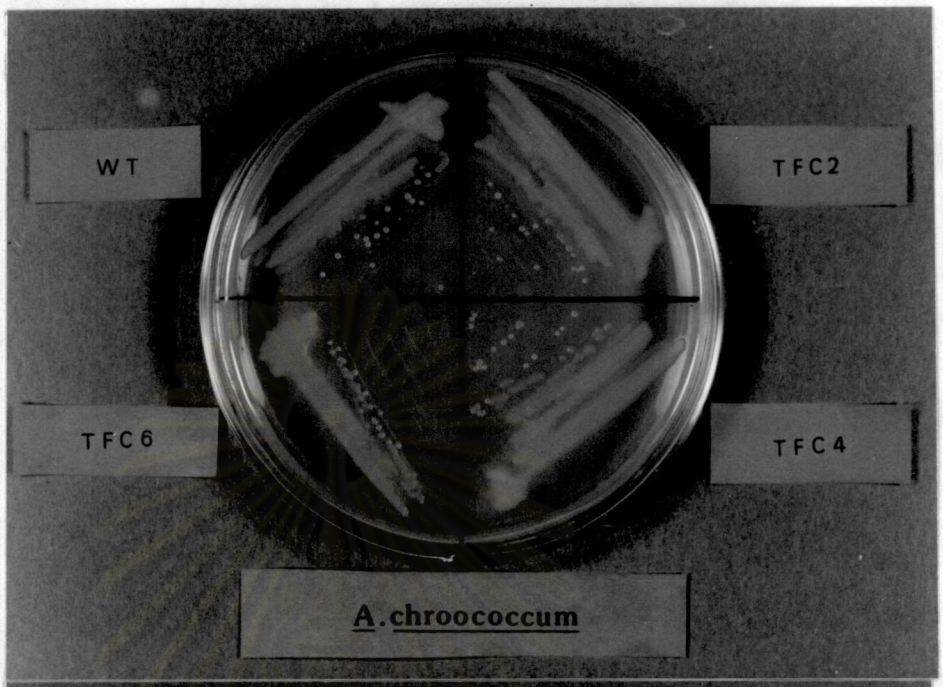


รูปที่ 13 เปรียบเทียบการทนทานต่อยาปฏิชีวนะของ A. vinelandii WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ (13 ก.) ไม่มียาปฏิชีวินะ (13 ข.) มีเตรทตราซัยคลินเข้มข้น 5 $\mu g.ml^{-1}$ และคานามัยซินเข้มข้น 50 $ng.ml^{-1}$

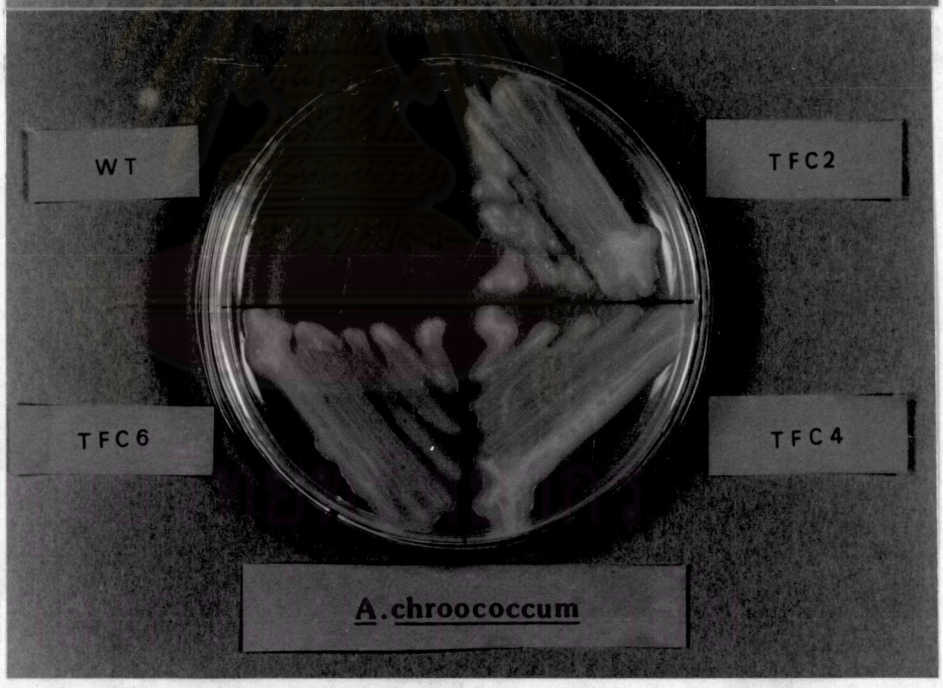
WT = Wild Type

TF1, TF10 และ TF23 = ทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii (ได้จากการนำพลาสมิด pCK3 เข้าเซลล์)

(14 ก.)



(14 ข.)



รูปที่ 14 เปรียบเทียบการทนทานต่อยาปฏิชีวนะของ A. chroococcum WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ (14 ก.) ไม่มียาปฏิชีวนะ (14 ข.) มีเตรทตราซัยคลินเข้มข้น 5 $\mu g.ml^{-1}$ และคานามัยซินเข้มข้น 50 $ng.ml^{-1}$

WT = Wild Type

TFC2, TFC4 และ TFC6 = ทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. chroococcum (ได้จากการนำพลาสมิด pCK3 เข้าเซลล์)

รูปที่ 15 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอของทานสฟอร์แมนท้ยอง Azotobacter โดยการทำให้เซลล์แตกยณะอีเลคโตรโฟรีซีส

ช่องที่ 1 คือ Standard λ-DNA ซึ่งย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ Standard λ-DNA

ช่องที่ 3 - 7 คือ Chromosomal DNA และพลาสมิด pCK3 ของทรานสฟอร์แมนท้ยอง Azotobacter

ตารางที่ 8 ทดลอบ derepression ของ ARA ใน Azotobacter spp. WT และ ทรานส์ฟอร์แมนท์ ที่มีพลาสมิด pCK3 (1)

ชื่อสายพันธุ์	ARA เมื่อเจริญในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน (n mole of C_2H_4. mg of protein^{-1}.hr^{-1})	ปริมาณโปรตีน (mg of protein . ml^{-1})	ARA เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน (n mole of C_2H_4. mg of protein^{-1}.hr^{-1})	ปริมาณโปรตีน (mg of protein . ml^{-1})
A. vinelandii				
WT	0	0.090	325	0.045
TE6(pCK3)	53	0.040	200	0.020
TF10(pCK3)	47	0.047	230	0.023
TF14(pCK3)	55	0.030	250	0.022
TF19(pCK3)	60	0.045	200	0.015
TE23(pCK3)	57	0.045	300	0.023
A. chroococcum				
WT	0	0.080	326	0.063
TFC1(pCK3)	54	0.083	240	0.070
TFC2(pCK3)	38	0.125	320	0.040
TFC4(pCK3)	49	0.081	250	0.033
TFC10(pCK3)	36	0.075	250	0.020
TFC11(pCK3)	33	0.068	230	0.025

(1) ทำการทดลองโดยเขี่ยโคโลนีจากจานแม่ลงในอาหารเหลว เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตจึงนำไปวัดค่า ARA

ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ด้วยเหตุนี้จึงได้เลือก TF23(pCK3) เป็นตัวแทนศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเจริญกับ ARA ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

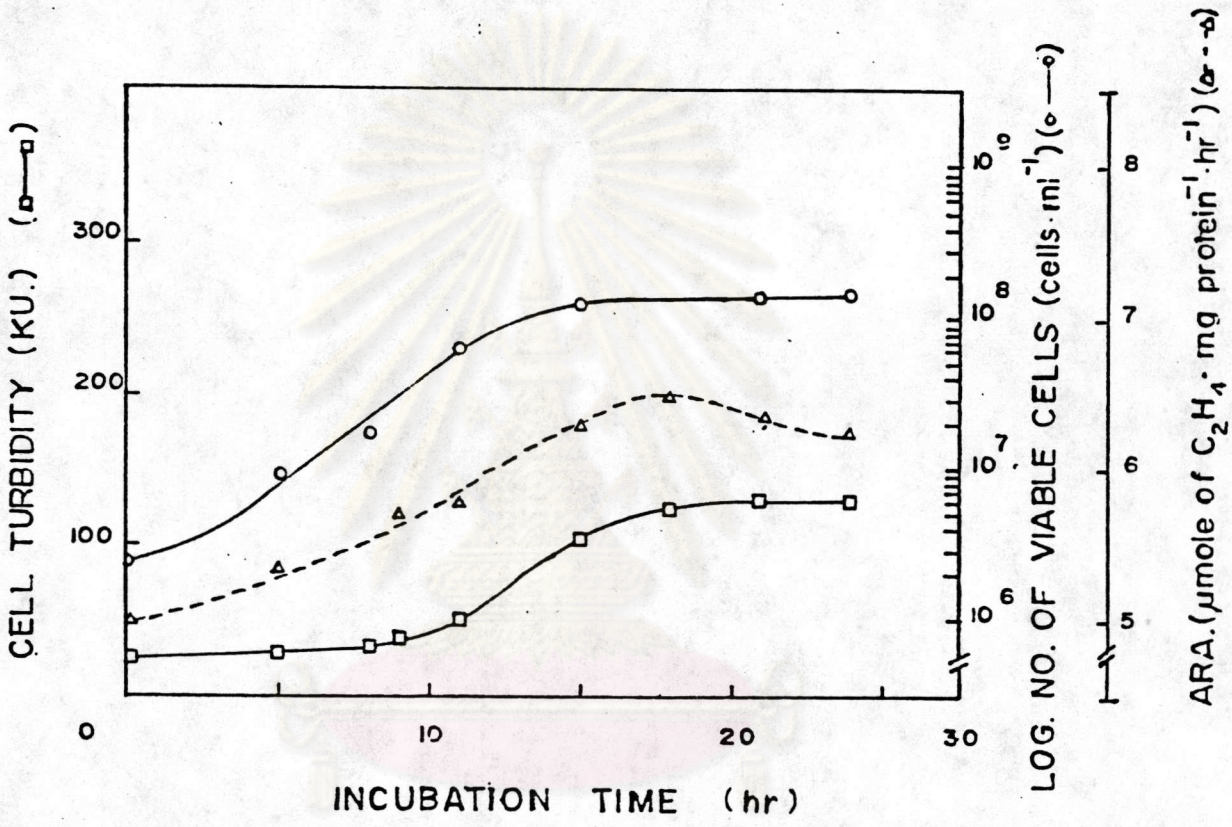
ค. รูปแบบการตรึงไนโตรเจนของทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3

รูปที่ 16 เป็นความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้จากการเจริญของ A. vinelandii TF23(pCK3) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจนซึ่งปรากฏว่ามีความขุ่นสูงสุดเป็น 130 Klett unit มีค่า ARA สูงสุดเท่ากับ 6.5 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นที่น่าสังเกตว่ารูปแบบการตรึงไนโตรเจนของ TF23(pCK3) ในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนแตกต่างจากของ WT ในอาหารชนิดเดียวกัน คือเมื่อค่า ARA เพิ่มขึ้นจนสูงสุดแล้วอัตราการลดลงของค่า ARA ใน TF23(pCK3) จะลดลงน้อยกว่าใน WT

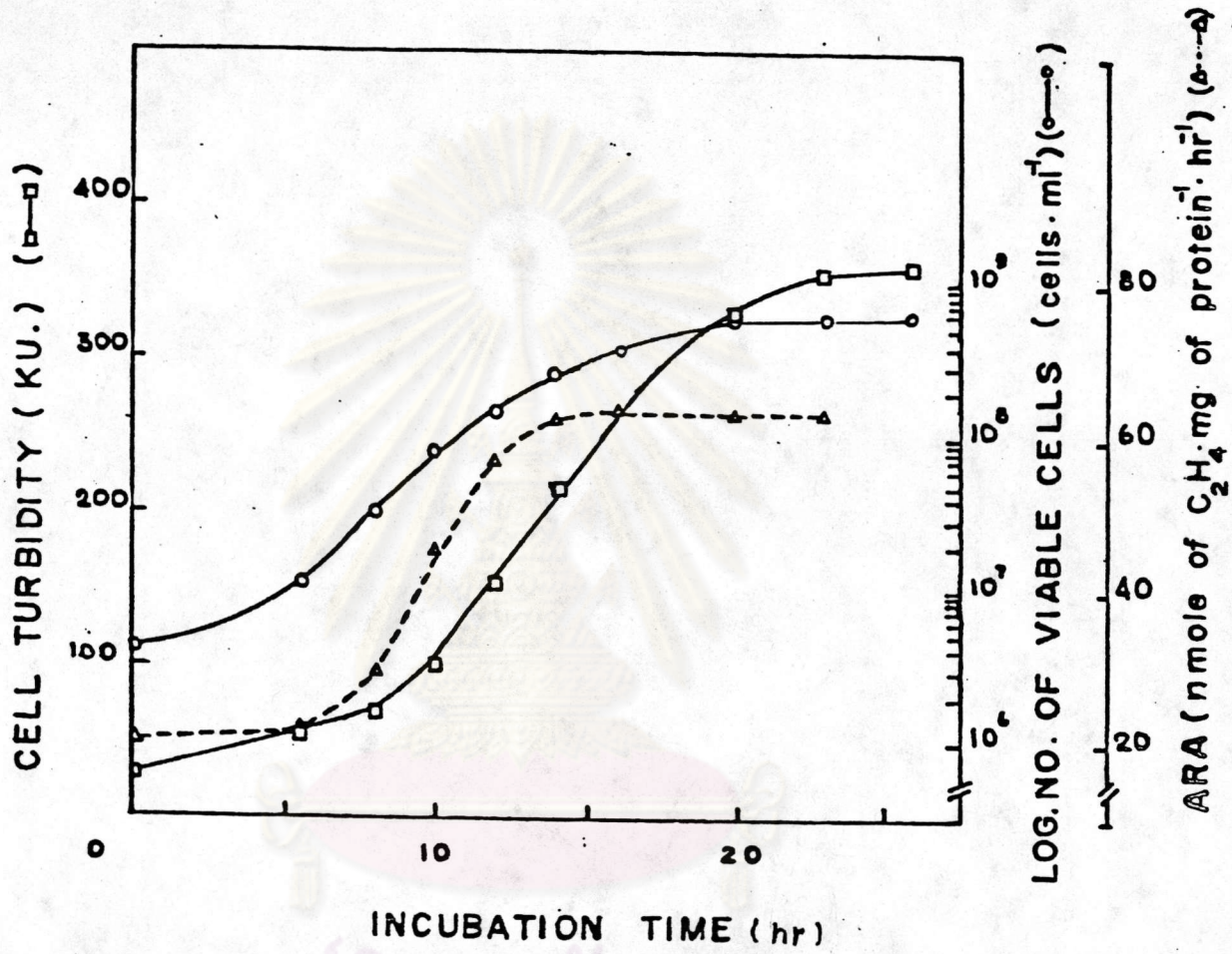
ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอไนโตรเจน TF23(pCK3) สามารถเจริญได้ความขุ่นสูงสุดเป็น 360 Klett unit มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 6×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีค่า ARA สูงสุด 63 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง (รูปที่ 17) และพบว่า Doubling time ของ TF23(pCK3) ในอาหารทั้งสองชนิดมีค่ามากกว่า WT เล็กน้อย (ตารางที่ 9)

3.4 การแยก Derepressed mutants ของ TF 23 (pCK3) โดยการกลายพันธุ์ด้วย NTG

เนื่องจากทรานส์ฟอร์มแมนท์ต้านคานามัยซินได้ต่ำมาก กอรปกับมีค่า ARA ในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจนเพียง 1% ของค่า ARA ของ WT ในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนจึงได้กลายพันธุ์ TF23(pCK3) ด้วย NTG เพื่อเลือกมิวแทนท์ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสสูงขึ้น โดยการเลือกมิวแทนท์ที่มีความสามารถในการต้านคานามัยซินสูงขึ้น ในงานวิจัยของ C. Kennedy และ M.H. Drummond ปี ค.ศ. 1985 ได้เคลื่อน pCK3 เข้าสู่ Azotobacter และพบว่าสามารถต้านคานามัยซินได้ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือก Derepressed mutants จากความสามารถในการต้านคานามัยซิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถต้านคานามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 16 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน-รีดัคชั่นของ TF23(pCK3) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และมี 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 17 รูปแบบของความยุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน รีดัคชั่นของ TF23(pCK3) ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน และมี 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญของ A. vinelandii WT และทรานสฟอร์แมนท์สายพันธุ์ TF23(pCK3) ในอาหารที่มีและไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน[1]

ชนิดของอาหารและชื่อสายพันธุ์	Doubling Time[2] (hr.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (cell.ml^{-1})	แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของอะเซทิลีนรีดักชั่น (μmole of C_2H_4. mg of protein.$^{-1}$ hr^{-1})
อาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน			
WT	3.30	2×10^8	6.7
TF23(pCK3)	3.40	1.5×10^8	6.5
อาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน			
WT	2.15	6×10^8	0.0
TF23(pCK3)	2.30	6×10^8	0.063

(1) เป็นผลสรุปจากรูปที่ 16 และ 17

(2) ค่าของ Doubling time คำนวณได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากมิวแทนท์ที่สามารถต้านคานามัยซิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนประมาณ 4,000 โคโลนี มีมิวแทนท์ที่ไม่สามารถต้านคานามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียง 19 โคโลนี และเมื่อผ่านไป 3 passages ก็พบว่าเหลือมิวแทนท์เพียงตัวเดียวที่ยังคงสมบัติต้านคานามัยซินอยู่ (การนำเชื้อจากที่เก็บในกลีเซอรอลมาสตรีคลงจานแม่ครั้งที่ 1 ถือเป็น passage ที่ 1 และ การนำเชื้อจากจานแม่มาสตรีคต่อบนจานเพาะเชื้อใหม่ถือเป็น passage ที่ 2 เช่นนี้เรื่อยไป) ให้ชื่อสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่นี้ว่า TF239(pCK3*) ข้อที่น่าสังเกตก็คือ TF239(pCK3*) ต้านคานามัยซิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ Ammonium acetate เป็นสารต้นตอไนโตรเจนจะเจริญได้ในอาหารอุดม (RM medium) ดังตารางที่10 ดังนั้นจึงนำ TF239(pCK3*) มาสกัดพลาสมิดและศึกษาสมบัติของพลาสมิด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 18 พลาสมิดที่แยกได้ให้ชื่อว่า pCK3* ซึ่งพบว่ามีขนาด 27 kb และจากการย่อยด้วย EcoRI และ SalI ไม่พบความแตกต่างจาก pCK3

3.5 การสร้างทรานสฟอร์แมนท์ใหม่

3.5.1 การทรานสฟอร์เมชั่น

เคลื่อนพลาสมิดพาหะ pCK3* เข้าสู่ Azotobacter WT ทั้งสองชนิดด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชั่น แยกทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานามัยซิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชั่นของ A. vinelandii และ A. chroococcum เท่ากับ 9.1×10^8 และ 3.2×10^7 เซลล์ต่อกรัมของพลาสมิด ตามลำดับ ได้เลือกทรานสฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii และ A. chroococcum คือ TF2(pCK3*) และ TFC2(pCK3*) ตามลำดับ เป็นสายพันธุ์ตัวอย่างเพื่อศึกษาต่อไป

3.5.2 เปรียบเทียบการเจริญระหว่าง WT และทรานสฟอร์แมนท์ในอาหารสูตรปรับต่ำ (MM.) และอาหารอุดม (RM.) medium

เนื่องจาก TF239(pCK3*) ไม่สามารถจะเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำได้ ดังนั้นเมื่อแยกพลาสมิด pCK3* ออกมาและทรานสฟอร์มใหม่แล้วจึงควรทดสอบรูปแบบของการเจริญระหว่าง Azotobacter spp. WT กับทรานสฟอร์แมนท์ตัวใหม่คือ TF2(pCK3*)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของ A. vinelandii WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ สายพันธุ์ TF23(pCK3) และมิวแทนท์สายพันธุ์ TF239(pCK3*) ในอาหารสูตรปรับต่ำ และอาหารอุดม

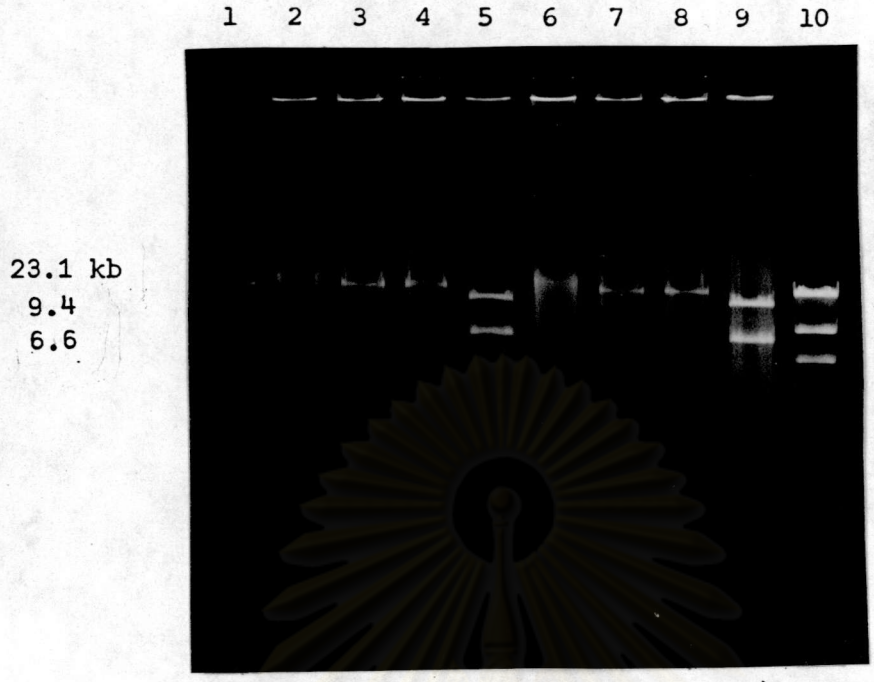
ชื่อสายพันธุ์	การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ(3)	การเจริญในอาหารอุดม(4)
A. vinelandii		
WT	เจริญ	เจริญ
TF23(pCK3)(1)	เจริญ	เจริญ
TF239(pCK3*)(2)	ไม่เจริญ	เจริญ

(1) TF23(pCK3) = ทรานส์ฟอร์แมนท์ ของ A. vinelandii ซึ่งได้จากการนำพลาสมิด pCK3 เข้าเซลล์

(2) TF239(pCK3*) = มิวแทนท์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ ของ TF23(pCK3) ด้วย NTG เพื่อเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อยาปฏิชีวนะคานามัยซิน จาก 50 $ng.ml^{-1}$ เป็น 1 $\mu g.ml^{-1}$ หรือเพิ่มขึ้นจากเดิม 20 เท่า

(3) คือ ความสามารถของสายพันธุ์ที่แบ่งตัวในอาหารเหลว (Minimum medium) มี 1 % กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน และมี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน เขย่าที่ 30°ซ. ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีนาน 2 วัน

(4) คือ ความสามารถของสายพันธุ์ที่แบ่งตัวในอาหารอุดม มี 1 % กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน มี 0.2 % Nutrient broth และ 0.01 % Yeast extract เขย่าที่ 30°ซ ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีนาน 2 วัน



รูปที่ 18 ผลของการย่อยพลาสมิดดีเอนเอ pCK3 และpCK3* ด้วยเอนไซม์ EcoRI และ SalI บน 0.6% Agarose gel electrophoresis

ช่องที่ 1, 10 คือ Standard λ-DNA ซึ่งย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ พลาสมิด ดีเอนเอ pCK3

ช่องที่ 3 คือ ชิ้นพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ซึ่งย่อยด้วย EcoRI ได้ชิ้นขนาด 27 kb

ช่องที่ 4 คือ ชิ้นพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ซึ่งย่อยด้วย SalI ได้ชิ้นขนาด 27 kb

ช่องที่ 5 คือ ชิ้นพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3 ซึ่งย่อยด้วย EcoRI และ SalI

ช่องที่ 6 คือ พลาสมิด ดีเอนเอ pCK3*

ช่องที่ 7 คือ ชิ้นพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3* ซึ่งย่อยด้วย EcoRI ได้ชิ้นขนาด 27 kb

ช่องที่ 8 คือ ชิ้นพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3* ซึ่งย่อยด้วย SalI ได้ชิ้นขนาด 27 kb

ช่องที่ 9 คือ ชิ้นพลาสมิด ดีเอนเอ pCK3* ซึ่งย่อยด้วย EcoRI และ SalI ได้ชิ้นขนาด 19 และ 8 kb

และ TFC2(pCK3*) ผลการทดลองพบว่ารูปแบบการเจริญของ WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ ใน MM. และ RM.. medium มีลักษณะคล้ายกัน แต่การเจริญสูงสุดของ WT ใน MM. และRM. medium มีค่าต่ำกว่าทรานส์ฟอร์แมนท์เล็กน้อย โดยที่ A. vinelandii และA. chroococcum WT มีการเจริญสูงสุดใน MM. เท่ากับ 355 และ 380 Klett unit ตามลำดับ ใน RM.. medium ก็มีการเจริญสูงสุดเป็น 220 และ 205 Klett unit ตามลำดับ สำหรับ TF2(pCK3*) และ TFC2(pCK3*) มีการเจริญสูงสุดใน MM. เท่ากับ 380 และ 390 Klett unit ตามลำดับ และใน RM. medium ก็มีการเจริญสูงสุดเป็น 265 และ 270 Klett unit ตามลำดับ ดังรูปที่ 19 และ 20 น่าสังเกตว่าค่า Doubling time ของทรานส์ฟอร์แมนท์มีค่าเท่า ๆ กับของ WT ทั้งใน MM. และ RM. medium (ตารางที่ 11)

3.5.3 รูปแบบการตรึงไนโตรเจนของทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3*

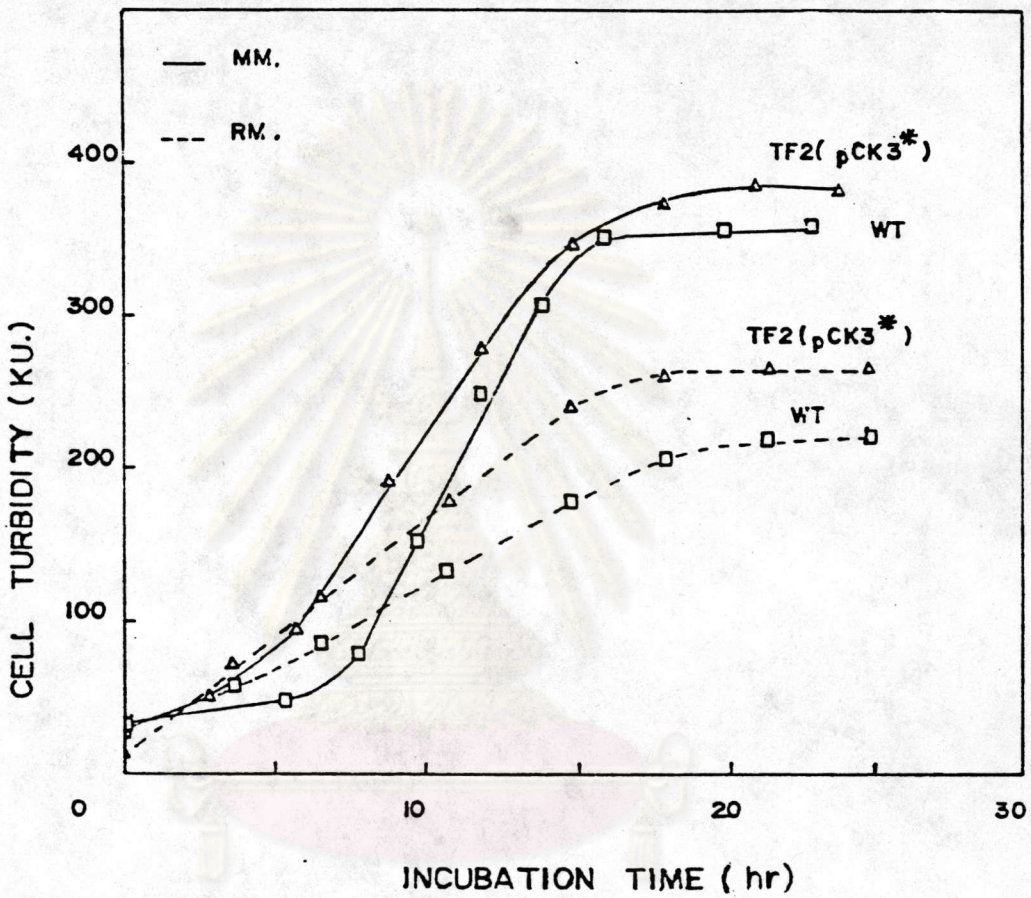
ก. ในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน

แบคทีเรียสายพันธุ์ TF2(pCK3*) สามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ความขุ่นสูงสุดเป็น 175 Klett unit มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่า ARA เพิ่มขึ้นตามความขุ่นของคัลเจอร์และมีค่าสูงสุดในช่วงการเจริญที่ระยะการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ 7.6 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง (รูปที่ 21) ในทำนองเดียวกัน TFC2(pCK3*) เจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ความขุ่นสูงสุดเป็น 168 Klett unit มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 2.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีค่า ARA สูงสุดเท่ากับ 7.0 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง (รูปที่ 22)

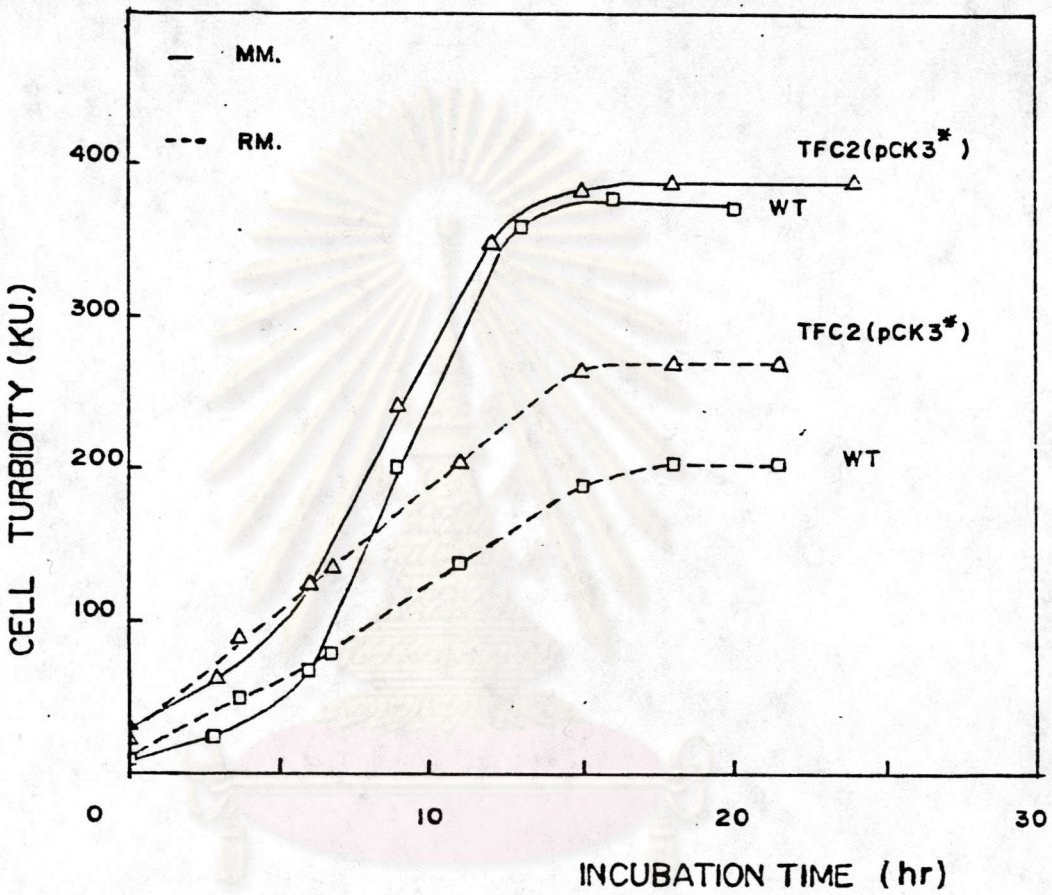
เป็นที่น่าสังเกตว่า ภายหลังจากที่ ARA ของทรานส์ฟอร์แมนท์ทั้งสองมีค่าสูงสุดแล้ว เมื่อความขุ่นของคัลเจอร์เพิ่มขึ้น ARA จะมีค่าค่อนข้างคงที่ ซึ่งแตกต่างจาก WT ที่มีค่า ARA ลดลงเมื่อผ่านระยะที่มีค่า ARA สูงสุดไปแล้ว

ข. ในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน

TF2(pCK3*) และ TFC2(pCK3*) เจริญในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 มิลลิโมลาร์ ได้ความขุ่นสูงสุดเป็น 382 และ 390 Klett unit ตามลำดับ มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 6×10^8 และ 6.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตาม



รูปที่ 19 รูปแบบของการเจริญของ A. vinelandii WT และทรานสฟอร์แมนท์ สายพันธุ์ TFC2(pCK3*) ในอาหารสูตรปรับต่ำ (MM.) และอาหารอุดม (RM.) เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 20 รูปแบบของการเจริญของ A. chroococcum WT และทรานส์ฟอร์แมนท์สายพันธุ์ TFC2(pCK3*) ในอาหารสูตรปรับต่ำ (MM.) และอาหารอุดม (RM.). เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

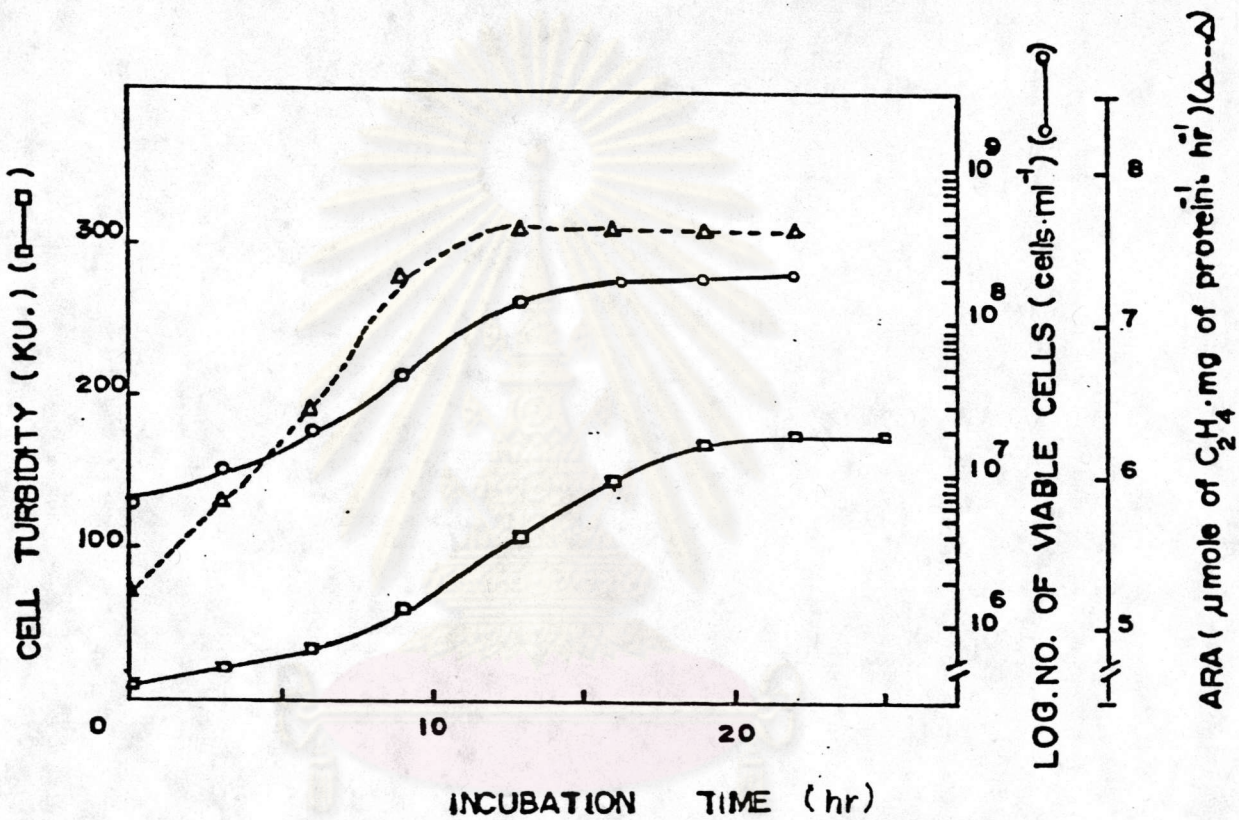
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการเจริญของ Azotobacter spp. ระหว่าง WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ในอาหารสูตรปรับต่ำและอาหารอุดม[1]

ชื่อสายพันธุ์	การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ		การเจริญในอาหารอุดม	
	Doubling Time (hr.)	การเจริญสูงสุด (KU.)	Doubling Time (hr.)	การเจริญสูงสุด (KU.)
A. vinelandii				
WT	2.30	355	8.00	220
TF2(pCK3*)[2]	2.45	380	7.30	265
A. chroococcum				
WT	2.15	380	7.30	205
TFC2(pCK3*)[3]	2.30	390	7.00	270

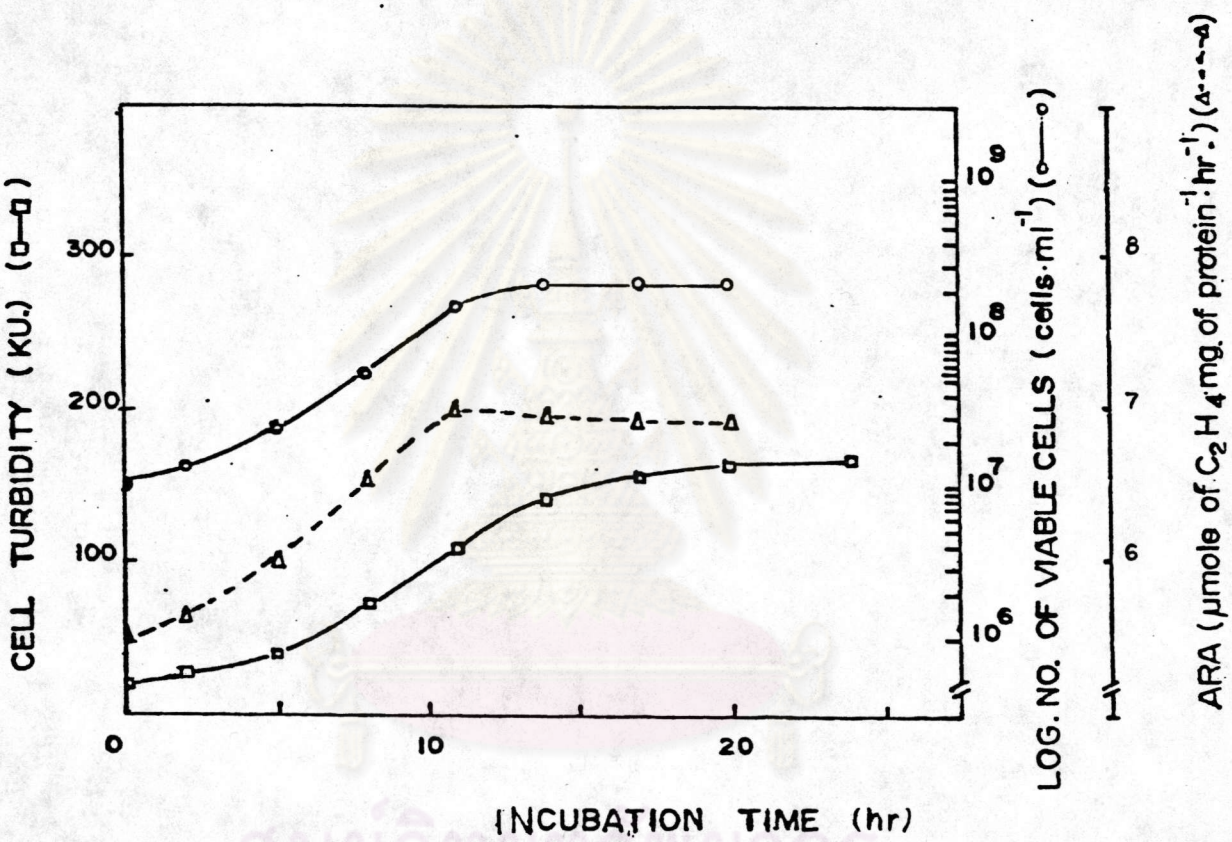
(1) ค่ามาจากรูปที่ 19 และ 20

(2) TF2(pCK3*) = ทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii ซึ่งได้จากการนำพลาสมิด pCK3* เข้าเซลล์

(3) TFC2(pCK3*) = ทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. chroococcum ซึ่งได้จากการนำพลาสมิด pCK3* เข้าเซลล์



รูปที่ 21 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีน รีดัคชั่นของ TF2(pCK3*) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และมี 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 22 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ TFC2(pCK3*) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และมี 1% กลูโคส เป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ลำดับ และมีค่า ARA สูงสุดเท่ากับ 0.84 และ 0.78 ไมโครโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัม-โปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 23, 24)

ทรานส์ฟอร์แมนท์ชุดใหม่ที่มีพลาสมิด pCK3* และสามารถต้านคานามัยซินเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ชุดเก่า 20 เท่า นั้น เมื่อเจริญในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจนจะมีค่า ARA สูงสุดมากกว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ชุดเก่าประมาณ 13 เท่า

Doubling time ของ TF2(pCK3*) และ TFC2(pCK3*) เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนจะมีค่ามากกว่า WT เล็กน้อย และมีค่าเท่ากับ WT เมื่อเจริญในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจน (ตารางที่ 12, 13)

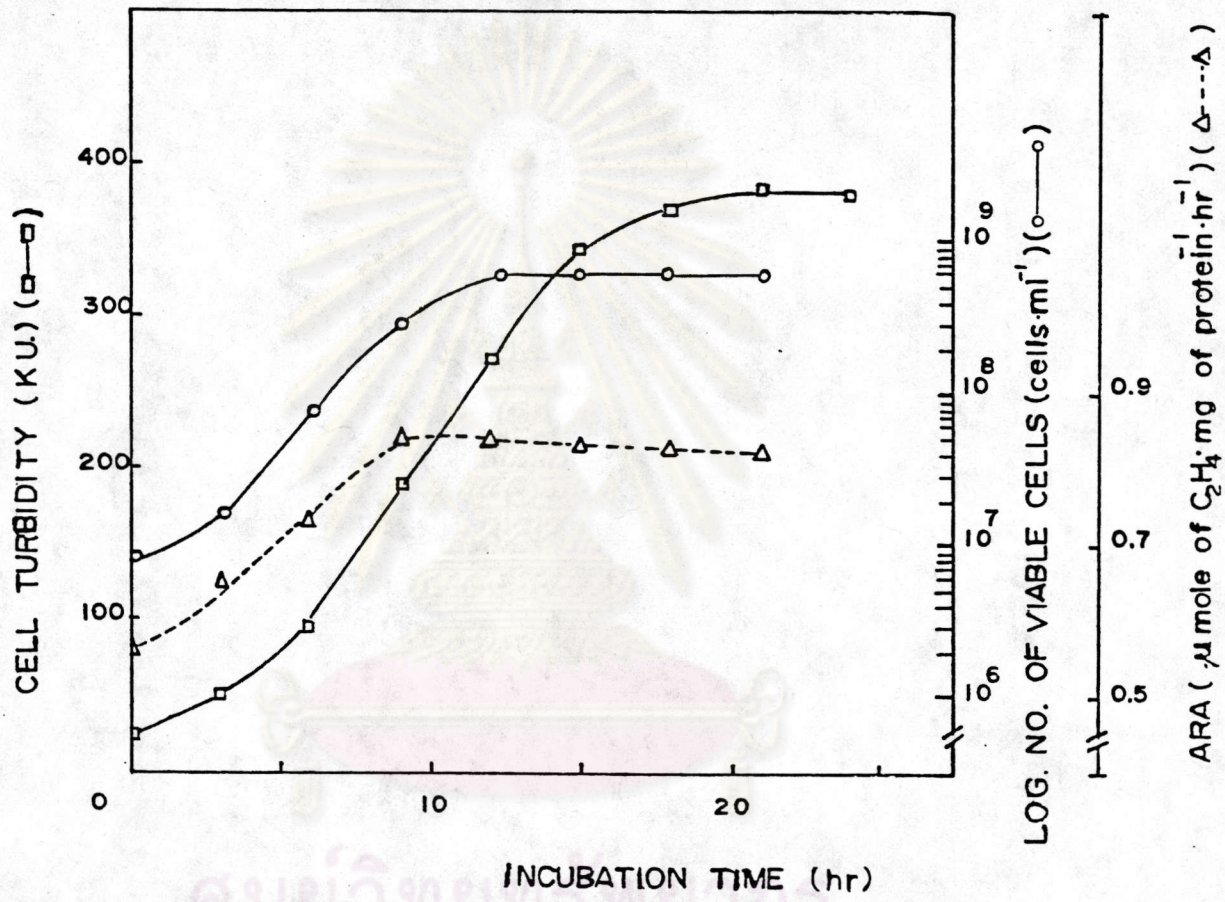
3.6 การยับยั้งแอคติวิตีของไนโตรจิเนส

ผลของอนุมูลอัมโมเนียมต่อการตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter มี 2 ระดับ คือ ผลระยะสั้น (short term effect) จะเกิดการยับยั้ง (inhibit) แอคติวิตีของเอนไซม์-ไนโตรจิเนส และผลระยะยาว (long term effect) จะเกิดการกดดันการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (Laane และคณะ, 1980) เมื่อมี Ammonium ความเข้มข้นต่ำ ๆ แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสจะถูกยับยั้งไว้ แต่เมื่อเซลล์ได้ใช้ Ammonium นั้นไปแอค-ติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสก็จะกลับคืนมาได้ (Cejudo และคณะ, 1984)

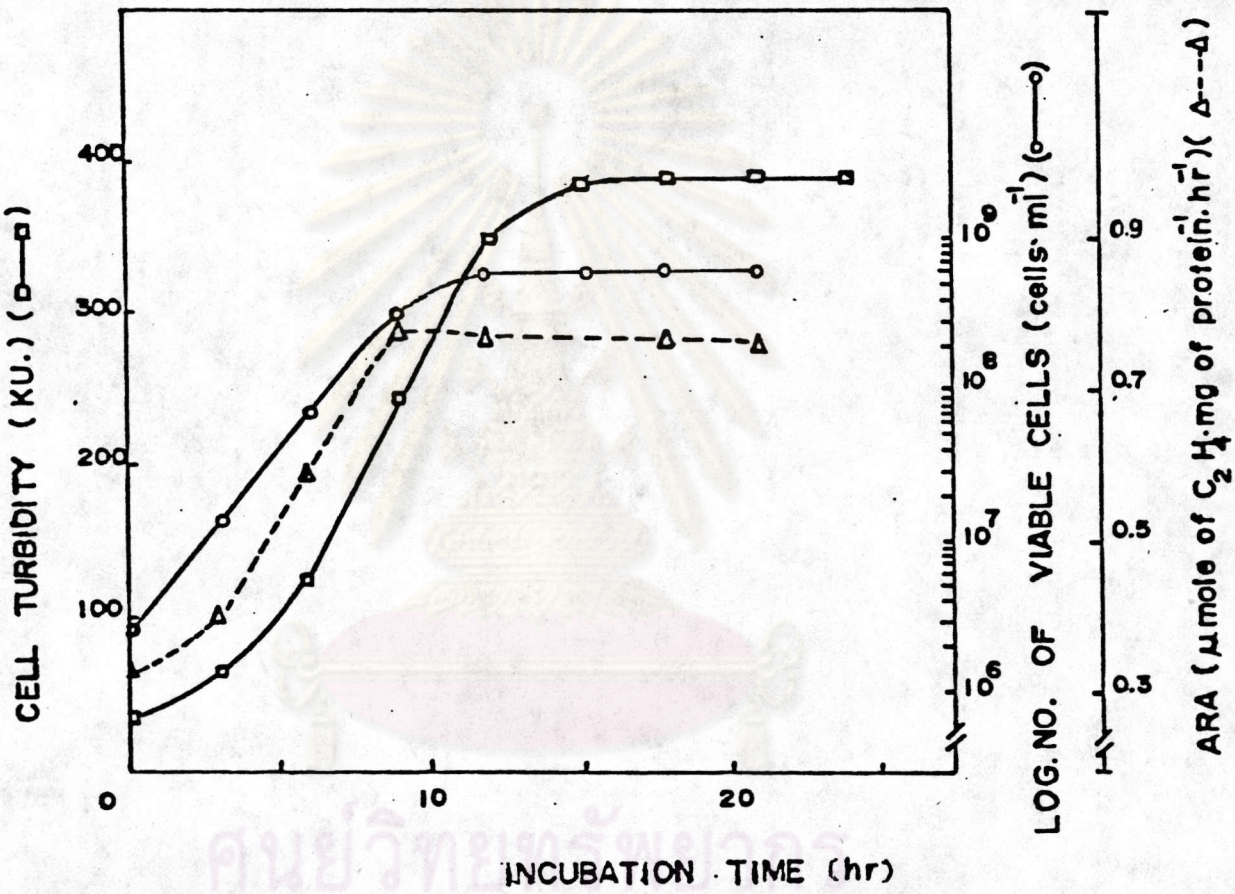
จึงได้ศึกษาการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ A. vinelandii WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ TF2(pCK3*) ด้วย Ammonium chloride ความเข้มข้น 0.00, 0.03, 0.05, 0.07, 0.125 และ 0.15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ดังนี้

3.6.1 ผลกระทบของ Ammonium chloride ต่อ WT

วัด ARA ของ A. vinelandii ที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตร-เจนจนกระทั่งความขุ่นของคัลเจอร์เป็น 100 Klett unit แล้วเติม Ammonium chloride ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่กำหนดไว้ นำค่า ARA ที่วัดได้มาคำนวณค่า 1/v แล้วทำ Dixon plot จะได้ค่า Ki ของ A. vinelandii WT เท่ากับ 0.0826 มิลลิโมลาร์ของ Ammonium chloride (รูปที่ 25)



รูปที่ 23 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่นของ TF2(pCK3*) ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน และ 1% กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 24 รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่นของ TFC2(pCK3*) ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นต่อไนโตรเจน และ 1% กลูโคส เป็นสารต้นต่อคาร์บอน เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการเจริญของ A. vinelandii WT และทรานส์ฟอร์แมนท์สายพันธุ์ TF23(pCK3) และ TF 2 (pCK3*) (1)

ชนิดของอาหารและชื่อสายพันธุ์	Doubling Time (2) (hr)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (cell·ml^{-1})	แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของอะเซทิลีนรีดักชั่น (μmole of C_2H_4. mg of protein^{-1}.hr^{-1})
อาหารที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน			
WT	3.30	2 x 10^8	6.7
TF23(pCK3) (3)	3.40	1.5 x 10^8	6.5
TF2 (pCK3*) (4)	3.40	2 x 10^8	7.6
อาหารที่มีสารประกอบไนโตรเจน			
WT	2.15	6 x 10^8	0.0
TF23(pCK3) (3)	2.30	6 x 10^8	0.063
TF2 (pCK3*) (4)	2.15	6 x 10^8	0.84

(1) เป็นผลสรุปจากรูปที่ 6, 8 , 16, 17, 21 และ 23

(2) ค่าของ Doubling time คำนวณได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

(3) TF23(pCK3) = ทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii ซึ่งได้จากการนำพลาสมิด pCK3 เข้าเซลล์

(4) TF2 (pCK3*) = ทรานส์ฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii ซึ่งได้จากการนำพลาสมิด pCK3* เข้าเซลล์

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของ A. chroococcum WT และทรานสฟอร์แมนท์สายพันธุ์ TFC2(pCK3*)(1)

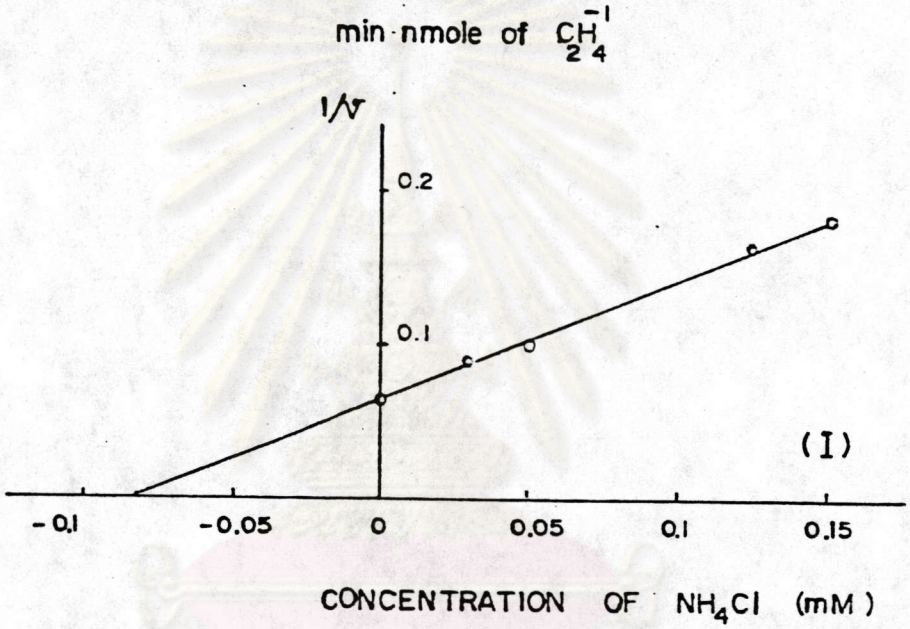
ชนิดของอาหารและชื่อสายพันธุ์	Doubling Time(2) (hr)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด ($cell \cdot ml^{-1}$)	แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของอะเซทิลีนรีดักชั่น ($\mu mole\ of\ C_2H_4 \cdot mg\ of\ protein^{-1} \cdot hr^{-1}$)
อาหารที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน			
WT	3.30	3×10^8	7.2
TFC2 (pCK3*) (3)	3.40	2.5×10^8	7.0
อาหารที่มีสารประกอบไนโตรเจน			
WT	2.00	7×10^8	0.0
TFC2 (pCK3*) (3)	2.00	6.5×10^8	0.78

(1) เป็นผลสรุปจากรูปที่ 7, 9, 22 และ 24

(2) ค่าของ Doubling time คำนวณได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

(3) TFC2 (pCK3*) = ทรานสฟอร์แมนท์ของ A. chroococcum ซึ่งได้จากการนำพลาสมิด pCK3* เข้าเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 Dixon plot ของ A. vinelandii WT ที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสารตันตอไนโตรเจน มี Ammonium chloride เป็นตัวยับยั้ง โดยที่ v = ปริมาณของเอทีลีน ที่ผลิตต่อเวลา มีหน่วยเป็น nmole of $C_2H_4.min^{-1}$

เขียนสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นได้ดังนี้

$$1/v = 0.0665 + 0.803\ (I)$$

มีค่า Ki = 0.08 mM of NH_4Cl

3.6.2 ผลกระทบของ Ammonium chloride ต่อทรานส์ฟอร์แมนท์

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับข้อ 3.6.1 จะได้ค่า Ki ของ TF 2 (pCK3*) เท่ากับ 0.1797 มิลลิโมลาร์ของ Ammonium chloride (รูปที่ 26) ซึ่งมีค่าประมาณ 2 เท่าของ WT

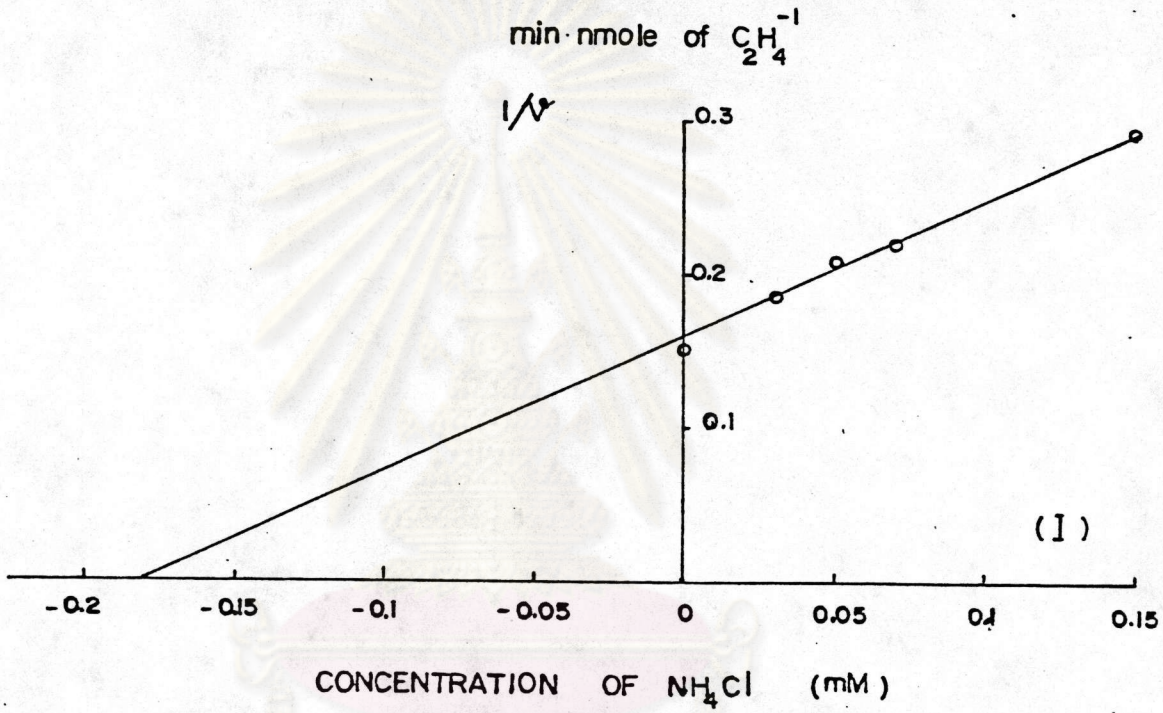
ใช้ทรานส์ฟอร์แมนท์ที่เจริญในอาหารที่มี Glutamate เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

3.7 ผลกระทบของ Azotobacter ต่ออ้อย

เมื่อแยกได้ทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิดpCK3 และพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่การถอดรหัสของไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดันแล้ว จึงได้เลือกเอา TF23(pCK3). มาศึกษาผลกระทบต่อพืช และเนื่องจาก Azotobacter ที่นำมาทำการวิจัยนี้ได้ถูกแยกจากรากอ้อยในการวิจัยนี้จึงศึกษาผลกระทบของ A. vinelandii WT และ TF23(pCK3) ต่ออ้อย โดยใช้อ้อยพันธุ์ F140 ที่มีอายุประมาณ 7 เดือนเป็นท่อนพันธุ์ ทำการทดลองตามที่ระบุไว้ในข้อ 2.15 ปลูกในสารอาหารที่ไม่มี และมี Ammonium sulfate 0.4 และ 1.2 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างเมื่ออ้อยมีอายุ 2 เดือน

จากคอลัมน์ที่ 1 ตารางที่ 14 พบว่าน้ำหนักแห้งของลำต้นและใบอ้อยจากต้นอ้อยที่ปลูกโดยมี Azotobacter ทั้ง 2 สายพันธุ์คือ WT และ TF23(pCK3) มีค่าสูงกว่าที่ปลูกโดยไม่มี Azotobacter อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มอ้อยที่ปลูกโดยมี Azotobacter สายพันธุ์ WT ไม่ให้ผลกระทบที่แตกต่างจากสายพันธุ์ TF23(pCK3) แต่อย่างใด ตรงกันข้ามเมื่อปลูกอ้อยในสารอาหารที่เสริม Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์จะพบว่าอ้อยที่ปลูกโดยมี WT หรือไม่มี Azotobacter อยู่เลยก็ได้น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบอ้อยเท่า ๆ กัน แต่ถ้ามีสายพันธุ์ TF23(pCK3) แล้วจะให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญคือเพิ่มสูงกว่าอ้อยที่มิได้ปลูกร่วมกับทรานส์ฟอร์แมนท์ถึงเท่าตัว ผลกระทบดังกล่าวนี้จะไม่เด่นชัดนักถ้าปลูกอ้อยในสารอาหารที่เสริม Ammonium sulfate 0.4 มิลลิโมลาร์

ความสูงของอ้อยที่ได้จากการปลูกโดยมี Azotobacter สูงกว่าไม่มีเล็กน้อย แต่ก็ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ(คอลัมน์ที่ 2 ตารางที่ 14) สำหรับข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับค่า ARA (คอลัมน์ที่ 3 ตารางที่ 14) ได้ให้ผลสอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้



รูปที่ 26 Dixon plot ของ TF2(pCK3*) ที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสารตั้นตอไนโตรเจน มี Ammonium chloride เป็นตัวยับยั้ง โดยที่ v = ปริมาณของเอทีลีนที่ผลิตต่อเวลา มีหน่วยเป็น nmole of C_2H_4. min^{-1}

เขียนสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นได้ดังนี้

$$1/v = 0.1603 + 0.8919\ (I)$$

เมื่อ Ki = 0.18 mM of NH_4Cl

ตารางที่ 14 ผลกระทบของ Azotobacter WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3 ต่อน้ำหนักแห้ง ความสูง และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่น ของอ้อยจากการทดลองครั้งที่ 1

Treatment	น้ำหนักแห้งของต้นและใบอ้อย (g)	ความสูงของต้นอ้อย (cm)	ARA (nmole C_2H_4.g root dry weight^{-1}. hr^{-1})
N_0A_0	(e) 1.2076 ± 0.5483	(d) 9.4 ± 1.8	0 ± 0.00
$N_{0.4}A_0$	(cd) 3.1675 ± 0.5224	(c) 14.4 ± 0.3	0 ± 0.00
$N_{1.2}A_0$	(bcd) 4.1847 ± 0.5977	(ab) 18.2 ± 3.6	0 ± 0.00
N_0A_{WT}	(d) 2.4724 ± 0.4995	(c) 13.8 ± 1.3	(b) 17 ± 1.5
$N_{0.4}A_{WT}$	(bcd) 3.6483 ± 0.7214	(bc) 15.6 ± 1.5	(c) 7 ± 1.4
$N_{1.2}A_{WT}$	(b) 5.4116 ± 1.8188	(a) 20.9 ± 1.1	(d) 3 ± 0.5
$N_0A_{TF23(pCK3)}$	(d) 2.5412 ± 0.6736	(c) 12.6 ± 1.4	(a) 22 ± 4.0
$N_{0.4}A_{TF23(pCK3)}$	(bc) 4.7456 ± 0.8536	(bc) 15.4 ± 2.2	(b) 14 ± 2.1
$N_{1.2}A_{TF23(pCK3)}$	(a) 8.3004 ± 1.8763	(a) 19.5 ± 3.0	(c) 7 ± 1.4

ตัวอักษร a, ... , e แสดงถึงกลุ่มที่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กล่าวคือ ถ้าปลูกอ้อยโดยไม่มี Azotobacter ก็จะไม่พบ ARA จากรากอ้อยนั้น แต่ถ้ามี Azotobacter อยู่ด้วยจะให้ค่าARA ตรงตามที่ควรจะเป็น น่าสังเกตว่าแม้จากอ้อยที่ปลูกในสารอาหารที่ปราศจาก Ammonium sulfate สายพันธุ์ TF23(pCK3). ก็ให้ผลกระทบต่อค่า ARA จากรากอ้อยสูงกว่าของ WT และถ้าเป็นอ้อยที่ปลูกในสารอาหารที่มี Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์ ผลกระทบจะยิ่งสูงเด่นถึง 2 เท่าตัว

ในภายหลังเมื่อได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3* ซึ่งมีสมบัติปลดปล่อยการถอดรหัสไนโตรจิเนสได้ดีกว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3 คือ TF2(pCK3*) จึงได้นำมาศึกษาผลกระทบต่ออ้อย โดยใช้อ้อยพันธุ์เดิมคือ F140 ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับครั้งแรกและเนื่องจากผลกระทบเมื่อปลูกอ้อยในสารอาหารที่มี Ammonium sulfate 0.4 มิลลิโมลาร์นั้นไม่เด่นชัด ในครั้งนี้จึงปลูกในสารอาหารที่ไม่มี และมี Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์เท่านั้น เก็บตัวอย่างเมื่ออ้อยอายุ $1\frac{1}{2}$ เดือนจากคอลัมน์ที่ 1 ตารางที่ 15 พบว่าน้ำหนักแห้งของลำต้นและใบอ้อยจากต้นอ้อยที่ปลูกโดยมี Azotobacter จะมีค่าสูงกว่าที่ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในครั้งนี้อ้อยที่ปลูกโดยมี Azotobacter สายพันธุ์ TF2(pCK3*) มีน้ำหนักแห้งของลำต้นและใบสูงกว่าที่มีสายพันธุ์ WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลกระทบเมื่อปลูกอ้อยในสารอาหารที่เสริม Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์ก็มีลักษณะเดียวกัน เพียงแต่ว่าผลกระทบของ TF2(pCK3*) ที่มากกว่า WT นี้สูงเด่นกว่าเมื่อปลูกอ้อยในสารอาหารที่ไม่มี Ammonium sulfate

ความสูงของอ้อยที่ปลูกโดยมี Azotobacter ในสารอาหารที่มีและไม่มี Ammonium sulfate มีค่าสูงกว่าที่ไม่มี Azotobacter อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(คอลัมน์ที่ 2 ตารางที่ 15) และในอาหารที่เสริม Ammonium sulfate ผลกระทบของสายพันธุ์TF2(pCK3*) จะแตกต่างจากสายพันธุ์ WT โดยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ในครั้งนี้ก็ยังคงเป็นไปตามที่คาดหมายไว้คือ ไม่พบ ARA จากรากอ้อยที่ปลูกโดยไม่มี Azotobacter เลย (คอลัมน์ที่ 3 ตารางที่ 15) และเมื่อมี Azotobacter อยู่ด้วยก็จะให้ค่า ARA ตามที่ควรจะเป็น พบว่าแม้จากอ้อยที่ปลูกในสารอาหารที่ปราศจาก Ammonium sulfate สายพันธุ์TF2(pCK3*) ก็ให้ผลกระทบต่ออ้อยสูงกว่า WT ในทำนองเดียวกับ TF23(pCK3) และถ้าเป็นอ้อยที่ปลูกในสารอาหารที่เสริม Ammonium sulfate 1.2 มิลลิโมลาร์ ผลกระทบจะยิ่งเด่นชัดโดยสูงกว่าผลของ WT ถึง 11 เท่าตัว

ตารางที่ 15 ผลกระทบของ Azotobacter WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3* ต่อน้ำหนักแห้ง ความสูง และแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของอ้อย จากการทดลองครั้งที่ 2

Treatment	น้ำหนักแห้งของต้นและใบอ้อย (g)	ความสูงของอ้อย (cm)	ARA (nmole C_2H_4. g root dry weight^{-1}. hr^{-1})
N_0A_0	(f) 0.9865 ± 0.0546	(e) 9.5 ± 0.4	0 ± 0.00
$N_{1.2}A_0$	(c) 2.5316 ± 0.1812	(c) 13.9 ± 0.3	0 ± 0.00
N_0A_{WT}	(e) 1.5396 ± 0.1174	(d) 11.4 ± 0.3	(b) 24 ± 1.2
$N_{1.2}A_{WT}$	(b) 3.4473 ± 0.0945	(b) 15.0 ± 0.4	(d) 2 ± 0.2
$N_0A_{TF2(pCK3^*)}$	(d) 1.7902 ± 0.1460	(d) 12.1 ± 0.4	(a) 29 ± 0.8
$N_{1.2}A_{TF2(pCK3^*)}$	(a) 8.1614 ± 0.1395	(a) 16.9 ± 0.3	(c) 22 ± 1.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย