

ผลของการปนเปื้อนทองแดงและสังกะสีต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงและ
การสะสมกลูตาไธโอนของสาหร่ายพวงพะโต (*Ceratophyllum demersum*)

พรไพลิน เลื่องลือธรรม^{1*} และ พิมพชนก บัวเพชร^{1,2}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

²สถานวิจัยสมุทรศาสตร์ชายฝั่งและการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

*pimchanok.b@psu.ac.th

บทคัดย่อ

สารประกอบทองแดงและสังกะสีถูกนำมาใช้ในกิจกรรมของมนุษย์อย่างกว้างขวางนำไปสู่การปนเปื้อนในแหล่งน้ำใกล้เคียงได้โดยง่าย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน้ำจืดตลอดทั้งห่วงโซ่อาหารรวมถึงพืชน้ำซึ่งเป็นผู้ผลิตขั้นต้นที่สำคัญของระบบ แม้ว่าทองแดงและสังกะสีจะเป็นธาตุอาหารรองของพืชแต่หากมีปริมาณปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อกลไกทางสรีรวิทยาของพืชได้ เช่น ส่งผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระส่งผลให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดผลของทองแดงและสังกะสีต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงและปริมาณกลูตาไธโอนในสาหร่ายพวงพะโต (*Ceratophyllum demersum*) เป็นเวลา 3 วัน โดยให้ทองแดงความเข้มข้น 2 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย 1/10 Hoagland solution และสังกะสีความเข้มข้น 200 500 และ 1000 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย 1/10 Hoagland solution โดยมีตัวอย่างชุดควบคุมอยู่ในสารละลาย 1/10 Hoagland solution พบการลดลงของประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Fv/Fm) ในชุดการทดลองที่ให้ทองแดง 10 ไมโครโมลาร์ และสังกะสี 1000 ไมโครโมลาร์ บ่งบอกถึงความเสียหายของระบบแสง และผลการศึกษายังแสดงว่าทองแดงมีความรุนแรงมากกว่าสังกะสี พบความแตกต่างของปริมาณกลูตาไธโอนระหว่างชุดการทดลองและระหว่างวันที่เก็บตัวอย่าง โดยในวันที่ 1 ปริมาณกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้ทองแดงไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมแต่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้สังกะสี ส่วนในวันที่ 3 พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้ทองแดง 2 ไมโครโมลาร์ และสังกะสี 1000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และโดยภาพรวมชุดการทดลองที่ให้โลหะหนักมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูตาไธโอนในวันที่ 3 เทียบกับวันที่ 1 ซึ่งให้เห็นถึงบทบาท ของกลูตาไธโอนในสภาวะเครียดจากพิษโลหะหนักทองแดงและสังกะสีในสาหร่ายพวงพะโต อาจเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยตรงหรือเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ไฟโตเคเลติน (Phytochelatins; PCs) ซึ่งทำหน้าที่ลดความเป็นพิษของโลหะหนักโดยจับกับไอออนโลหะหนักอิสระสร้างเป็นสารประกอบและนำเข้าสู่แวคิวโอลต่อไป

คำสำคัญ: *Ceratophyllum demersum* Copper Zinc Photosynthesis Glutathione Phytotoxicity

บทนำ

โลหะหนักปนเปื้อนได้ทั้งในดินและแหล่งน้ำ เนื่องจากโลหะหนักสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติผ่านการสลายตัวตามธรรมชาติของแผ่นเปลือกโลกหรือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การทำเหมืองแร่ อุตสาหกรรมพลาสติก ไมโครอิเล็กทรอนิกส์ การรักษาคุณภาพไม้ และการเกษตรที่ใช้ยากำจัดแมลง วัชพืช หรือควบคุมเชื้อราโดยมีโลหะหนักเป็นส่วนประกอบ (Marqués, 2001; Tchouwou, 2012; Sidhu, 2016)

โลหะหนักเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้พืชเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา แม้ว่าโลหะหนักบางชนิด เช่น ทองแดงและสังกะสีจะเป็นธาตุอาหารรองของพืช โดยทองแดง (Cu) เป็นส่วนประกอบของโปรตีนพลาสโทไซยานิน เป็นส่วนประกอบของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในคลอโรพลาสต์และการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์

ไซโตโครมซีและไซโตโครมซีออกซิเดส (Yruela, 2005) ส่วนสังกะสี (Zn) ก็เป็นธาตุองค์ประกอบสำคัญของโครงสร้างโปรตีนและเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และคาร์บอนิกแอนไฮเดรส อีกทั้งมีบทบาทในการสังเคราะห์ทรูปโตเฟนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนออกซิน (Tsonev & Lindon, 2012) อย่างไรก็ตามทองแดงและสังกะสีที่มากเกินไปจะเป็นพิษต่อระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่สอง (photosystem II; PSII) โดยทองแดงไปยับยั้งทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอนของ PSII ผ่านยับยั้งการออกซิเดชันของไทโรซีนซี (Tyrosine Z; TyrZ) ของโปรตีน D1 และไปจับบริเวณ Q_B และ Pheo-Fe- Q_A ของ PSII (Yruela, 2005) และทำลายโปรตีนจำเพาะของ oxygen evolving complex (Pätsikkä, 2001) ในส่วนสังกะสีสามารถยับยั้งการออกซิไดซ์น้ำและการสร้างออกซิเจนโดยแทนที่แมงกานีส (Mn) ในโครงสร้างของ oxygen evolving complex อีกทั้งเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Q_B ส่งผลให้ Q_A อยู่ในสภาวะรีดิวซ์ (Mohanty, 1989) นอกจากนี้ยังลดการทำงานของวัฏจักรคัลวินเนื่องจากทองแดงไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) และ 3-phosphoglyceric acid kinase (PGK) ในวัฏจักรคัลวิน (Burzyski & Zurek, 2007) หรือสังกะสีเข้าไปแทนที่แมกนีเซียม (Mg) ในโครงสร้างของ Rubisco ส่งผลให้พืชลดการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และการสังเคราะห์ด้วยแสง ตามลำดับ (Van Assche & Clijsters, 1986) ทองแดงและสังกะสียังมีผลต่อปริมาณหรือโครงสร้างคลอโรฟิลล์โดยแทนที่แมกนีเซียมกลางโครงสร้างของโมเลกุลคลอโรฟิลล์ (Cuchiara, 2015; Sidhu, 2016; Thomas, 2016) และทองแดงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้าง porphyrin (Fernandes & Henriques, 1991) สาเหตุเหล่านี้ส่งผลให้พืชเกิดอาการใบเหลืองซีด (chlorosis) และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการหยุดชะงักของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง

เนื่องจากทองแดงจัดอยู่ในกลุ่มไวต่อปฏิกิริยารีดอกซ์จึงก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals ($\cdot OH$) ผ่านปฏิกิริยาเฟนตอนและปฏิกิริยาฮาเบอร์-ไวส์ ได้โดยตรง ในขณะที่สังกะสีเป็นธาตุที่มีประจุเพียง 1 สถานะจึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มไมไวต่อปฏิกิริยารีดอกซ์จึงสามารถก่อให้เกิด ROS ทางอ้อมผ่านการรบกวนกระบวนการต่าง ๆ เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไปจับหมู่ซัลไฟไฮดริลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (De Filippis & Ziegler, 1993; Shahid, 2014) โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดความเสียหายของไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ (Gill & Tuteja, 2010) เพื่อรับมือกับความเสียหายที่เกิดจาก ROS พืชจึงมีการพัฒนาระบบป้องกัน ROS (ROS defense system; RDS) ที่ประกอบด้วย สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น กลูตาไธโอน กรดแอสคอร์บิก และโทโคฟีรอล เป็นต้น และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เพอรอกซิเดส คีตาเลส หรือแอสคอเบสเพอรอกซิเดส เป็นต้น กลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีหลายบทบาทในการป้องกันความเครียดจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมในพืช โดยสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยตรงและเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ไฟโตคีเลติน (Phytochelatin; PCs) ซึ่งทำหน้าที่ลดความเป็นพิษของโลหะหนักโดยจับกับไอออนโลหะหนักอิสระ (Sequestration) สร้างเป็นสารประกอบและนำเข้าสู่แวคิวโอลต่อไป (Gonzalez-Mendoza, 2007)

หากเซลล์พืชไม่สามารถควบคุมระดับโลหะหนักในเซลล์และความเป็นพิษของโลหะหนักให้อยู่ในสมดุลได้ จะทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายและตายในที่สุด ดังนั้นการติดตามประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงและตรวจวัดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจึงช่วยตรวจวัดระดับความรุนแรงขั้นแรกที่เกิดขึ้นในระดับสรีรวิทยา ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสาหร่ายพวงพะโตที่เป็นพืชน้ำที่ไม่มีราก เจริญเติบโตได้น้ำและมีเขตการกระจายพันธุ์สูง (Cook, 1995) เหมาะสมต่อการเป็นต้นแบบในการบ่งชี้ความเป็นพิษของทองแดงและสังกะสีในแหล่งน้ำจืดได้ในหลายพื้นที่และสามารถเฝ้าระวังปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในแหล่งน้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง พิกัด $7^{\circ}46'48.82''N$ $100^{\circ}7'41.48''E$ ลักษณะพื้นที่เป็นแหล่งน้ำนิ่งขุ่นเล็กน้อยและมีสาหร่ายพวงพะโตกระจุกตัวกันเป็นกลุ่มอย่างหนาแน่นใต้ผิวน้ำ จากนั้นปรับสภาวะตัวอย่างด้วยสารละลาย Hoagland's solution ภายในโรงเรือนเพาะชำแบบเปิดเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และปรับสภาวะตัวอย่างภายใต้แสงไฟจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 40 ± 5 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยควบคุมระยะเวลาสว่าง 12 ชั่วโมง และมีมืด 12 ชั่วโมง

ข้าวโม่ เป็นระยะเวลา 3 วัน ก่อนนำมาทดลองในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างสาหร่ายพวงพะโต 2 กรัม ต่อสารละลาย Hoagland's solution 200 มิลลิลิตร ที่ให้ทองแดงความเข้มข้น 2.5 และ 10 ไมโครโมลาร์จากสารละลาย CuSO_4 และสังกะสีความเข้มข้น 200 500 และ 1000 ไมโครโมลาร์ จากสารละลาย ZnSO_4 โดยมีตัวอย่างชุดควบคุมอยู่ในสารละลาย Hoagland's solution

ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดของระบบแสงที่ 2 (Maximum quantum yield of photosystem II, Fv/Fm)

วัดกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้คลอโรฟิลล์ฟลูออโรมิเตอร์ (Pulse Amplitude Modulated Fluorometer, Mini-PAM) ในวันเริ่มการทดลองก่อนให้สารละลายที่มีทองแดงและสังกะสี จากนั้นตรวจวัดต่อเนื่องทุกวันเป็นเวลา 3 วัน โดยวัดในตำแหน่งเดียวกัน และเวลาเดียวกันทุกวัน ค่าที่ทำการวัดคือประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Fv/Fm) ซึ่งหากมีการลดลงของค่านี้แสดงให้เห็นว่าเกิดความเสียหายของระบบแสงที่สอง (Photodamage) คำนวณค่า Fv/Fm จากสูตร $(F_m - F_0)/F_m$ โดย F_0 เป็นค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ต่ำสุด และ F_m เป็นค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สูงสุดหลังจากได้รับแสงที่ความเข้มแสงอิ่มตัว (Saturating pulse) เป็นระยะเวลา 0.8 วินาที โดยพืชต้องปรับตัวในที่มืดเป็นระยะเวลา 15 นาที (Dark adaptation) ก่อนวัดค่า Fv/Fm

ปริมาณกลูตาไธโอนรวมในเนื้อเยื่อพืช

วัดปริมาณกลูตาไธโอนรวม (GSH) ในเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ชุดทดสอบ (Glutathione Assay Kit, Sigma) ตามระเบียบวิธีการที่ระบุในเอกสารการใช้งาน โดยบดตัวอย่างสาหร่ายพวงพะโตในไนโตรเจนเหลวและผสมกับ 5% 5-Sulfosalicylic Acid จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10000 $\times g$ ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใส วัดปริมาณ GSH โดยอาศัยหลักการที่ว่า GSH ทำให้เกิดการรีดักชันของ 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ได้เป็น 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) และ GSSG จากนั้น GSSG ที่เกิดขึ้นจะถูกสร้างกลับไปเป็น GSH โดยเอนไซม์ glutathione reductase และ NADPH ตามสมการด้านล่าง



อัตราการเกิดปฏิกิริยาลำดับกับความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในตัวอย่าง วัดอัตราการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (TNB) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (Biotek PowerWaveX, USA)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

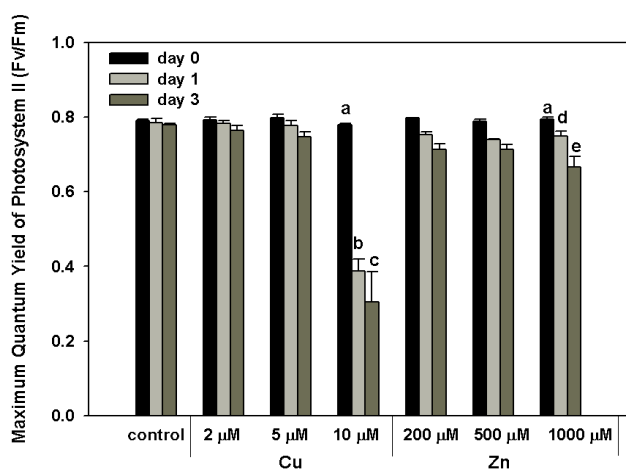
วิเคราะห์ผลของการปนเปื้อนโลหะหนักและระยะเวลา (วัน) ต่อกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงด้วย Repeated Measures ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณ (Multiple comparison test) ด้วยวิธี Fisher's Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistica academic

วิเคราะห์ผลของการปนเปื้อนโลหะหนักและระยะเวลา (วัน) ต่อปริมาณปริมาณกลูตาไธโอน ด้วย TWO-way ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณ (Multiple comparison test) ด้วย Fisher's Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistica academic

ผลและอภิปรายผล

เมื่อวัดประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Fv/Fm) ในแต่ละความเข้มข้นของทองแดงและสังกะสีพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง วันที่ทำการวัดค่า และปฏิสัมพันธ์ระหว่างชุดการทดลองและวันที่วัดค่า Fv/Fm ($p < 0.05$, รูปที่ 2, ตารางที่ 1) สาหร่ายพวงพะโตในชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลง Fv/Fm ตลอดการทดลอง (รูปที่ 1) แสดงให้

เห็นว่าระเบียบวิธีการทดลองไม่ส่งผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายฟุ้งชะโด ในชุดการทดลองที่ให้ทองแดง Fv/Fm ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยมีการยับยั้งถึง 60% ในชุดการทดลองที่ให้สังกะสีพบการลดลงของ Fv/Fm เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ โดยมีการยับยั้งประมาณ 15% การลดลงของ Fv/Fm บ่งบอกถึงความเสียหายของระบบแสงซึ่งอาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่สอง (PSII) โดยตรงโดยรบกวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และทำลายหรือยับยั้งโปรตีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ด้วยแสง (Mohanty, 1989; Pätsikkä, 2001; Yruela, 2005; Burzynski, 2007) นอกจากนี้ผลการศึกษายังแสดงว่าทองแดงมีความรุนแรงมากกว่าสังกะสีเนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสังกะสีถึง 10 เท่า ทองแดงกลับส่งผลยับยั้ง Fv/Fm มากถึง 60% มีรายงานการศึกษา ก่อนหน้าว่าพิษของทองแดงมีความรุนแรงมากกว่าสังกะสีในพืชหลายชนิดอาจเป็นผลจากไอออนของทองแดงมีคุณสมบัติไวต่อปฏิกิริยารีดอกซ์ทำให้สร้างอนุมูลอิสระได้โดยตรงผ่านปฏิกิริยา Fenton หรือ Harber-Weiss (Küpper & Andresen, 2016; Nanda & Agrawal, 2016)



Treatment	Maximum Quantum Yield of Photosystem II (Fv/Fm)		
	Day 0	Day 1	Day 3
control	0.79 ± 0.00	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.00
2 µMCu	0.79± 0.01	0.78± 0.01	0.77 ± 0.01
5 µMCu	0.80 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.75 ± 0.01
10 µMCu	0.78 ± 0.00 ^a	0.39 ± 0.03 ^b	0.30 ± 0.08 ^c
200 µMZn	0.80 ± 0.00	0.75 ± 0.01	0.71 ± 0.01
500 µMZn	0.79 ± 0.01	0.74 ± 0.00	0.71 ± 0.01
1000 µMZn	0.80 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.01 ^b	0.67 ± 0.03 ^c

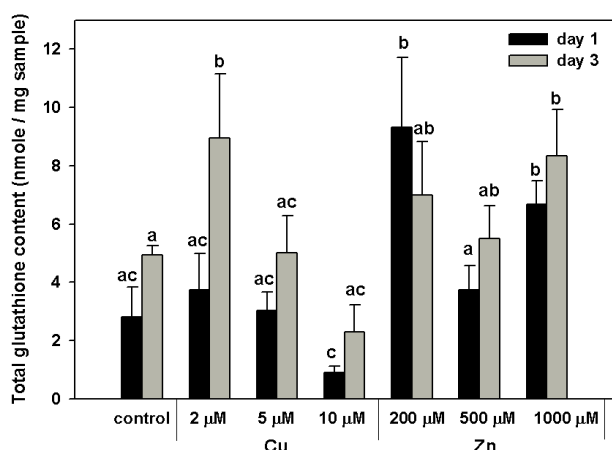
รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Maximum quantum yield of photosystem II; Fv/Fm) ในสาหร่ายฟุ้งชะโดที่ได้รับทองแดงและสังกะสีความเข้มข้นต่าง ๆ (n=5, ค่าเฉลี่ย ± SE) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลองที่ระดับนัยสำคัญ p<0.05 (แสดงเฉพาะชุดการทดลองที่มีการลดลงของ Fv/Fm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

ตารางที่ 1 แสดงความแปรปรวนสองทางของค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Fv/Fm) ในสาหร่ายฟุ้งชะโดที่ได้รับทองแดงและสังกะสีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 3 วัน

Repeated Measures Analysis of Variance (fv/fm) Sigma-restricted parameterization					
Effect	Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of	MS	F	p
Treatment	0.98	6	0.16	100.78	0.00
DAY	0.27	2	0.13	48.80	0.00
DAY*treatment	0.46	12	0.04	14.00	0.00

เมื่อวัดปริมาณกลูตาไธโอนในแต่ละชุดความเข้มข้นของทองแดงและสังกะสี พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลองวันที่ทำการวัดค่า และปฏิสัมพันธ์ระหว่างชุดการทดลองและวันที่ทำการวัดค่าปริมาณกลูตาไธโอน (p<0.05, รูปที่ 2, ตารางที่ 2) โดยในวันที่ 1 ปริมาณกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้ทองแดงไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมแต่พบการเพิ่มขึ้นของ

ปริมาณกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้สังกะสีที่ความเข้มข้น 200 และ 1000 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, รูปที่ 3) ส่วนในวันที่ 3 พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้ทองแดง 2 ไมโครโมลาร์ และสังกะสี 1000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, รูปที่ 3) และโดยภาพรวมชุดการทดลองที่ให้โลหะหนักมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูตาไธโอนในวันที่ 3 เทียบกับวันที่ 1 การตอบสนองของปริมาณกลูตาไธโอนในสภาวะเครียดจากพิษโลหะหนักทองแดงและสังกะสีชี้ให้เห็นถึงบทบาทของกลูตาไธโอนในสาหร่ายฟุงชะโดซึ่งอาจเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยตรง (Nagalakshmi & Prasad, 2001; Hossain, 2012)) หรือเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ไฟโตคีเลติน (Phytochelatin; PCs) ซึ่งทำหน้าที่ลดความเป็นพิษของโลหะหนักโดยจับกับไอออนโลหะหนักอิสระสร้างเป็นสารประกอบและนำเข้าสู่แวคิวโอลต่อไปเรียกว่า sequestration (Gill & Tuteja, 2010) การเพิ่มขึ้นของกลูตาไธโอนที่ความเข้มข้นของทองแดงและสังกะสีระดับต่ำถึงปานกลางอาจเป็นสาเหตุทำให้ไม่พบการลดลงของ Fv/Fm ที่ความเข้มข้นดังกล่าว นั่นคือ กลูตาไธโอนอาจป้องกันสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ด้วยความเข้มข้นของโลหะหนักในระดับหนึ่งแต่เมื่อเกิดความเครียดออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้นจากโลหะหนักที่เพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการป้องกันพิษโลหะหนักโดยระบบต้านอนุมูลอิสระและ sequestration อาจไม่เพียงพอ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสงได้จากผลการศึกษาอาจกล่าวได้ว่าปริมาณกลูตาไธโอนมีการตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของสังกะสีมากกว่าทองแดง เนื่องจากพบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูตาไธโอนในทุกชุดการทดลองที่มีการให้สังกะสี อย่างไรก็ตามการลดลงของกลูตาไธโอนในชุดการทดลองที่ให้ทองแดงนั้น อาจเป็นผลมาจากการนำกลูตาไธโอนไปสังเคราะห์ ไฟโตคีเลตินทำให้ปริมาณของกลูตาไธโอนลดลง (Nagalakshmi & Prasad, 2001; Hossain, 2012) พลวัตของการสร้างและการใช้กลูตาไธโอนภายใต้สภาวะเครียดจากโลหะหนัก ในสาหร่ายฟุงชะโดควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป



Treatment	Total glutathione content (nmole/mg sample)	
	Day 1	Day 3
control	2.81 ± 1.02 ^{ac}	4.95 ± 0.30 ^a
2 µMCu	3.74 ± 1.25 ^{ac}	8.96 ± 2.19 ^b
5 µMCu	3.03 ± 0.64 ^{ac}	5.01 ± 1.26 ^{ac}
10 µMCu	0.89 ± 0.24 ^c	2.30 ± 0.91 ^{ac}
200 µMZn	9.31 ± 2.39 ^b	6.90 ± 1.84 ^{ab}
500 µMZn	3.73 ± 0.85 ^a	5.49 ± 1.12 ^{ab}
1000 µMZn	6.67 ± 0.82 ^b	8.35 ± 1.58 ^b

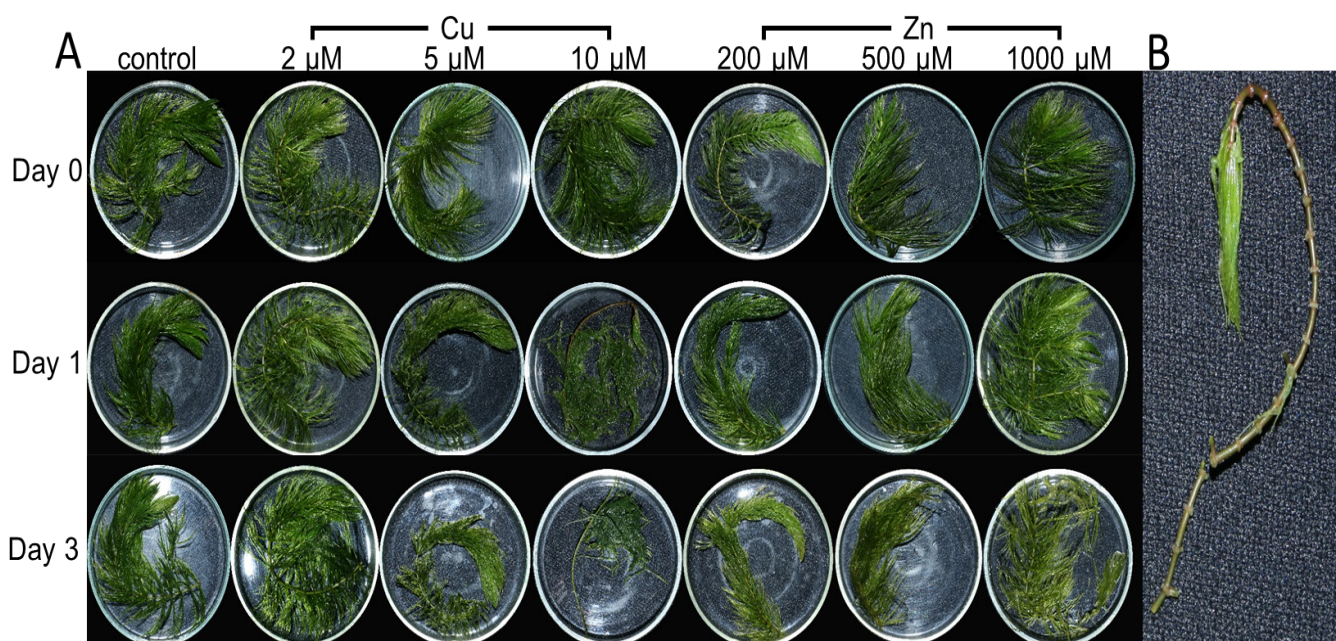
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูตาไธโอนในเนื้อเยื่อของในสาหร่ายฟุงชะโดที่ได้รับทองแดงและสังกะสีความเข้มข้นต่าง ๆ ($n=5$, ค่าเฉลี่ย $\pm$ SE) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลองที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ตารางที่ 2 แสดงความแปรปรวนสองทางของปริมาณกลูตาไธโอน (GSH) ในสาหร่ายฟุงชะโดที่ได้รับทองแดงและสังกะสีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 3 วัน

Two-Way Analysis of Variance (GSH) Sigma-restricted parameterization					
Effect	Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. Of	MS	F	p
Treatment	286.62	6	47.77	5.40	0.00
DAY	50.70	1	50.70	5.73	0.02
DAY*treatment	68.89	6	11.48	1.30	0.27

นอกจากนี้ความเป็นพิษของโลหะหนักยังส่งผลให้สาหร่ายพวงพะยอมมีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้บางประการ เช่น ใบเหลืองและใบร่วง (รูปที่ 3) โดยสอดคล้องกับความรุนแรงที่ตรวจสอบจากค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง โดยในวันที่ 1 พบอาการใบเหลืองและใบร่วงในชุดการทดลองที่ให้ทองแดง 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 3A,3B) และในวันที่ 3 พบลักษณะดังกล่าวในชุดการทดลองที่ให้สังกะสี 1000 ไมโครโมลาร์ อาการใบเหลืองหรือ chlorosis อาจเป็นผลเนื่องจากทองแดงและสังกะสีมีประจุเช่นเดียวกับแมกนีเซียมจึงสามารถเข้าไปแทนที่โมเลกุลแมกนีเซียมในโครงสร้างโมเลกุลคลอโรฟิลล์ (Cuchiaro, 2015; Sidhu, 2016; Thomas, 2016) อีกทั้งทองแดงสามารถยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โครงสร้าง porphyrin ส่งผลให้การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ถูกยับยั้ง (Fernandes & Henriques, 1991) โดยสาเหตุเหล่านี้ส่งผลให้พืชเกิดอาการใบเหลืองซีดและอาจเป็นสาเหตุของการหยุดชะงักปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง

ในแง่ของการนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bioindicator) สาหร่ายพวงพะยอมมีความเหมาะสมเนื่องจากการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางและมีรายงานว่ามีความไวต่อการปนเปื้อนโลหะหนัก (Zuccarini & Kampus, 2011) มากกว่าพืชชนิดอื่น เช่น สาหร่ายหางกระรอก (Srivastava, 2006) โดยในการศึกษานี้มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและแสดงอาการใบเหลืองซีดและใบหลุดร่วงภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการได้รับโลหะหนักโดยเฉพาะทองแดง ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง ปริมาณกลูตาไธโอนและปริมาณรงควัตถุของสาหร่ายพวงพะยอมจึงจัดเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดระดับความรุนแรงขั้นแรกที่เกิดขึ้นในระดับสรีรวิทยา อย่างไรก็ตามพื้นที่เก็บตัวอย่างมีคุณภาพน้ำที่ดี มีความเข้มข้นของทองแดงอยู่ในช่วง 0.008-0.072 มิลลิกรัม / ลิตร และความเข้มข้นของสังกะสีอยู่ในช่วง 0.005-0.053 มิลลิกรัม / ลิตร ต่ำกว่าค่ามาตรฐานน้ำผิวดิน คือทองแดงไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม / ลิตร และสังกะสีไม่เกิน 1 มิลลิกรัม / ลิตร จึงมีความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายพวงพะยอมในการทดลองนี้อาจมีความไวในการตอบสนองต่อการปนเปื้อนโลหะหนักมากกว่าและมีการตอบสนองที่แตกต่างไปจากสาหร่ายพวงพะยอมจากแหล่งที่อยู่อื่นที่อาจมีการปนเปื้อนในระดับที่สูงกว่า ดังนั้นเพื่อพัฒนาแนวทางการใช้สาหร่ายพวงพะยอมเพื่อเฝ้าระวังปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในระบบนิเวศน้ำจืด จึงควรมีการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองของสาหร่ายพวงพะยอมที่มีการปรับตัวต่อคุณภาพน้ำที่แตกต่างกันในการวิจัยครั้งต่อไป



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของสาหร่ายพวงพะยอมที่ได้รับทองแดงและสังกะสีความเข้มข้นต่าง ๆ ในวันที่ 0 1 และ 3 (A) และการหลุดร่วงของใบของสาหร่ายพวงพะยอมที่ได้รับทองแดงที่ความเข้มข้นทองแดง 10 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1 (B)

สรุปผลการวิจัย

โลหะหนักทองแดงและสังกะสีลดประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่สองของสาหร่ายพวงพะโตโดยทองแดงมีความรุนแรงมากกว่าสังกะสี โลหะหนักทั้งสองส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูตาไธโอนแตกต่างกัน สังกะสีทุกความเข้มข้นเหี่ยวทำให้มีการสะสมกลูตาไธโอนเพิ่มมากขึ้นในขณะที่ทองแดงที่ความเข้มข้นต่ำเท่ากันที่เพิ่มปริมาณกลูตาไธโอน อย่างไรก็ตามพารามิเตอร์ทั้งสองมีความไวต่อการได้รับโลหะหนักทองแดงและสังกะสีจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาพารามิเตอร์ทั้งสองเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ (Biomarkers) เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนในระบบนิเวศน้ำจืดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนเงินทุนในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

บรรณานุกรม

- Burzyski, M., & Zurek, A. (2007). Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica*, 45(2), 239-244.
- Cook, C.D.K. (1985). Range extensions of aquatic vascular plant species. *Journal of Aquatic Plant Management*, (23), 1-6.
- Cuchiara, C.C. et al. (2015). Physiological responses of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants due to different copper concentrations. *Ciências Agrárias*, 36(6), 4165-4176
- De Filippis, L.F., & Ziegler, H. (1993). Effect of sublethal Concentrations of Zinc, Cadmium and Mercury on the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle of Euglena. *Journal of Plant Physiology*, 142(2), 167-172.
- Fernandes, J.C. & Henriques F.S. (1991). Biochemical, Physiological, and Structural Effects of Excess Copper in Plants. *The Botanical Review*, 57, 246-273.
- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gonzalez-Mendoza, D. et al. (2007) Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquatic Toxicology*, 83, 306-314.
- Hossain, M.A. et al. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*. 1-37.
- Küpper, H. & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8, 269-285.
- Marqués, M.J., et al. (2001). Heavy metals pollution of aquatic ecosystems in the vicinity of a recently closed underground lead-zinc mine (Basque Country, Spain). *Environmental Geology*, 40(9), 1125-1137.
- Mohanty, N., Vass, I., & Demeter, S. (1989). Impairment of Photosystem-2 Activity At the Level of Secondary Quinone Electron-Acceptor in Chloroplasts Treated With Cobalt, Nickel and Zinc Ions. *Physiologia Plantarum*, 76(3,1), 386-390.
- Nagalakshmi, N. & Prasad, M.N.V., (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci*. 160, 291-299.
- Nanda, R. & Agrawal, V. (2016). Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. *Environ Exp Bot* 125:31-41.
- Pätsikkä, E., Aro, E.M., & Tyystjärvi, E. (2001). Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 113(1), 142-150.

- Shahid, M. et al. (2014). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 232.
- Sidhu, G.P.S. (2016). Physiological, Biochemical and Molecular mechanisms of Zinc uptake, toxicity and tolerance in plants. Kournal of Global Biosciences, 5(9), 4603-4633.
- Srivastava, S. et al. (2006). Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Aquatic Toxicology, 80, 405-415
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In: Luch A. (Eds). Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum, 101, 133-164.
- Thomas, G. et al. (2016). Deficiency and toxicity of nanomolar copper in low irradiance-A physiological and metalloproteomic study in the aquatic plant *Ceratophyllum demersum*. Aquatic Toxicology, 177, 226-236.
- Tsonev, T., & Lidon, F.J.C. (2012). Zinc in plants - An overview. Emirates Journal of Food and Agriculture, 24(4), 322-333.
- Van Assche, F., & Clijsters, H. (1986). Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: Effects on electron transport and photophosphorylation. Journal of Plant Physiology, 125(3-4), 355-360.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants . Brazilian Journal of Plant Physiology, 17(1), 145-156.
- Zuccarini, P., & Kampuš, S. (2011). Two aquatic macrophytes as bioindicators for medium-high copper concentrations in freshwaters. Plant Biosystem. 145(2), 503-506.