



ผลของทองแดงและสังกะสีต่อสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวชนิด

Chlorella vulgaris Beyerinck

Toxicity Effects of Copper and Zinc on Physiology of the Green
Microalga, *Chlorella vulgaris* Beyerinck

พฤทธิพงษ์ เพชรช่วย

Phruetthiphong Phetchuay

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Botany

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ผลของทองแดงและสังกะสีต่อสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวชนิด

Chlorella vulgaris Beyerinck

Toxicity Effects of Copper and Zinc on Physiology of The Green
Microalga, *Chlorella vulgaris* Beyerinck

พฤทธิพงษ์ เพชรช่วย

Phruetthiphong Phetchuay

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Botany

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของทองแดงและสังกะสีต่อสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวชนิด
Chlorella vulgaris Beyerinck

ผู้เขียน นายพฤทธิพงษ์ เพชรช่วย

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก บัวเพชร)

.....ประธานกรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีรพร เพกเกาะ)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก บัวเพชร)

.....กรรมการ
 (ดร. สุธินี สีนุช)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
 ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก บัวเพชร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นายพฤทธิพงศ์ เพชรช่วย)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นายพฤทธิพงศ์ เพชรช่วย)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของทองแดงและสังกะสีต่อสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck
ผู้เขียน	นายพฤทธิพงศ์ เพชรช่วย
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กถูกใช้เป็นโมเดลในการทดสอบความเป็นพิษของสารปนเปื้อนอย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* Beyerinck ต่อการปนเปื้อนทองแดง ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่ความเข้มข้นต่างกัน (ชุดควบคุม 125 250 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์) เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยเติมโลหะหนักในอาหารเหลวในระยะ exponential วัดปริมาณโลหะหนักในเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่สอง และปริมาณกรดอะมิโนโพรลีนในเวลา 0 6 12 ชั่วโมง 3 และ 5 วันหลังจากเติมโลหะหนัก วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และพารามิเตอร์ที่เป็นตัวบ่งชี้สถานะเครียดออกซิเดชัน ได้แก่ ปริมาณสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว (ROS) การเกิดออกซิเดชันของไขมัน (MDA) ในวันที่ 0 และวันที่ 5 ของการทดลอง ผลการศึกษาพบว่าการได้รับทองแดง และสังกะสีมีผลเพิ่มปริมาณโลหะหนักภายในเซลล์ การปนเปื้อนโลหะหนักส่งผลยับยั้งค่าประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูงสุดในระบบแสงที่สอง (F_v/F_m) และประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่สอง (ΦPSII) ของ *C. vulgaris* ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับโลหะหนัก โดยค่า F_v/F_m และ ΦPSII ลดลง ณ วันที่ 3 หลังจากเติมทองแดงหรือสังกะสี เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าทองแดงและสังกะสีทุกความเข้มข้นมีผลลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาหร่ายมีปริมาณสารอนุมูลอิสระออกซิเจนที่ว่องไวเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองเติมทองแดง 1,000 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่พบการเกิดออกซิเดชันของไขมันเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่เติมทองแดง 250-1,000 ไมโครโมลาร์ และสังกะสี 500-1,000 ไมโครโมลาร์ ที่สำคัญพบการเพิ่มขึ้นของโพรลีนอย่างแปรผันตามความเข้มข้นและเวลาในการได้รับโลหะหนัก การสะสมโพรลีนในการทดลองนี้อาจเป็นการตอบสนองจากความเครียดที่เหนียวนำโดยโลหะหนักหรือหนึ่งในกลไกการทนพิษโลหะหนักของ *C. vulgaris* ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป การศึกษาคั้งนี้สามารถระบุพารามิเตอร์ที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนโลหะหนักในแหล่งน้ำได้

Thesis Title	Toxicity Effects of Copper and Zinc on Physiology of the Green Microalga, <i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck
Author	Mr. Phruetthiphong Phetchuay
Major Program	Botany
Academic Year	2018

ABSTRACT

Microalgae are common model organisms used in ecotoxicological investigations. The present study assessed the physiological responses of *Chlorella vulgaris* to copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and zinc (ZnCl_2) exposure at different concentrations (control 125 250 500 and 1,000 μM) for five days. Heavy metals were introduced into the growing media during the exponential phase. Heavy metal accumulation was measured at the end of the experiment. Photosynthetic efficiency and proline content were measured after 0, 6, 12 hours and 3, 5 days after treatment. Chlorophyll *a*, total reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO) were measured at the beginning and at the end of the experiment. Both heavy metals showed dose-dependent cellular accumulation. Decreased maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) and effective quantum efficiency of photosystem II (Φ_{PSII}) were influenced by both heavy metal concentration and time of exposure and showed a reduction from day 3 of exposure. Other toxicity symptoms included chlorophyll degradation and an increase in reactive oxygen species (ROS). Exposure to both heavy metals resulted in a decrease in chlorophyll *a* content to a similar extent. While an increase in ROS was detected only for 1,000 μM copper, an increase in lipid peroxidation was detected in 250-1,000 μM copper and 500-1,000 μM zinc. Proline, an amino acid with various putative protective functions against stress, exhibited a rapid increase with increases in heavy metal concentration and time of exposure. These results provide a suite of effective biomarkers for heavy metal exposure using *C. vulgaris* as a bioindicator.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ลุล่วงได้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก บัวเพชร สำหรับการถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในทุกด้านตลอดการจัดทำวิทยานิพนธ์ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องแก้ไขเรียบร้อยมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีรพร เพกเกาะ อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประธานกรรมการสอบ และ ดร. สุธินี สีนุชก อาจารย์ประจำคณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กรุณาให้เกียรติตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และเสนอแนะเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรศิลป์ ผลพันธิน รองศาสตราจารย์ ดร. อุบลัมภ์ มีสวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยา พิรขจรเกียรติ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสาวภา ดั่งปาน ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ กรุณาให้คำแนะนำ เอื้อเฟื้อสารเคมีและอุปกรณ์ ตลอดจนสถานที่สำหรับการทำวิจัย เพื่อให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และบุคลากรภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แขนงต่างๆ และให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา และขอบคุณสมาชิกพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยา 50 พรรษา สยามบรมราชกุมารี และห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ตลอดกำลังใจตลอดงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี พิรพรพิศาล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรพร เพกเกาะ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชยากร ภูมาศ ตลอดสมาชิกห้องปฏิบัติการวิจัยสำหรับอายุ পর্যุทธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เป็นดั่งแรงบันดาลใจ ในการรักในศาสตร์แห่งสรีรวิทยาการเพาะเลี้ยงสำหรับขนาดเล็ก

สุดท้ายขอขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวเพชรช่วย แก้วแดง และภักดี ขอขอบคุณกำลังใจที่เปี่ยมล้นของเพื่อนๆ ชิววิทยา รุ่น 40 พี่ๆ น้องๆ คณะวิทยาศาสตร์คอยให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และที่สำคัญที่สุดขอขอบคุณ นายแพทย์กวินทร์ ภักดี สาขากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คอยอยู่เคียงข้าง ไม่ว่าจะทุกข์หรือสุข ตลอดงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

พฤทธิพงศ์ เพชรช่วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่ 1 บทนำ และที่มาของการวิจัย	
ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย	4
สมมติฐานของการทำวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับของงานวิจัย	4
บทตรวจเอกสาร	5
บทที่ 2 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	
วัสดุ และอุปกรณ์	24
วิธีการทดลอง	29
บทที่ 3 ผลการศึกษา	35
บทที่ 4 อภิปรายผลการศึกษา	
อภิปรายผลการศึกษา	46
การนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา	56
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	81

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
ตาราง 1 ตารางแสดงปริมาณของโลหะหนักในแหล่งตะกอนดิน และแหล่งน้ำประเภทต่างๆ ตามเกณฑ์กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.)	6
ตาราง 2 สมาชิกกลุ่มของสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) และกลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ (reactive nitrogen species, RNS)	13
ตาราง 3 ชุดการทดลองการเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสี ในอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก	30
ตาราง 4 คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีบางประการ ของชุดการทดลองเติมโลหะหนักทองแดงและสังกะสี เมื่อผ่านไป 5 วันหลังการเติมโลหะหนักเปรียบเทียบ กับชุดอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน JM (n=12; ค่าเฉลี่ย±SE)	36
ตาราง 5 ตารางเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด <i>C. vulgaris</i> ต่อโลหะหนักทองแดง และสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ	50

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
<p>ภาพที่ 1 ผลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นยาสูบ (<i>N. tacacum</i> L.) ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเติมโลหะหนัก แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลา 5 สัปดาห์</p>	8
<p>ภาพที่ 2 ผลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชวงศ์ผักกาด 2 ชนิด (<i>B.juncea</i> L. และ <i>B. napus</i> L.) ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเติมสังกะสีความเข้มข้นแตกต่างกัน</p>	8
<p>ภาพที่ 3 ความแตกต่างของความสามารถในการสังเคราะห์แสงของพืชระหว่าง a สภาวะปกติ b การถูกกระตุ้นด้วยโลหะหนัก</p>	10
<p>ภาพที่ 4 โครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เอ a โครงสร้างทั่วไป และ b การเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบคลอโรฟิลล์ เอ ส่วนของ hypothetical 6-membered และวงแหวน isocyclic cyclopentanone</p>	11
<p>ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงการสะสมรงควัตถุของสาหร่ายสีเขียว ชนิด <i>Closterium ehrenbergii</i> หลังจากเติมทองแดง ความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 6 และ 48 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง</p>	12

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 6 ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดของกลุ่มของอนุมูลอิสระ (ROS) เมื่อกระตุ้นด้วยทองแดง	14
ภาพที่ 7 กระบวนการออกซิเดชันของไขมัน และสังเคราะห์ MDA อันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์พืช	15
ภาพที่ 8 การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากการเกิดออกซิเดชันของไขมัน	15
ภาพที่ 9 การสังเคราะห์และสลายกรดอะมิโนโพรลีนจากบริเวณต่างๆ ของเซลล์พืช เช่น คลอโรพลาสต์ ไซโตซอล ไมโทคอนเดรีย	17
ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ของวิถีสังเคราะห์/สลายกรดอะมิโนโพรลีนกับการสลายน้ำตาลเพนโตส วัฏจักร TCA วัฏจักรยูเรีย และกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (ETC)	18
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีนกับการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ	19
ภาพที่ 12 a) โมเดลส่วนประกอบภายในของสาหร่ายขนาดเล็กสกุล <i>Chlorella</i> b) ภาพถ่ายสาหร่ายขนาดเล็กชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	22

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
<p>ภาพที่ 13 แผนภาพสรุปวิธีการทดลองของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ</p>	34
<p>ภาพที่ 14 ชุดการทดลองเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสี ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อผ่านไป 5 วันหลังการเติมโลหะหนักเปรียบเทียบกับชุดควบคุม</p>	36
<p>ภาพที่ 15 การสะสมโลหะหนักทองแดงและสังกะสี ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> เมื่อเติมโลหะหนักทองแดงหรือสังกะสีในความเข้มข้นต่างๆ a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี หลังการทดลองผ่านไป 5 วันเมื่อเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ</p>	38
<p>ภาพที่ 16 ค่าความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดในระบบแสงที่ 2 (maximum quantum yield, Fv/Fm) ของสาหร่ายขนาดเล็ก ชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> เมื่อเติมโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่างกัน a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 หลังการเติมโลหะหนัก</p>	40

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
<p>ภาพที่ 17 ค่าประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 (effective quantum yield of photosystem II, ϕPSII) ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> เมื่อเติมโลหะหนัก ที่ความเข้มข้นต่างกัน a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 หลังการเติมโลหะหนัก</p>	41
<p>ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณคลอโรฟิลล์ <i>a</i> ในวันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) เทียบกับวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง) ในสาหร่ายขนาดเล็ก ชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> หลังจากการเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ</p>	42
<p>ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์ของการสะสมอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (total reactive oxygen species, ROS) ในวันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) เทียบกับวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง) ในสาหร่ายขนาดเล็ก ชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> หลังจากการเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ</p>	43

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
<p>ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การสะสมกรดมัลลอนอัลดีไฮด์ (malonaldehyde acid, MDA) ในวันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) เทียบกับวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง) ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> หลังจากการเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ</p>	44
<p>ภาพที่ 21 ปริมาณกรดอะมิโนโพรลีนเปรียบเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> เมื่อเติมโลหะหนัก ที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 หลังการเติมโลหะหนัก a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี</p>	45
<p>ภาพที่ 22 แผนภาพสรุปกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยา ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด <i>Chlorella vulgaris</i> ต่อโลหะหนักทองแดงและสังกะสี Cu แทน ทองแดงไอออน; Zn แทน สังกะสีไอออน; CP แทน ส่วนของคลอโรพลาสต์; MT แทน ไมโทคอนเดรีย; NU แทน นิวเคลียส; Fv/Fm แทน ค่ากะประมาณความเครียดของพืชในระบบแสงที่สอง; ΦPSII แทน ค่ากะประมาณอัตราการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสงที่สอง; Chl <i>a</i> แทน คลอโรฟิลล์ เอ ; ROS แทน อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว; MDA แทน กรดมัลลอนอัลดีไฮด์ ผลผลิตของกระบวนการออกซิเดชัน; Pro แทน กรดอะมิโนโพรลีน</p>	57

บทที่ 1

บทนำ และหลักการสำคัญ

1. ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย

ในปัจจุบันระบบนิเวศแหล่งน้ำหลายแห่งเกิดการปนเปื้อนของโลหะหนักจากกิจกรรมทั้งภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น การทำอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ โรงงานบำบัดน้ำเสีย โรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (Veenstra *et al.*, 1999; Terry and Stone 2002; Fathi *et al.*, 2008) เมื่อโลหะหนัก เช่น ทองแดง สังกะสี โคโรเมียม แคดเมียม ปรอท เข้าสู่สิ่งมีชีวิตจะมีผลกระทบต่อกลไกระดับเซลล์ เช่น ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่มีผลกับระบบเมตาบอลิซึมต่างๆ การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ การเพิ่มขึ้นของการออกซิเดชันของไขมัน และการยับยั้งการเจริญเติบโต เป็นต้น (Chekroun and Baghour, 2013)

ทองแดง (copper) และสังกะสี (zinc) จัดเป็นโลหะหนักที่สามารถพบการปนเปื้อนในแหล่งระบบนิเวศทางน้ำ รวมไปถึงระบบมลพิษทางน้ำ เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (wastewater) (Terry and Stone, 2002; Ullah *et al.*, 2015) โดยทั้งทองแดงและสังกะสีจัดเป็นธาตุอาหารรองที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของพืช และเป็นแหล่งโครงสร้างสำคัญในสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และมีบทบาทที่สำคัญต่อการดำเนินการทางสรีรวิทยาของพืช เช่น การสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆ การหายใจระดับเซลล์ กระบวนการออกซิเดชัน และรีดักชันของพืช (Hafeez *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามเมื่อพืชได้รับปริมาณของโลหะหนักที่สูง จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม นำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์พืช (Singh *et al.*, 2010; Oves *et al.*, 2016) จากการรายงานเบื้องต้นพบว่าทองแดง และสังกะสีมีผลต่อระบบการทำงานของสังเคราะห์แสงของพืช โดยมีผลยับยั้งปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงโดยตรง (light reactions) เช่น ยับยั้งการทำงานของบริเวณควิโนน บี (quinone B, Q_B) และโปรตีนเชิงซ้อนที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์น้ำ (oxygen evolving complex, OEC) ยับยั้งกระบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอนระหว่างระบบแสงที่สอง และระบบแสงที่หนึ่ง (Oukarroum *et al.*, 2012; Ravet

and Pilon, 2013) นอกจากนี้เมื่อพืชเกิดภาวะเครียดอันเนื่องมาจากทองแดงและสังกะสี จะส่งผลให้มีการเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ไอออน (O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และอนุพันธ์ของไฮโดรเจนอื่นๆ ทั้งนี้สารดังกล่าวจะไปส่งผลกระทบต่อการทำงานของสารสำคัญในเซลล์พืชอีกต่อหนึ่ง เช่น ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก (Halliwell and Gutteridge, 1999) การยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง (Schutzendubel and Polle, 2003; Kacienė *et al.*, 2015) การลดจำนวน การกระจาย และประสิทธิภาพการทำงานของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ (Pinto *et al.*, 2003) ดังนั้นผลทางพิษวิทยาอันเนื่องมาจากโลหะหนักทั้งสองชนิดจึงอาจทำให้ลดอัตราการเจริญเติบโตและทำให้พืชตายได้ (Lu *et al.*, 2015)

สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ที่ถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษากลไกระดับเซลล์อย่างกว้างขวาง (Wang *et al.*, 1998a; Kowalewska, 1999; Wang *et al.*, 2010) โดยจากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากแหล่งน้ำที่มีโลหะหนักปนเปื้อน พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กดูดซับโลหะหนักได้อย่างรวดเร็ว และมีความไวของการตอบสนองทางสรีรวิทยา (Rodrigues *et al.*, 2012) โดยการตอบสนองทางสรีรวิทยามีความใกล้เคียงกับที่มีการรายงานในพืช (Levy *et al.*, 2007) จากการทบทวนเอกสารพบว่า ทั้งทองแดงและสังกะสีมีผลในการลดปริมาณการสร้างรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ เอ บี แคโรทีนอยด์ และไฟรีนอยด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก (Kebeish *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016; Zeraarkar *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาอื่นๆ เช่น สาหร่ายจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ พบการสร้างปริมาณอาหารและฮอร์โมนผิดปกติ (Stiborova, 1988) และการสังเคราะห์ด้วยแสงถูกยับยั้ง (Stiborova, 1988; Baron *et al.*, 1995) ในขณะที่สาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถทนต่อการปนเปื้อนโลหะหนักมีการปรับตัวทางสรีรวิทยา เช่น มีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากภาวะเครียด (Wang *et al.*, 2004) มีการเคลื่อนย้ายโลหะหนักไปสะสมภายในส่วนของแวคิวโอล (นวรรตน์, 2558; Alam *et al.*, 2015) การลดอัตราการแบ่งเซลล์สาหร่ายเพื่อรักษาโครงสร้างและพลังงานภายในเซลล์ และการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีน (Alla and Saradhi, 1991; Ashraf and Foolad, 2007)

สาหร่ายชนิด *Chlorella vulgaris* Beijerinck เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีรายงานการศึกษาทางสรีรวิทยาจำนวนมาก (Kowalewska, 1999; Wang *et al.*, 2010) ด้วย

คุณสมบัติในการแบ่งเซลล์และการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็ว จากการศึกษากลไกสภาวะเครียดอันเกิดจากโลหะหนักต่อสาหร่ายชนิดนี้ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *C. vulgaris* ในโลหะหนัก มีการลดจำนวนของคลอโรพลาสต์ รวมไปถึงความผิดปกติของการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Filippis and Pallaghy, 1976; Alam *et al.*, 2014) และที่สำคัญพบการสะสมของสารประกอบของกรดอะมิโนโพรลีน (Saradhi, 1991; Ashraf and Foolad, 2007) กรดอะมิโนโพรลีนจัดเป็นหนึ่งในโครงสร้างที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่ผลิตจากสารกลูตาเมต (L-glutamate) (Hayat *et al.*, 2012) จากการศึกษาอื่นๆ มีการเสนอว่ากรดอะมิโนโพรลีนมีบทบาทช่วยให้ *C. vulgaris* ทนสภาวะเครียดที่หลากหลาย เช่น ในสภาวะแล้ง สภาวะการขาดธาตุอาหาร และการปนเปื้อนโลหะหนัก เนื่องจากมักจะพบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีน และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนโพรลีนในสาหร่ายที่อยู่ในสภาวะเครียดดังกล่าว (Alla and Saradhi, 1991; Mehta and Gaur, 1999; Chondhary *et al.*, 2007) โดยมีการเสนอว่ากรดอะมิโนโพรลีนทำหน้าที่ในกระบวนการควบคุมสมดุลการเข้าออกของไอออน และโมเลกุลของเหลวภายในเซลล์ (osmoregulation) และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กลุ่มสารกลูตาไธโอน (glutathione, GSH) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ของไฟโตคีเลติน (phytochelatin, PC) ซึ่งทำหน้าที่กำจัดพิษโลหะหนักอีกต่อหนึ่ง (Mehta and Gaur, 1999; Siripornadulsil *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2013) นอกจากนี้การศึกษาของ Wu และคณะ (1998a) แสดงว่าเมื่อให้กรดอะมิโนโพรลีนเพิ่มในอาหารเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. (strain 2350) พบว่ามีการดูดซึมโลหะหนักทองแดงลดลง ซึ่งการควบคุมการดูดซึมโลหะหนักนี้อาจเป็นกลไกหลักของกรดอะมิโนโพรลีนที่ช่วยลดความเครียดจากโลหะหนักในสาหร่ายชนิดนี้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโลหะหนักต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยใช้สาหร่ายขนาดเล็ก *C. vulgaris* เป็นโมเดลในการศึกษา โดยให้ความสำคัญกับทองแดง และสังกะสีซึ่งเป็นโลหะหนักที่มีการปนเปื้อนในระบบนิเวศแหล่งน้ำที่แพร่หลาย (Rub *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2015) การศึกษานี้อาจนำไปสู่การระบุกลไกการทนโลหะหนักในสาหร่าย *C. vulgaris* อันจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตของสาหร่าย *C. vulgaris* และการบำบัดสารพิษด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก (phytoremediation) ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย

เพื่อศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่าย *C. vulgaris* ต่อการปนเปื้อนทองแดงและสังกะสี และกลไกการเกิดพิษของทองแดงและสังกะสี

3. สมมติฐานของการทำวิจัย

สาหร่ายขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* จะมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อการปนเปื้อนทองแดง และสังกะสี เช่น การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่าย การยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง เพิ่มปริมาณของสารอนุมูลอิสระ การเพิ่มขึ้นของกระบวนการออกซิเดชันของไขมันและกรดอะมิโนโปรตีน ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของชนิดโลหะหนัก และเวลาที่ปนเปื้อนโลหะหนัก

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงผลกระทบของการปนเปื้อนทองแดง และสังกะสีต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่าย *C. vulgaris*

2. ทราบถึงกลไกการเกิดพิษของทองแดงและสังกะสีใน *C. vulgaris* และกลไกการทนพิษของโลหะหนักดังกล่าวใน *C. vulgaris*

5. บทตรวจเอกสาร

ผลของทองแดงและสังกะสีต่อสรีรวิทยาของพืช

Barcelo และ Poschenrieder (2013) ให้นิยามของโลหะหนัก (heavy metal) คือ สารหรืออนุภาคของธาตุที่มีน้ำหนักมากกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรหรือเลขมวลอะตอมมากกว่า 20 โดยโครงสร้างไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพของสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ (Veenstra *et al.*, 1999; Terry and Stone 2002) เนื่องจากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทั้งด้านเกษตรกรรม หัตถกรรม และอุตสาหกรรม ทำให้ผู้ประกอบการนำนวัตกรรมต่างๆ ที่ช่วยในการเพิ่มผลผลิตมาใช้มากขึ้น ซึ่งพบโลหะหนักสะสมจากแหล่งที่มาดังกล่าวมากขึ้น เช่น ทองแดง สังกะสี พรอท อะลูมิเนียม นิกเกิล แคดเมียม (Son *et al.*, 2014) โดยเฉพาะภาคเกษตรกรรม โลหะหนักดังกล่าวถูกนำมาใช้ในรูปแบบของสารกำจัดศัตรูพืช และปุ๋ยเคมีสูตรต่างๆ (Ayala *et al.*, 2014) ข้อมูลจากกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.) ได้บัญญัติค่ามาตรฐานของปริมาณโลหะหนักในแหล่งตะกอนดิน พ.ศ. 2548 (กรมควบคุมมลพิษ, 2548a) และแหล่งน้ำในธรรมชาติ แหล่งน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรม กองงานปศุสัตว์ และงานเกษตรกรรม (กรมควบคุมมลพิษ, 2548b) กำหนดค่าดังตาราง 1 จากการทบทวนเอกสารพบว่าปริมาณของทองแดง และสังกะสีในแหล่งน้ำผิวดิน และกิจกรรมหลังจากการบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยมากกว่าร้อยละ 35 มีค่าเกินกว่ามาตรฐาน (Nimrat and Vulthiphandchai, 2014)

ดังนั้นผลกระทบของโลหะหนักต่อสิ่งแวดล้อมที่ชัดเจนมากที่สุดคือ ผลกระทบต่อระบบดินและน้ำ สังคมพืชน้ำ (aquatic plant community) และกลุ่มของแพลงก์ตอนพืช (phytoplankton community) จัดเป็นตัวแทนสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ในแหล่งน้ำ (Son *et al.*, 2014) ซึ่งเมื่อกลุ่มสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ได้รับโลหะหนักมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อสัณฐานวิทยา (morphology) และสรีรวิทยา (physiology) ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะหนักและความสามารถในการทนโลหะหนักของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Clijsters and Assche, 1985; Afkar *et al.*, 2010)

ตาราง 1 ตารางแสดงปริมาณของโลหะหนักในแหล่งตะกอนดิน และแหล่งน้ำประเภทต่างๆ ตามเกณฑ์กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.)

ชนิดโลหะ หนัก	ตะกอนดิน (mg/kg)	ประเภทของแหล่งน้ำ (mg/L)			
		ประเภท ก	ประเภท ข	ประเภท ค	ประเภท ง
แคดเมียม	37		0.003	0.003	0.003
ตะกั่ว	40		0.05	0.002	0.02
นิกเกิล	160		0.05	0.05	0.01
ทองแดง	1.5		1.5	1.0	1.0
ปรอท	2.3		0.05	0.002	0.005
แมงกานีส	180	ต้องไม่พบ	1.7	0.01	0.01
สังกะสี	2.7		1.0	0.04	0.5
สารหนู	3.9		0.25	0.01	0.05
ดีดีที (DDT)	17		0.001	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
เบนซิล	6.5		0.001	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
กลุ่มซัลเฟอร์	0.6		0.05	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ

หมายเหตุ

แหล่งที่มา: ประกาศกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.) (เดิมกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) เรื่องมาตรฐานและเกณฑ์ควบคุมปริมาณโลหะหนักในตะกอนดิน พ.ศ. 2548 และประเภทแหล่งน้ำ พ.ศ. 2548

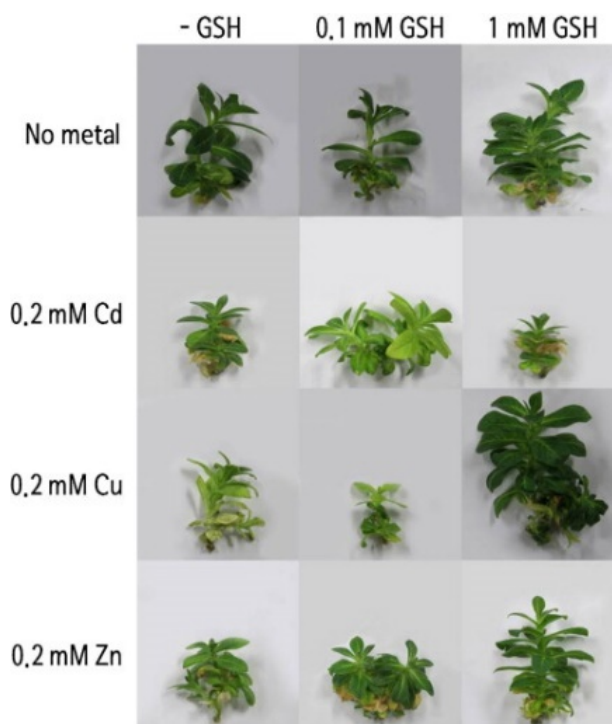
แหล่งน้ำประเภท ก แทน น้ำสำหรับอุปโภค บริโภค และแหล่งน้ำดิบสำหรับผลิตน้ำดื่ม

แหล่งน้ำประเภท ข แทน แหล่งน้ำธรรมชาติ แหล่งน้ำชลประทาน งานเกษตรกรรม

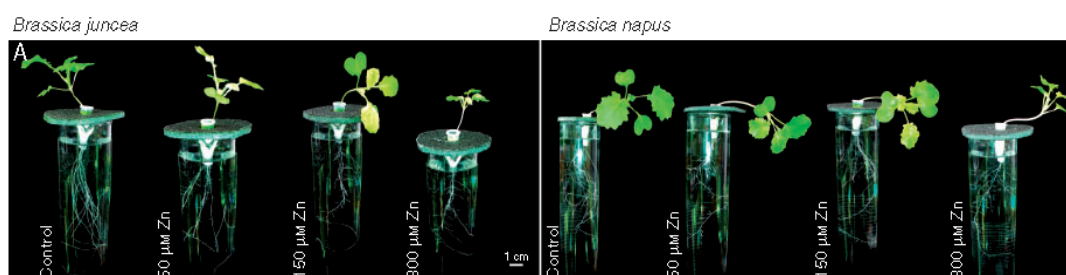
แหล่งน้ำประเภท ค แทน น้ำหลังจากการบำบัด จากอาคารขนาดใหญ่ เช่น โรงพยาบาล ขนาด 300 เตียงขึ้นไป โรงแรมขนาดใหญ่ มหาวิทยาลัย

แหล่งน้ำประเภท ง แทน น้ำหลังจากการบำบัด จากโรงงานอุตสาหกรรม งานปศุสัตว์ เช่น ฟาร์มสุกร

ทองแดง (copper) และสังกะสี (zinc) เป็นธาตุอาหารรองที่มีความจำเป็นต่อพืช แต่เมื่อพืชได้รับธาตุอาหารดังกล่าวมากกว่าปริมาณที่เหมาะสม แม้ความเข้มข้นต่ำก็สามารถเป็นพิษต่อพืชได้ เมื่อได้รับปริมาณโลหะหนักที่มากเกินไปในระยะเวลาที่นานพอจะทำให้พืชมีลักษณะที่เปลี่ยนไป โดยเห็นได้ชัดเจน เช่น ใบไหม้ ใบมีขอบเหลือง ใบร่วง รากมีการเจริญที่ผิดปกติ และการเปลี่ยนสีของใบและลำต้น จากรายงานของนวรรตน์ (2558) และ Saglam และคณะ (2016) พบว่าเมื่อพืชได้รับปริมาณทองแดง และสังกะสีมากเกินไปจะส่งผลต่อสรีรวิทยาของพืชหลายประการ เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง ยับยั้งการหายใจระดับเซลล์ การสังเคราะห์และสลายกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต ผิดปกติ และรบกวนระบบเมตาบอลิซึมของโปรตีน (Feigl *et al.*, 2015) จากการศึกษาของ Son และคณะ (2014) ทำการศึกษาผลของโลหะหนักแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มกลูตาไธโอน (glutathione; GSH) ในต้นยาสูบ (*Nicotiana tacacum* L.; tobacco) พบว่าเมื่อเติมโลหะหนักความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ในอาหารมาตรฐาน (MS media) ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นยาสูบเปลี่ยนไป เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโต ลำต้นและใบมีขนาดเล็กลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสีของใบมีลักษณะจางลง (ภาพที่ 1) และการเปลี่ยนแปลงกลไกทางสรีรวิทยาคือการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม GSH เมื่อพืชได้รับโลหะหนักจำนวน 5 สัปดาห์ และการศึกษาของ Feigl และคณะ 2015 ทำการศึกษาพืชวงศ์ผักกาด 2 ชนิดเมื่อกระตุ้นด้วยสังกะสี ความเข้มข้น 50 150 และ 300 ไมโครโมลาร์ พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดการเจริญเติบโตลดลง รวมไปถึงความยาวรากและลำต้น จำนวนและขนาดของใบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2)



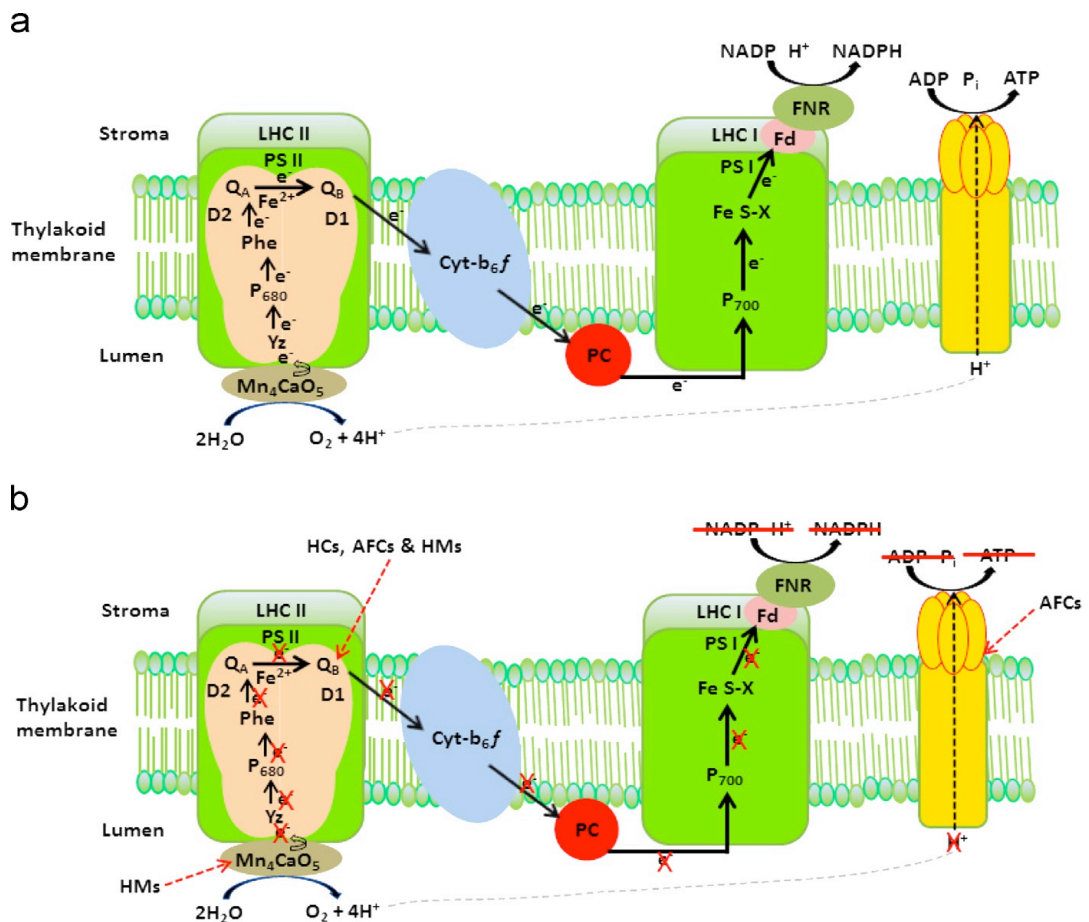
ภาพที่ 1 ผลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นยาสูบ (*N. tacacum* L.) ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเติมโลหะหนัก แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลา 5 สัปดาห์ (Son *et al.*, 2014)



ภาพที่ 2 ผลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชวงศ์ผักกาด 2 ชนิด (*B. juncea* L. และ *B. napus* L.) ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเติมสังกะสีความเข้มข้นแตกต่างกัน (Feigl *et al.*, 2015)

ทองแดงและสังกะสีมีความสัมพันธ์ต่อระบบการสังเคราะห์แสงของพืช กล่าวคือ ไอออนของโลหะหนักทั้งสองชนิดเข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง และการขนส่งอิเล็กตรอน ด้วยการยับยั้งการทำงานของ primary quinone receptor (Q_A) และ secondary quinone receptor

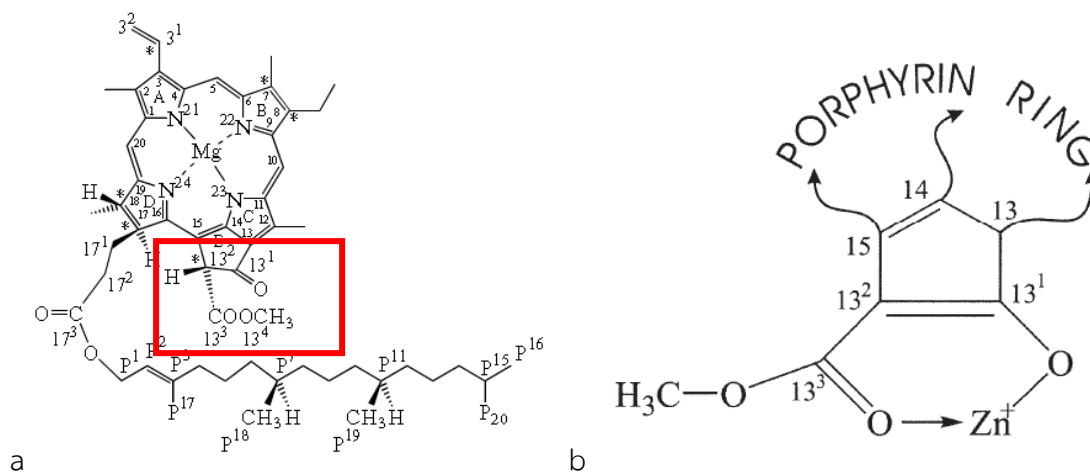
(Q_B) มีผลทำให้การทำงานของระบบแสงที่สองถูกยับยั้ง (Aggarwal *et al.*, 2012; Zlobin *et al.*, 2014) จากการทบทวนเอกสารพบว่าโลหะหนักเข้าไปจับพันธะคู่บริเวณซัลไฟด์ (sulfhydryl group, -SH) (Petsas and Vagi, 2017) รบกวนการสังเคราะห์โปรตีนตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง เมื่อพืชได้รับโลหะหนักในปริมาณมากจนเข้าสู่สภาวะ sub-lethal state จะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (light reactions) นอกจากนี้ยังลดปริมาณของสารกลุ่มโปรตีนแทรกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของคลอโรพลาสต์ ลดจำนวนรงควัตถุ (Kumar *et al.*, 2014; Son *et al.*, 2014) เช่น คลอโรฟิลล์ แคลโรทีนอยด์ ยับยั้งการทำงานของ oxygen-evolving complex (OEC) และวัฏจักรของน้ำตาลห้าโมเลกุลหรือน้ำตาลเพนโตส (pentose phosphate cycle) นอกจากนี้ไอออนบวกของทองแดง (Cu⁺ และ Cu²⁺) และสังกะสี (Zn⁺ และ Zn²⁺) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NADP-oxidoreductase ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว และกลุ่มยูกลีโนอยด์ได้ (Yruela, 2013; Kumar *et al.*, 2014) ทำให้เซลล์เสียเสถียรภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสง (ภาพที่ 3) (Yruela, 2013) จากการศึกษาของ Paunov และคณะ (2018) วัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง และการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงที่สอง (P680 และ P700) ในข้าวสาลี (*Triticum durum* Desf. (cv. Beloslava)) หลังจากการเติมทองแดง สังกะสี และแคดเมียม ความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ พบว่าอัตราการขนส่งอิเล็กตรอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดในระบบแสงที่สอง (Fv/Fm) ลดลงอีกด้วย



ภาพที่ 3 ความแตกต่างของความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชระหว่าง a) สภาวะปกติ b) การถูกกระตุ้นด้วยโลหะหนัก (Kumar *et al.*, 2014)

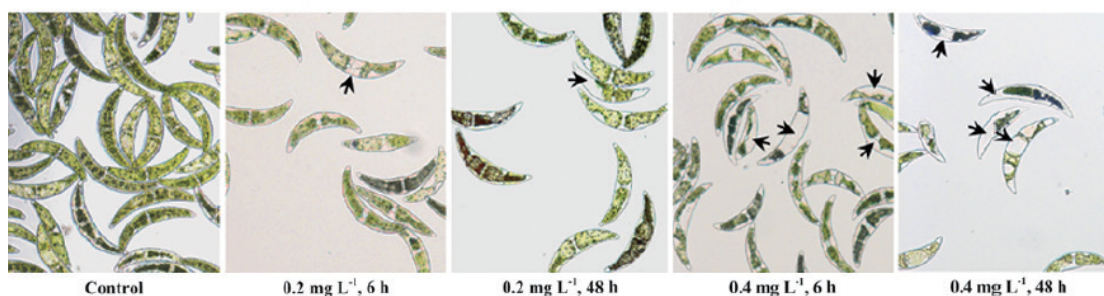
ไอออนของทองแดงไม่เพียงยับยั้งปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง แต่ยังส่งผลยับยั้งเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรคัลวิน (calvin cycle) อีกด้วย ซึ่งมีผลโดยเฉพาะเอนไซม์รูบิสโก (bisphosphate carboxylase oxygenase; Rubisco) และเพพคาร์บอกซิเลส (PEP carboxylase) (Aggarwal *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2013; Petsas and Vagi, 2017) นอกจากนี้ทั้งทองแดงและสังกะสีสามารถยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ โดยทองแดงจะรบกวนสมดุลของพลาสโตควิโนน: พลาสโตควินอล (plastoquinone: plastoquinol) ซึ่งจะไปรบกวนขั้นตอนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ อีกต่อหนึ่ง ส่วนไอออนของสังกะสีสามารถรบกวนโครงสร้างโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ ได้โดยตรงโดยพบว่า Zn^{2+} เข้าไปจับพันธะกับคาร์บอนตำแหน่ง 13^1 และ 13^2 ของกลุ่มวงแหวน isocyclic cyclopentanone ของคลอโรฟิลล์ เอ ทำให้ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง

(Petrovic *et al.*, 2006; Horn and Barrientos, 2008; Zvezdanovi and Markovi, 2009; Kalaikandhan *et al.*, 2014) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เอ a โครงสร้างทั่วไป (Zvezdanovi and Markovi, 2009) และ b การเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบคลอโรฟิลล์ เอ ส่วนของ hypothetical 6-membered และวงแหวน isocyclic cyclopentanone (Petrovic *et al.*, 2006)

จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2017) ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวชนิด *Closterium ehrenbergii* Meneghini ด้วยทองแดงความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Fv/Fm) ลดลงหลังจากเติมทองแดง 24 ชั่วโมง และมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของรงควัตถุ ณ เวลาที่แตกต่างกันพบว่าชุดการเติมทองแดง 0.4 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณของคลอโรฟิลล์ตั้งแต่ 6 และ 24 ชั่วโมงหลังจากเติมโลหะตามลำดับ (ภาพที่ 5)



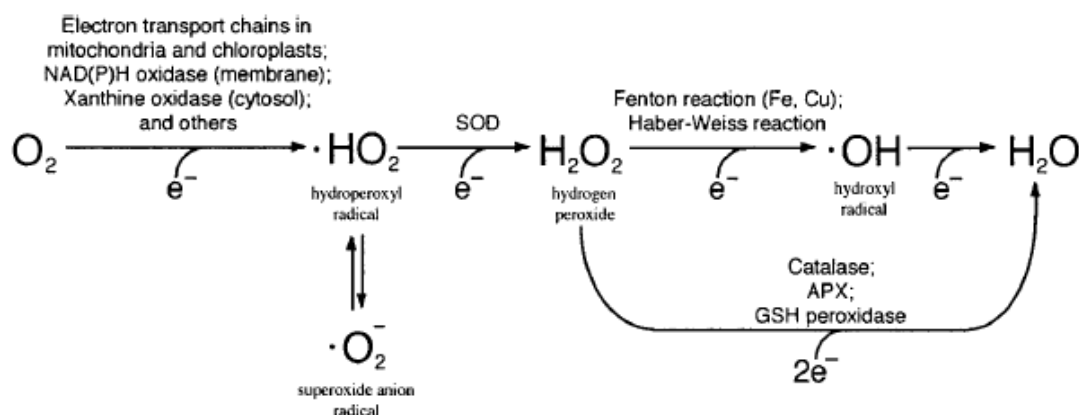
ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงการสะสมรงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวชนิด *Closterium ehrenbergii* หลังจากเติมทองแดงความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรชั่วโมงที่ 6 และ 48 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ลูกศรแสดงบริเวณของปริมาณคลอโรพลาสต์ที่สูญเสียไปหรือการลดปริมาณรงควัตถุ) (Wang *et al.*, 2017)

ทองแดงและสังกะสีส่งผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) (Feigl *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018) (ตาราง 2) โดยกลไกในการสร้างกลุ่ม ROS นั้นมีความแตกต่างกันระหว่างทองแดงและสังกะสี ทองแดงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS ได้โดยผ่านปฏิกิริยา Fenton และ Harber Weiss (Angelé-Martínez, 2014) (ภาพที่ 6) ด้วยโลหะหนักทองแดง และเหล็ก เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นอนุพันธ์ของไฮโดรเจน (OH) โดยตรง และอีกกรณีหนึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุในสถานะการถูกกระตุ้น ที่ไม่สามารถส่งผ่านพลังงานไปยังระบบการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain, ETC) แต่ส่งไปยังออกซิเจนแทน ทำให้เกิด oxygen singlet (1O_2) (Burda *et al.*, 2002; Orzechowaska *et al.*, 2008; Shahid *et al.*, 2014) แต่กรณีของโลหะหนักสังกะสี เนื่องจากสังกะสีจัดเป็นกลุ่ม redox inactive (Angelé-Martínez *et al.*, 2014; Feigl *et al.*, 2015) จึงไม่สามารถกระตุ้นการเกิด ROS ได้โดยตรง โดยความเข้มข้นของสังกะสีในระดับที่มากเกินไปจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ เนื่องจากการจับบริเวณ active bind site ของหมู่ซัลไฟด์ไฮไดรล (-SH group) ทำให้เกิดพันธะ covalent ระหว่างโลหะหนักและหมู่ซัลไฟด์ ส่งผลให้ระดับของเอนไซม์ดังกล่าวลดลงนำไปสู่การรบกวนสมดุลของปริมาณ ROS และส่งผลให้เกิด oxidative stress ภายในเซลล์ตามลำดับ (Mori and Schroeder, 2004; Wilham, 2007; Clausen *et al.*, 2013; Angelé-Martínez *et al.*, 2014; Marreiro *et al.*, 2017) จาก

การศึกษาผลของสังกะสีต่อการเพิ่มขึ้นของ ROS ในต้นยาสูบ พบว่าสังกะสีทำปฏิกิริยากับกลุ่มของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับกรดลิวอิส (Lewis acid) และส่งผลกระทบต่ออัตราการเข้าออกของประจุของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ซึ่งทำหน้าที่เป็น secondary messenger ภายในไมโทคอนเดรีย (Mori and Schroeder, 2004; Clausen *et al.*, 2013) ซึ่งส่งต่อระบบการทำงานของไซโทโครมซี (cytochrome c; cyt c) และเอนไซม์ NADPH oxidase เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์และสร้าง O_2^- และ H_2O_2 เพิ่มมากขึ้น (Angelé-Martínez *et al.*, 2014; Marreiro *et al.*, 2017)

ตาราง 2 สมาชิกกลุ่มของสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; ROS) และกลุ่มอนุมูลอิสระของไนโตรเจนออกไซด์ (reactive nitrogen species, RNS) (Liu *et al.*, 2018)

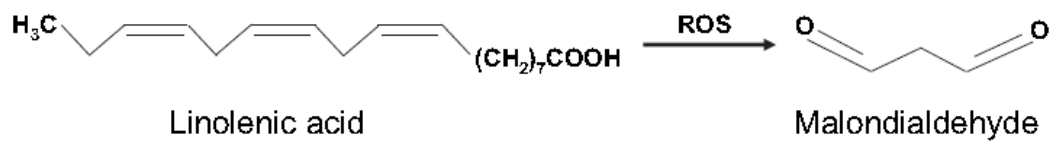
Reactive oxygen species (ROS)	Reactive nitrogen species (RNS)
Superoxide radical (O_2^-)	Nitric oxide (NO)
Hydroxyl radical (OH)	Nitrogen dioxide (NO_2)
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Nitrous acid (HNO_2)
Peroxyl radical (RO_2)	Dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
Alkoxy radical (RO)	Dinitrogen trioxide (N_2O_3)
Hydroperoxyl radical (HO_2)	Peroxynitrite (ONOO)
Singlet oxygen	Peroxynitrous acid (ONOOH)
	Alkyl peroxynitrites (ROONO)
	Nitryl chloride (NO_2Cl)



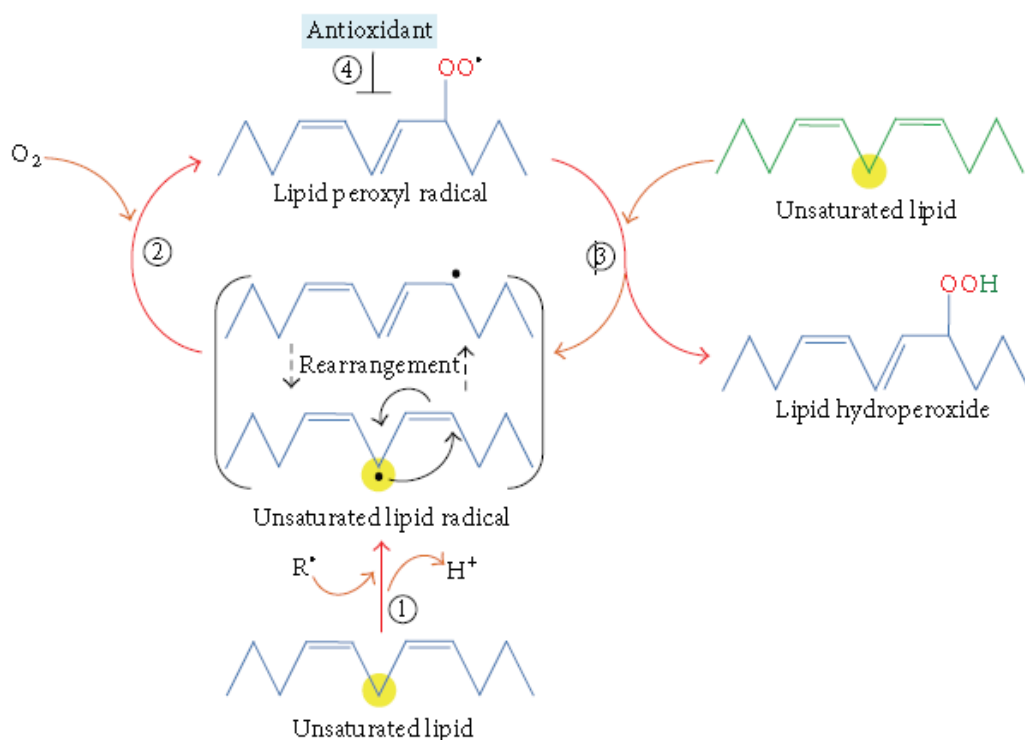
ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดของกลุ่มของอนุมูลอิสระ (ROS) เมื่อกระตุ้นด้วยทองแดง APX แทน ascorbate peroxidase GSH แทน glutathione และ SOD แทน superoxide dismutase (Angelé-Martínez *et al.*, 2014)

หากสารอนุมูลอิสระที่ว่องไวเหล่านี้ไม่ถูกกำจัดได้ทันท่วงที จะส่งผลให้เกิดภาวะเครียด oxidative stress ในออร์กาเนลล์ต่างๆ เช่น นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ เพอร์รอกซิโซม (Lee, 2018; Liu *et al.*, 2018) เมื่อ ROS เพิ่มมากขึ้น สารกลุ่มดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการจับกับโมเลกุลออกซิเจนของฟอสโฟไลพิดทำให้เกิดพันธะคู่และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลุ่มไลโปจีเนส (lipogenesis) และกลุ่มของไซโทโครม พี450 (cytochrome P450) ทำให้เกิดเยื่อหุ้มเซลล์เสียเสถียรภาพและเกิดการออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation, LPO) การออกซิเดชันของไขมันจะมีการสร้างผลิตภัณฑ์คืออนุมูลกรดมัลลอนัลดีไฮด์ (malondialdehyde acid; MDA) กระบวนการเกิดการออกซิเดชันของไขมันนั้นเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยโลหะหนักเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว ทำให้เกิดอนุภาคของไฮโดรเจนและกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid) และเมื่อกรดไขมันดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ oxygen singlet ซึ่งเกิดจากกระบวนการเกิด ROS ทำให้เป็นอนุพันธ์ของไขมัน เพอร์รอกซิลเรดิคัล (lipid peroxyl radical) และเมื่ออนุพันธ์ดังกล่าวเข้าทำปฏิกิริยาลูกโซ่กับส่วนของฟอสโฟไลพิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้อนุภาคของโมเลกุลออกซิเจนเคลื่อนที่ไปทั่วระบบทำให้เกิดกระบวนการสลับตัวของไลพิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (fib fob reaction) ทำให้เกิดการขาดเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดไลพิด ไฮโดรเพอร์

ออกไซด์ (lipid peroxide) ตามลำดับ (Gill and Tuteja, 2010; Ayala *et al.*, 2014; Hossain *et al.*, 2012; Palipoch and Koomhin, 2015) (ภาพที่ 7-8) เมื่อมีการสะสมของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการออกซิเดชันของไขมันมากเกินไปจะเกิดการสื่อสารสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Ayala *et al.*, 2014; Shahid *et al.*, 2014)



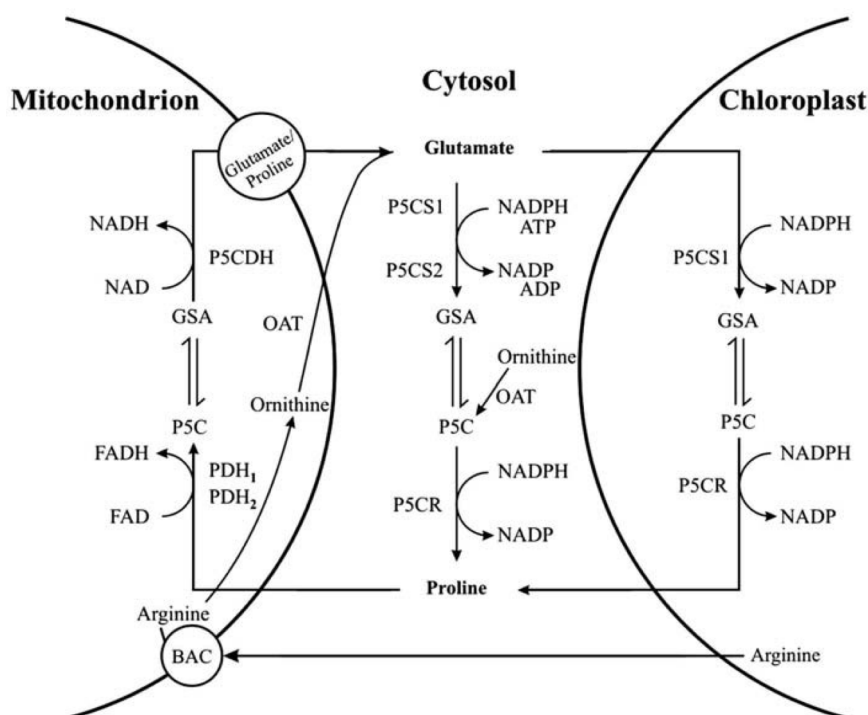
ภาพที่ 7 กระบวนการออกซิเดชันของไขมัน และสังเคราะห์ MDA อันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์พืช (Gill and Tuteja, 2010)



ภาพที่ 8 การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Ayala *et al.*, 2014)

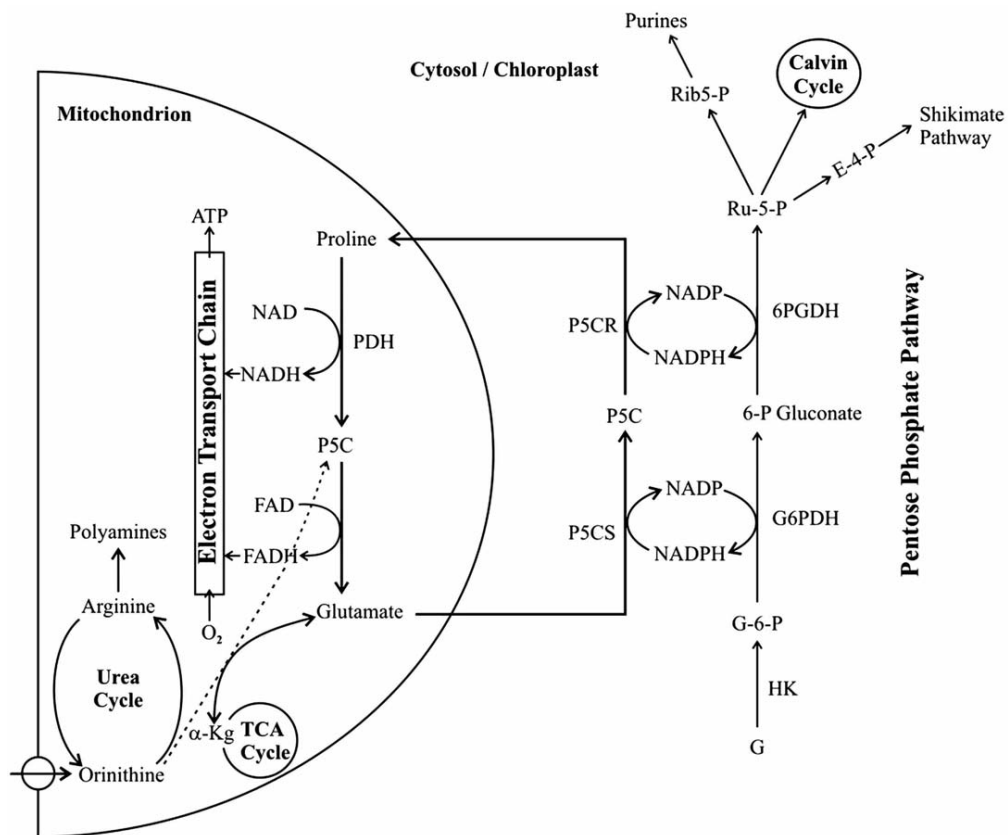
อย่างไรก็ตาม ROS และ MDA มีความเกี่ยวข้องกับการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ โดยหนึ่งในเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งเร้าต่างๆคือ mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Liu *et al.*, 2018) สามารถพบในกลุ่มของยูคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ จากการศึกษาในข้าวโพด (*Zea mays* L. cv. Nongda 108) พบว่าโลหะหนักทองแดงความเข้มข้น 10 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีน *MAPK3* พร้อมกันกับการเพิ่มปริมาณของ ROS และการเพิ่มปริมาณ MDA อย่างมีนัยสำคัญ (Liu *et al.*, 2018) นอกจากนี้การศึกษาในข้าวโดย Marreiro และคณะ (2017) มีการรายงานว่าสังกะสีความเข้มข้น 10-100 ไมโครโมลาร์ ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *MAPK3* สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ ROS และการทำงานของซิงค์ ทรานสปอร์ตเตอร์ 14 (zinc-transporter; ZIP 14)

กรดอะมิโนโพรลีน (proline; Pro) จัดเป็นหนึ่งในโครงสร้างคาร์บอน (carbon's skeleton structure) ที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) (Hayat *et al.*, 2012; Chun *et al.*, 2018) ที่ผลิตจากสารกลูตาเมต (L-glutamate) และยูเรีย (urea) (Hayat *et al.*, 2012) และสังเคราะห์ผ่าน glutamate pathway โดยใช้สารกลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นสาร 1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) โดยเอนไซม์ 1,1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) และ reductase (P5CR) ในส่วนของคลอโรพลาสต์หรือไซโตซอล หรือ ornithine pathway โดยการสังเคราะห์โพรลีนผ่านสาร ornithine บริเวณไมโทคอนเดรีย ซึ่งเชื่อมโยงกับการวัฏจักรการสลายน้ำตาลเพนโตส (pentose phosphate pathway) (ภาพที่ 9) (Kaur and Asthir 2015) หรือการสลายสารกลูตาเมต-กลูตามีน (glutamate-glutamine metabolism) Kaur และ Asthir (2015) รายงานระดับปริมาณของโพรลีนในเซลล์ของพืชพบว่าในสภาวะปกติ พืชจะสังเคราะห์โพรลีนเพียง 5% แต่เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะเพิ่มการสังเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าวเป็น 80% ของกิจกรรมทั้งหมดของเซลล์



ภาพที่ 9 การสังเคราะห์และสลายกรดอะมิโนโพรลีนจากบริเวณต่างๆของเซลล์พืช เช่น คลอโรพลาสต์ ไซโตซอล ไมโทคอนเดรีย (Kaur and Asthir, 2015)

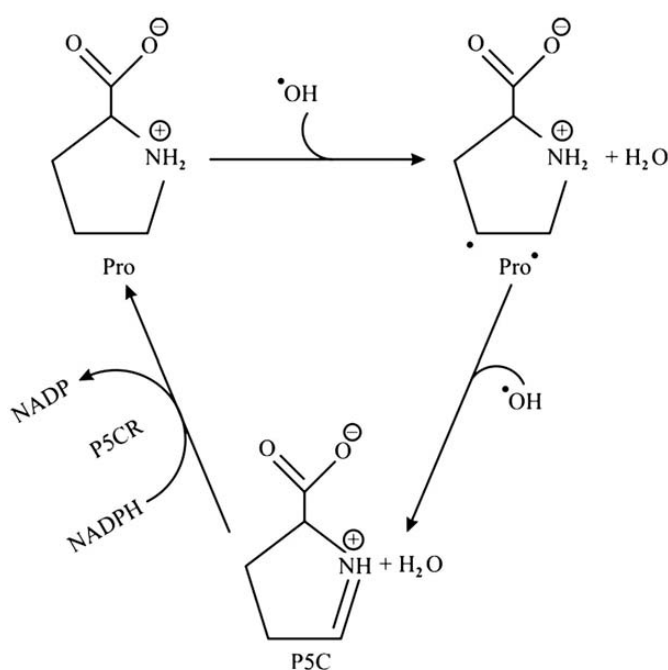
จากการศึกษาอื่นๆ มีการเสนอว่ากรดอะมิโนโพรลีนมีบทบาทช่วยในการทนสภาวะเครียดที่หลากหลาย เช่น ในสภาวะแล้ง ภาวะเสียสมดุลของไอออนโซเดียม/โพแทสเซียมภายในเซลล์ (Na^+/K^+ equilibrium of osmoregulation) สภาวะเครียดเนื่องมาจากเกลือ และการปนเปื้อนโลหะหนัก เนื่องจากมักจะพบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีน และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนโพรลีนในสภาวะเครียดดังกล่าว (Alla and Saradhi, 1991; Mehta and Gaur, 1999; Cushman, 2001; Chondhary *et al.*, 2007; Dar *et al.*, 2016; Aslam *et al.*, 2017; Chun *et al.*, 2018) โดยมีการเสนอว่ากรดอะมิโนโพรลีนทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (ETC) ในไมโทคอนเดรีย ด้วยการเติม H^+ ให้กับ NAD และ FAD เป็น NADH และ FADH ตามลำดับ (Kaur and Asthir, 2015) อีกทั้งมีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพในการสลายน้ำตาลเพนโตสและวัฏจักรเครปส์ (tricarboxylic acid; TCA) ด้วยการเติม H^+ ให้กับ NADP เป็น NADPH ในกระบวนการสลายกลูโคสเป็นน้ำตาลไรบูลอส-5-ฟอสเฟต (ribulose-5-phosphate) ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของวัฏจักรคาลวิน (ภาพที่ 10) (Kaur and Asthir, 2015)



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ของวิถีสังเคราะห์/สลายกรดอะมิโนโพรลีน กับการสลายน้ำตาลเพนโตส วิถีจักร TCA วิถีจักรยูเรีย และกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (ETC) (Kaur and Asthir, 2015)

นอกจากนี้กรดอะมิโนโพรลีนยังมีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถช่วยยับยั้งการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (ROS) โดยการจับของพันธะไฮโดรเจนกับไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; OH) โดยไฮโดรเจนไอออนนั้นจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของโพรลีนกลายเป็นโพรลีนเรดิคัล (proline radical) และโมเลกุลดังกล่าวสามารถถูกสลายได้ด้วยเอนไซม์ P5CR ในส่วนของไซโตซอลและคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 11) (Du *et al.*, 2014; Shahab *et al.*, 2012; Kaur and Asthir, 2015; Elewa *et al.*, 2017; Aswani *et al.*, 2018) จากการศึกษาของ Radic และคณะ (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีนกับปริมาณ ROS ในพืชชนิด *Lemna minor* L. ที่ได้รับสังกะสี 0.15 และ 0.30 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน พบว่าการเพิ่มขึ้นของโพรลีนสามารถลดปริมาณของ H₂O₂ ในทุกชุดการทดลอง สอดคล้องกับการศึกษาการ

ลดลงของ ROS และการเพิ่มขึ้นของโพรลีนในข้าว (*Oryza sativa* cv. Taichung Native 1) ที่ได้รับทองแดง 0.2-1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อเติม L-proline 1.0 นอร์มอลสามารถยับยั้งการเกิด ROS ได้ภายใน 96 ชั่วโมง (Chen *et al.*, 2004) เช่นเดียวกัน Theriappan และคณะ (2011) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและการสะสมของกรดอะมิโนในพืชชนิด *Brassica oleracea* var. botrytis ที่ได้รับโลหะหนัก ปรอท แคดเมียม และสังกะสี ความเข้มข้น 50-1,000 ไมโครโมลาร์ พบว่าในชุดการทดลองที่ให้ปรอท แคดเมียม และสังกะสี ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ทำให้ลดจำนวนและความยาวราก และอัตราการงอกของเมล็ด และที่สำคัญเพิ่มการสะสมของโพรลีนในช่วง 100-500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด นอกจากนี้การศึกษาของ Ikram และคณะ (2017) ทำการศึกษาในพืชชนิด *Atriplex canescens* (Pursh) ด้วยการให้โลหะหนักทองแดง ความเข้มข้น 2,000 2,500 3,000 และ 3,500 ppm และสังกะสีความเข้มข้น 2,500 5,000 7,500 และ 10,000 ppm พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีนสูงสุดในพืชดังกล่าว 74.45 และ 46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชุดการเติมทองแดง และสังกะสีตามลำดับ



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนโพรลีนกับการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ (Kaur and Asthir, 2015)

นอกจากนี้โพรตีนยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้แก่ กลุ่มสารกลูตาไธโอน (GSH) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ของไฟโตคิเลติน (PC) ซึ่งทำหน้าที่กำจัดพิษของโลหะหนักอีกต่อหนึ่ง (Mehta and Gaur, 1999; Siripornadulsil *et al.*, 2002; Deuschle *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2013; Amini *et al.*, 2015) จึงสามารถลดความเป็นพิษภายในเซลล์ และการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Ozden *et al.*, 2009; Murmu *et al.*, 2017) การศึกษาปริมาณการสะสมของโพรตีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิด *Cymbopogon flexuosus* Stapf. เมื่อดูดซับโลหะหนักทองแดง นิกเกิล และสังกะสี ความเข้มข้น 50-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรตีน และสารต้านอนุมูลอิสระ GSH ในทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ (Handique and Handique, 2009)

การตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่ายขนาดเล็กต่อโลหะหนัก

สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารเองได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถพบได้ทั้งน้ำเค็ม และระบบนิเวศน้ำจืด และมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงที่คล้ายคลึงกับพืชบก และมีความสามารถในการดูดซึมโลหะหนักและทนพิษโลหะหนักได้ดี จัดว่าเป็นทางเลือกหนึ่งในการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณของโลหะหนักให้น้อยลงได้ ทั้งนี้ข้อดีของการลดปริมาณโลหะหนักด้วยสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ได้แก่ ช่วยลดปริมาณของโลหะหนักอย่างรวดเร็ว (Rub *et al.*, 2006) ประหยัดเวลาในการบำบัด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้งานง่าย ควบคุมปริมาณง่าย และลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษได้มาก (Rub *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2012) เมื่อสาหร่ายถูกกระตุ้นด้วยโลหะหนักพบว่ามีโปรตีนที่จำเพาะต่อการส่งสัญญาณจับกับตัวรับของไอออนของโลหะหนัก มีการสะสมปริมาณโลหะหนักภายในส่วนประกอบของเซลล์สาหร่าย เช่น คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และแวกคูลอล ผ่านช่องทางต่างๆ เช่น ZIP transporter HMA ATPase (Burleigh *et al.*, 2003; Grotz and Guerinot, 2006; Monteiro *et al.*, 2012) และรวมเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนเรียกว่า organometallic complex ซึ่งจะสะสมในเซนทรัลแวคิวโอล และแพร่กระจายภายในไซโตพลาสซึม (Perales *et al.*, 2006; Huiling *et al.*, 2012; Shahab *et al.*, 2012; Miazek *et al.*, 2015) โดยสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการสร้างโมเลกุลดังกล่าวไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสาหร่ายนั้นๆ ด้วย (Perales *et al.*, 2006) นอกจากนี้ผล

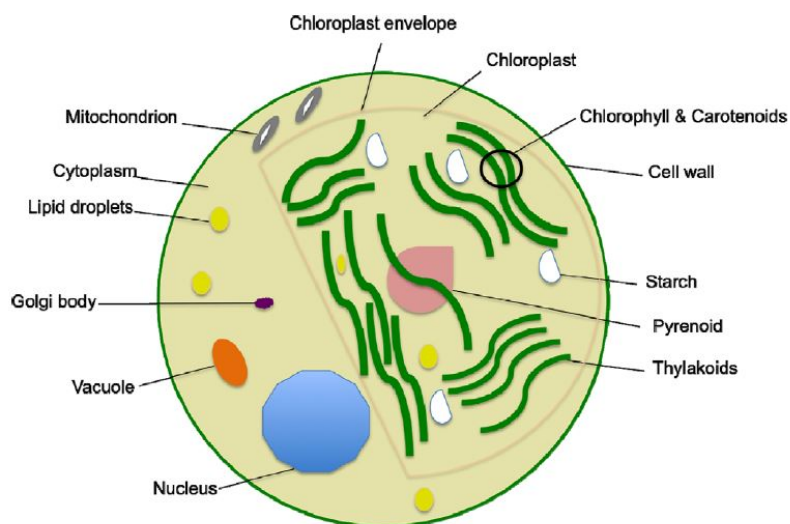
ของทองแดง และสังกะสีสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เพิ่มปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (ROS activity) เพิ่มการออกซิเดชันของไขมัน (LPO) และสารกลุ่มไฟโตคีเลตินบางชนิด (Lim *et al.*, 2006) ที่สำคัญมีการสะสมกรดอะมิโนโพรลีนภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก (Perales *et al.*, 2006)

จากการทบทวนเอกสารของ Kumar และคณะ (2015) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างทองแดง และสังกะสีกับสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กพบว่า มีการรายงานการใช้สาหร่ายขนาดเล็กชนิดต่างๆ เช่น *Chlorella vulgaris* (Chu and Hashim, 2004; Afkar *et al.*, 2010; Huiling *et al.*, 2012; Jakaityte *et al.*, 2014) *Scenedesmus quadricauda* var *quadrispina* (Shahab *et al.*, 2012) *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39 (Saavedra *et al.*, 2018) *Dunaliella tertiolecta* (Lim *et al.*, 2006) *Oocystis nephrocytioides* (Juneau *et al.*, 2002) *Scenedesmus obliquus* (Din *et al.*, 2009) *Selenastrum capricornutum* (Plekhanov and Chemeris, 2003; Afkar *et al.*, 2010) *Tetraselmis suecica* (Lim *et al.*, 2006) *Zygnema* sp. (Hernandez, 2016) เป็นโมเดลในการศึกษาการตอบสนองต่อโลหะหนัก เช่น การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง การเกิดสารอนุมูลอิสระ และการสะสมกรดอะมิโนโพรลีน

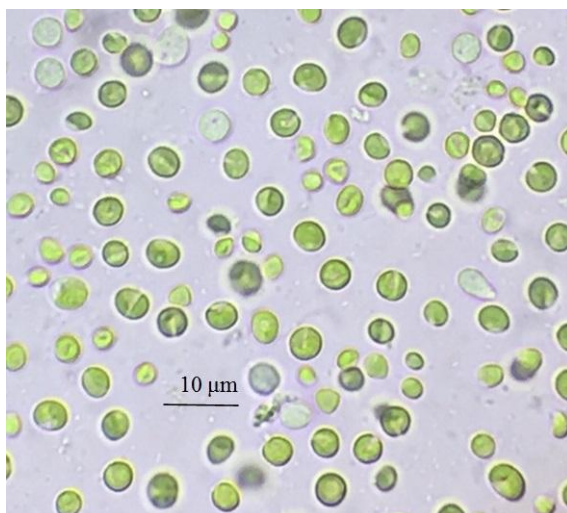
สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* Beijerinck

สาหร่ายสีเขียวสกุล *Chlorella* มีลักษณะรูปทรงกลม ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) เคลื่อนที่ไม่ได้ เป็นสาหร่ายในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว สามารถพบได้ทั้งน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำกร่อย ส่วนประกอบของรงควัตถุของสาหร่ายเป็นสารชนิดเดียวกับที่พบในกลุ่มพืชชั้นสูง คือมี คลอโรฟิลล์ เอ บี และกลุ่มแซนโทฟิลล์ โดยมีผนังเซลล์หนาและแข็ง 3 ชั้นโดยผนังชั้นนอกสุดจะเป็นเมือก (mucilage) ประกอบด้วยกลุ่มสารพอลิเมอร์ เช่น โปรตีน ทำหน้าที่ในการจับกับโลหะหรือสารพิษได้อย่างรวดเร็ว ผนังชั้นกลางหนาที่สุดเป็นสารกลุ่มเพคโตส ประกอบด้วยสารเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ส่วนผนังชั้นในสุดเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์อีกหนึ่งชั้น ภายในประกอบด้วยคลอโรพลาสต์มีลักษณะต่างๆ เช่นรูปถ้วย (cup-shaped) เป็นวงรอบ และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 1 อันภายในเซลล์ อาหารสะสมของสาหร่ายชนิดนี้ จะสะสมในรูปของแป้งจะสะสมในส่วนของ ไพรินอยด์ ซึ่งประกอบด้วย อะไมเลส และอะไมเพคติน ไพรินอยด์ของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่บนคลอโรพลาสต์ เมื่อสาหร่ายมีการ

สะสมแป้งจะมีการเปลี่ยนแปลงแป้งเป็นการสะสมไขมัน (oil droplet) ซึ่งจะกระจายอยู่ทั่วของเซลล์ของสาหร่าย (ภาพที่ 12) (ลัดดา, 2543; Safi *et al.*, 2014)



a



b

ภาพที่ 12 a โมเดลส่วนประกอบภายในของสาหร่ายขนาดเล็กสกุล *Chlorella* (Safi *et al.*, 2014)

b ภาพถ่ายสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Ramaraj *et al.*, 2016)

จากการศึกษาของ Monteiro และคณะ (2012) อธิบายการจับพันระของผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Chlorella* sp. กับโลหะหนักได้หลายชนิด ทั้งแบบมีชีวิต (active

living) และไม่มีชีวิต (non-living) สามารถช่วยทำให้ปริมาณการปนเปื้อนของปริมาณโลหะหนัก ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการทบทวนเอกสารของ Brinza และคณะ (2007) ที่รายงานว่า สาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดรวมถึง *C. vulgaris* มีความสามารถในการลดปริมาณโลหะหนัก เช่น สังกะสี โคบอลต์ ทองแดง แมงกานีส นิกเกิล วาเลียม เหล็ก แคดเมียม พรอท และอะลูมิเนียม สอดคล้องกับการรายงานของ Alam และคณะ (2014) ที่พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella* sp. สามารถลดปริมาณของสังกะสีได้มากกว่า 80 % ในระยะเวลา 3 วัน และการศึกษาของ Rub และคณะ (2006) ที่พบว่าสาหร่ายชนิด *C. vulgaris* สามารถดูดซับโลหะหนักได้เร็วกว่าชุดควบคุม 3.5 เท่าในสภาวะการนำไฟฟ้าภายในเซลล์ และค่าการเติบโต อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ ทองแดงและสังกะสีที่สูงขึ้นอาจเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hamed และคณะ (2017) ศึกษาการเจริญเติบโต สภาวะการเครียด และ ปริมาณสารอนุมูลอิสระ จากการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวชนิด *C. sorokiniana* และ *Scenedesmus acuminatus* ด้วยความเข้มข้นของสังกะสีที่ 0.1 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายทั้งสองชนิดมี อัตราการเติบโตที่ลดลง พิจารณาจากปริมาณของอัตราส่วนของคลอโรฟิลล์ เอ และ บี และพบว่าชนิด ของสาหร่ายก็มีผลต่อการทนต่อโลหะหนักได้ด้วยเช่นกัน กล่าวคือสาหร่ายชนิด *C. sorokiniana* มีความทนมากกว่า *S. acuminatus* อย่างมีนัยสำคัญ Huiling และคณะ (2012) ศึกษาความทนของ สาหร่ายขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* เมื่อได้รับการเพิ่มขึ้นของทองแดง โครเมียม สังกะสี แคดเมียม และพรอทที่ความเข้มข้น 0.05 0.5 และ 5 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของโลหะหนัก 5 ไมโคร โมลาร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนี้การศึกษาของ Kondzior และ Butarewicz (2018) ศึกษาความสัมพันธ์ของทองแดงและสังกะสี กับประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี และแคโรทีนอยด์ ในสาหร่ายชนิด *C. vulgaris* พบว่าทองแดงและสังกะสี 0.15 และ 100 มิลลิ โมลาร์ สามารถลดปริมาณ รงวัตถุที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ถึงร้อยละ 67 และ 53 ตามลำดับ

บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. เชื้อตั้งต้น

สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* Beyerinck. NIES คัดแยกจากห้องปฏิบัติการวิจัย The National Institute for Environmental Studies ประเทศญี่ปุ่น

2. อุปกรณ์ และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

- 2.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 2.2 เครื่องเขย่าสาหร่ายแบบหมุนพร้อมตัวยึด
- 2.3 หลอดไฟกำเนิดแสง
- 2.4 กระจกชอลูมิเนียม และหนังยางรัด
- 2.5 หัวเชื้อสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 2.6 stock solution ของโลหะหนักชนิดทองแดง และสังกะสี (ภาคผนวก)

3. อุปกรณ์ และสารเคมีใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักสะสมภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

- 3.1 หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) แบบพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร
- 3.2 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (optical mission spectrometer) รุ่น iCAP 7400, บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Rotofix 32 A, บริษัท Hettich, ประเทศเยอรมัน

3.4 โพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ (KNO_3)

3.5 กรดเอททิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติกความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก

4.1 หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) แบบพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร

4.2 เครื่อง Pulsed Amplitude Modulate Fluorometer (PAM) รุ่น Mini-PAM, บริษัท Walz, ประเทศเยอรมัน

4.3 ปิเปตดูดสารแบบอัตโนมัติ (autopipette)

5. อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวัดคลอโรฟิลล์ เอ

5.1 90% อะซิโตน (acetone)

5.2 หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) แบบพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร

5.3 ไมโครเพลต (microplate) ขนาด 96 ช่อง

5.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น V1710, บริษัท Yoke, ประเทศจีน

5.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Rotofix 32 A, บริษัท Hettich, ประเทศเยอรมัน

5.6 ปิเปตดูดสารแบบอัตโนมัติ (autopipette)

5.7 กระบอกลูกทวง (cylinder)

6. อุปกรณ์ และสารเคมีในการวัดปริมาณของอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Relative Oxygen Species; ROS)

6.1 หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) แบบพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร

- 6.2 เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) รุ่น Spectrofluorometer FP-8200, บริษัท Jasco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6.3 เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก รุ่น Benchtop Ultrasonic Cleaners, บริษัท Crest, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Rotofix 32 A, บริษัท Hettich, ประเทศเยอรมัน
- 6.5 ปิเปตดูดสารแบบอัตโนมัติ (autopipette)
- 6.6 สารละลาย Tris-HCl buffer pH 7.0 (ภาคผนวก)
- 6.7 สารละลาย 5- (and -6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, (CDFH-DA)

7. อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation; LPO)

- 7.1 หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) แบบพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร
- 7.2 เครื่องต้มน้ำแบบปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ (water bath) รุ่น Water Bath GP 20, บริษัท Thermo Scientific Precision, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Rotofix 32 A, บริษัท Hettich, ประเทศเยอรมัน
- 7.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น V1710, บริษัท Yoke, ประเทศจีน
- 7.5 กรดไทรคลอโรอะซีติก 1% (thichloacetic acid; TCA)
- 7.6 กรดไทโอบาบริก 0.1% (thiobarbituric acid; TBA)
- 7.7 บูทีเรท ไฮดรอกซีทูลูอิน 0.05% (butyrated hydroxytoluene; BHT)

8. อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนโพรลีน

- 8.1 หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) แบบพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร
- 8.2 เครื่องต้มน้ำแบบปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ (water bath) รุ่น Water Bath GP 20, บริษัท Thermo Scientific Precision, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Rotofix 32 A, บริษัท Hettich, ประเทศเยอรมัน
- 8.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น V1710, บริษัท Yoke, ประเทศจีน
- 8.5 ตู้ดูดควัน
- 8.6 ปิเปตดูดสารแบบอัตโนมัติ (autopipette)
- 8.7 หลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร
- 8.8 เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก รุ่น Benchtop Ultrasonic Cleaners, บริษัท Crest, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8.9 กรดซัลโฟซาลิไซลิก 3% (v/v) (sulfosalicylic acid)
- 8.10 สารผสมของกรดนินไฮดริน (ninhydrin mixture)
- 8.11 สารละลายโทลูอีน (toluene)

9. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Jaworski's Medium (JM) (Schlösser, 1982)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.24	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0	กรัมต่อลิตร
NaHCO_3	1.59	กรัมต่อลิตร
EDTA Fe Na	0.225	กรัมต่อลิตร
EDTA Na_2	0.225	กรัมต่อลิตร
H_3BO_3	0.248	กรัมต่อลิตร
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.139	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
Vitamin B12	0.004	กรัมต่อลิตร
Thiamine HCl (Vitamin B1)	0.004	กรัมต่อลิตร
Biotin	0.004	กรัมต่อลิตร
NaNO_3	8.0	กรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.6	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 นอร์มอล KOH

วิธีการทำการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris*

1.1 เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์เดี่ยวจากห้องปฏิบัติการ มาขยายให้ได้ปริมาณมากเพียงพอต่อการเป็นหัวเชื้อโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวชนิด JM สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย

1.2 นำสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากหัวเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวชนิด Jaworski's medium (JM) ผ่านการฆ่าเชื้อ ปรับพีเอช 7.5-8.0 (Chu and Hashim, 2004; Afkar *et al.*, 2010) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และวางไว้บนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้แสงสีขาวจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสง 25 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 24- 27 องศาเซลเซียส (Lim *et al.*, 2006) ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน (04.00-22.00)

2. ขั้นตอนการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายโลหะหนัก

เตรียม Stock solution ของโลหะหนัก โดยตัวแทนของ ทองแดง (Cu) ใช้สารคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, มวลโมเลกุล = 159.109 กรัมต่อโมล) และใช้ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2 , มวลโมเลกุล = 136.315 กรัมต่อโมล) เป็นตัวแทนของ สังกะสี (Zn) เตรียมที่ความเข้มข้นของสาร 1 โมลาร์

2.2 วิธีการทดลอง

เติมหัวเชื้อสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร เริ่มต้นเท่ากับ 0.50 ซึ่งใช้หัวเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายโลหะหนักทองแดง และสังกะสี ในระยะ exponential (วันที่ 7-8 ของการทดลอง) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 9 ชุดการทดลอง โดยในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

ตาราง 3 ชุดการทดลองการเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสี ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับขนาดเล็ก

ชุดทดลอง	ชุดการทดลอง
ชุดควบคุม	<i>C. vulgaris</i> + JM
2	<i>C. vulgaris</i> + JM + สังกะสี 125 ไมโครโมลาร์
3	<i>C. vulgaris</i> + JM + สังกะสี 250 ไมโครโมลาร์
4	<i>C. vulgaris</i> + JM + สังกะสี 500 ไมโครโมลาร์
5	<i>C. vulgaris</i> + JM + สังกะสี 1,000 ไมโครโมลาร์
6	<i>C. vulgaris</i> + JM + ทองแดง 125 ไมโครโมลาร์
7	<i>C. vulgaris</i> + JM + ทองแดง 250 ไมโครโมลาร์
8	<i>C. vulgaris</i> + JM + ทองแดง 500 ไมโครโมลาร์
9	<i>C. vulgaris</i> + JM + ทองแดง 1,000 ไมโครโมลาร์

2.3 การวัดปริมาณของทองแดงและสังกะสีสะสมในเซลล์สำหรับขนาดเล็ก

ทำการศึกษาด้วยการเก็บตัวอย่างสาหร่ายในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้น) วันที่ 5 (สิ้นสุด) วัดปริมาณของทองแดงและสังกะสี ดัดแปลงจาก Franklin และคณะ (2003) และ Grima และคณะ (2003) ด้วยเครื่องมือ Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP – OES) ดูดตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 80 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการทิ้งสารละลายส่วนใส เติมกรดโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้น 0.90 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร และ EDTA 0.02 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร และทำการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำวิเคราะห์ตัวอย่าง ณ ห้องปฏิบัติการกลางวิทยาศาสตร์ หน่วยเครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนำค่ามาคำนวณเป็นอัตราส่วนต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์ *เอ*

2.4 การวัดค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง

วัดค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ชั่วโมงที่ 0 6 12 วันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ ดูดตัวอย่างสาหร่ายปริมาณ 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาดปริมาตร 2 มิลลิลิตร วัดค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงด้วย Pulsed Amplitude Modulate Fluorometer โดยวัดค่า Effective Quantum Yield (Φ_{PSII}) และ ค่า Maximum Quantum Yield (F_v/F_m) ค่าที่ได้สามารถใช้เป็นค่าประมาณอัตราการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากระบบแสงที่สอง และตัวชี้วัดความเสียหายของระบบแสงได้ตามลำดับ

2.5 การวัดปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ

คลอโรฟิลล์ เอ เป็นค่าพารามิเตอร์ซึ่งสามารถใช้เป็นค่าประมาณมวลชีวภาพของสาหร่ายขนาดเล็กได้ วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Wintermans และ De Mots (1965) เก็บตัวอย่างสาหร่ายในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้น) เปรียบเทียบกับวันที่ 5 (สิ้นสุด) ดูดสาหร่ายปริมาณ 5 มิลลิลิตรและนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที หิ้งสารละลายใส เติมสารละลาย อะซิโตน 90% (acetone) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาที คัดนำส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 645 665 และ 750 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ หน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร จากสมการ (Saijo, 1975)

$$\text{ปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{11.6(A_{665}) - 0.14(A_{630}) - 1.31(A_{645}) \times 1,000}{\text{ปริมาตรของสาหร่ายตัวอย่าง(มิลลิลิตร)}}$$

2.6 การวัดปริมาณของอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวในสาหร่ายขนาดเล็ก (Relative Oxygen Species; ROS)

เริ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายเปรียบเทียบระหว่างชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้น) และวันที่ 5 (สิ้นสุด) วิเคราะห์ปริมาณ reactive oxygen species โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sun และคณะ (2006) ตูดตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตรและนำไปหมუნเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ังสารละลายไส เต็ม บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปหมუნเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนไสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เต็มสารละลาย CDFH-DA 2 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรทิ้งไว้ในที่มืด 10-15 นาที และนำไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ค่าการกระตุ้น (excitation) 488 นาโนเมตร และค่าปลดปล่อย (emission) ที่ 525 นาโนเมตร จากนั้นนำค่ามาคำนวณเป็นอัตราส่วนต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ

2.6 การวัดปริมาณของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation; LPO)

เริ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายเปรียบเทียบระหว่างชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้น) และวันที่ 5 (สิ้นสุด) วิเคราะห์การเกิดออกซิเดชันของไขมันโดยดัดแปลงจากวิธีของ Senevirathne และคณะ (2006) ตูดตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตรและนำไปหมუნเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่ังสารละลายไส เต็มสารละลายกรดไตรโคอะซีติก 1% (Trichloacetic acid) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตก นำไปหมუნเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ตูดสารละลายไสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไทโอบาปีทูริก 0.1% (thiobarbituric acid) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ 0.05% บุติเรทไฮดรอกซีโทลูอิน (butyreted hydroxytoluene) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 นาที และแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณปริมาณของกรดมัลลอนอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) จากสมการ (Senevirathne *et al.* , 2006) และนำค่ามาคำนวณเป็นอัตราส่วนต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ

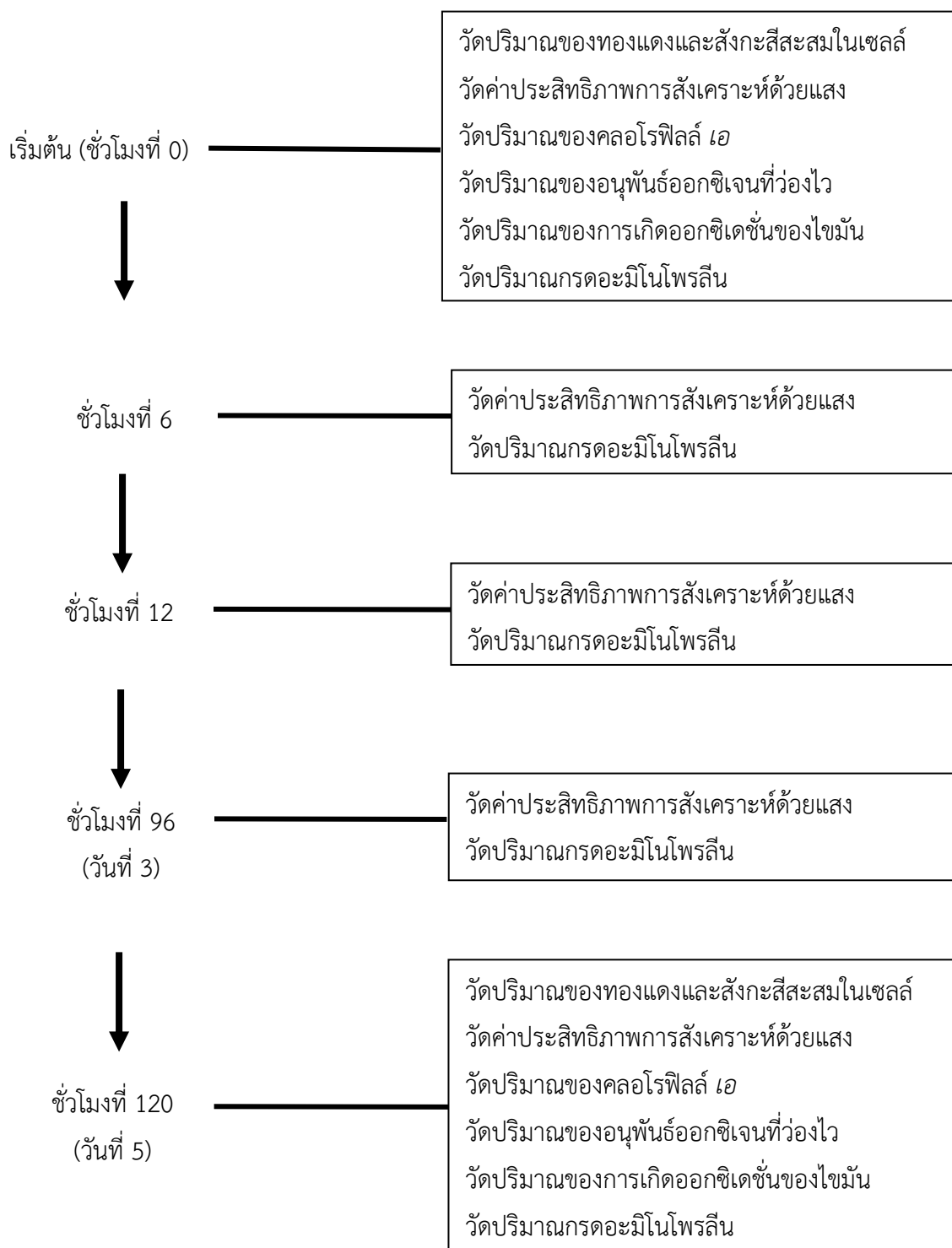
$$\text{ปริมาณ MDA (มิลลิโมลต่อลิตร)} = \frac{[\text{OD532-OD600}]}{115 \times 10^3}$$

2.7 การวัดปริมาณกรดอะมิโนโพรลีน

ทำการศึกษาด้วยการเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ วัดปริมาณของกรดอะมิโนโพรลีนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Bate และคณะ (1973) ดูดตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตรและนำไปหมუნเหวียงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการทิ้งส่วนใส จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลโฟซาลิซิลิก 3% (sulfosalicylic acid) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกและนำไปหมუნเหวียงเพื่อเก็บสารละลายใส่แยกไว้ในหลอดแก้ว เติมสารละลายผสมของนินไฮดริน (ninhydrin mixture) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายดังกล่าวแช่ไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที และเติมสารโทลูอีน (toluene) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรจะได้ชั้นสารละลายสีชมพูอ่อน และนำชั้นดังกล่าวไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรและนำมาเทียบปริมาณของกรดอะมิโนโพรลีนจากสารมาตรฐาน (proline standard) และนำค่ามาคำนวณเป็นอัตราส่วนต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ

2.8 การทดสอบทางสถิติ

ทำการทดสอบผลการศึกษาทางสถิติด้วยโปรแกรม STATISTICA Academic (StatSoft Inc., 2011) ดำเนินการจัดรูปแบบการกระจายข้อมูลแบบปกติ ศึกษาอิทธิพลของโลหะหนักทองแดง และสังกะสี ต่อสาหร่ายขนาดเล็ก และเวลาการเพาะเลี้ยง จากการทดลองวัดค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง และการศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนโพรลีนที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี repeated ANOVA และ ANCOVA (Woodrow, 2014) ผลของการสะสมโลหะหนักภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก ปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณของอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไวในสาหร่ายขนาดเล็ก และปริมาณของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ทำการทดสอบสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05



ภาพที่ 13 แผนภาพสรุปวิธีการทดลองของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กโดยเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 3

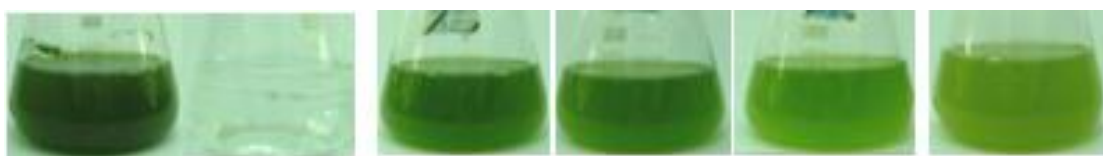
ผลการศึกษา

1. การวิเคราะห์คุณลักษณะทั่วไปของชุดการทดลอง

จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีบางประการของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการเติมทองแดงและสังกะสี เมื่อสังเกตสีของของเหลวแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทั้งชนิด และความเข้มข้นของโลหะหนักที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าชุดการทดลองเติมทองแดงจะมีสีเขียวอ่อนลงมากขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของทองแดงมากขึ้น ต่างจากชุดการทดลองเติมสังกะสีพบว่ามีสีเขียวเมื่อเทียบกับชุดอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน JM media (ภาพที่ 14) ไม่มีกลิ่น มีค่าการนำไฟฟ้าระหว่าง 30.2-37.3 (ชุดเติมทองแดง) 32.2-37.1 (ชุดเติมสังกะสี) มิลลิโวลต์ และมีค่าเป็นกรดเบสช่วง 6.70-7.05 (ชุดเติมทองแดง) 7.15-7.65 (ชุดเติมสังกะสี) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าการนำไฟฟ้า ความเป็นกรดเบส และความเค็ม พบว่าทั้งชุดเติมทองแดงและสังกะสีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p < 0.05$, one way ANOVA) (ตาราง 4)



อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ทองแดง 125 μM ทองแดง 250 μM ทองแดง 500 μM ทองแดง 1,000 μM
+ สาหร่าย



อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ สังกะสี 125 μM สังกะสี 250 μM สังกะสี 500 μM สังกะสี 1,000 μM
+ สาหร่าย

ภาพที่ 14 ชุดการทดลองเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสี ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อผ่านไป 5 วัน หลังการเติมโลหะหนักเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตาราง 4 คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีบางประการของชุดการทดลองเติมโลหะหนักทองแดง และสังกะสี เมื่อผ่านไป 5 วันหลังการเติมโลหะหนักเปรียบเทียบกับชุดอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน JM ($n=12$; ค่าเฉลี่ย \pm SE)

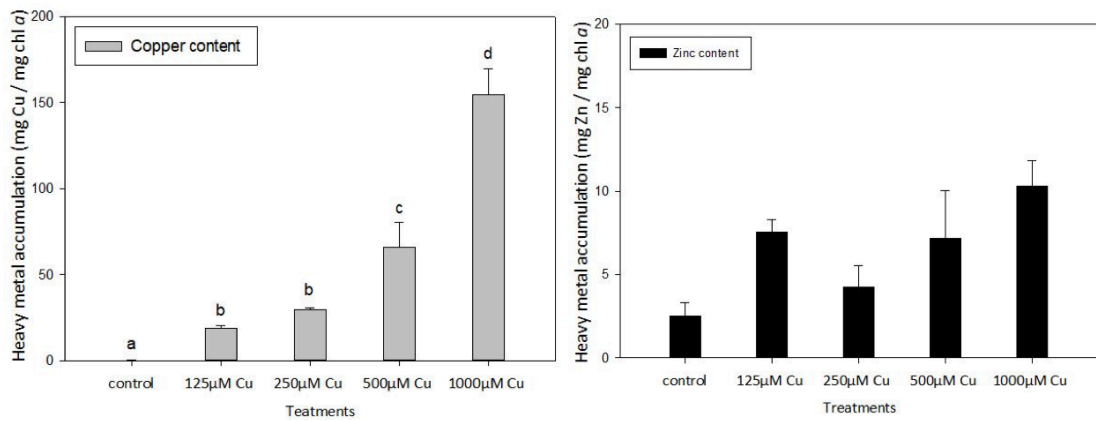
หมายเหตุ ตัวอักษร แทนความแตกต่างของชุดข้อมูลเมื่อเทียบกับสถิติ one-way ANOVA, $\alpha = 0.05$

สมบัติของน้ำตัวอย่าง	สูตรอาหาร JM ชุดควบคุม	ชุดการทดลองเติม สังกะสี	ชุดการทดลองเติม ทองแดง
สีของน้ำ	เขียวเข้ม	เขียว	เหลืองอ่อน
กลิ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี
ความเป็นกรด-เบส	7.78 \pm 0.03 ^a	7.26 \pm 0.03 ^{ab}	6.97 \pm 0.12 ^b
ค่าการนำไฟฟ้า (mV)	21.33 \pm 0.41 ^a	35.83 \pm 0.36 ^b	33.43 \pm 0.87 ^b
ความเค็ม (ppm)	242 \pm 0.17 ^a	271 \pm 0.93 ^b	281 \pm 3.43 ^c

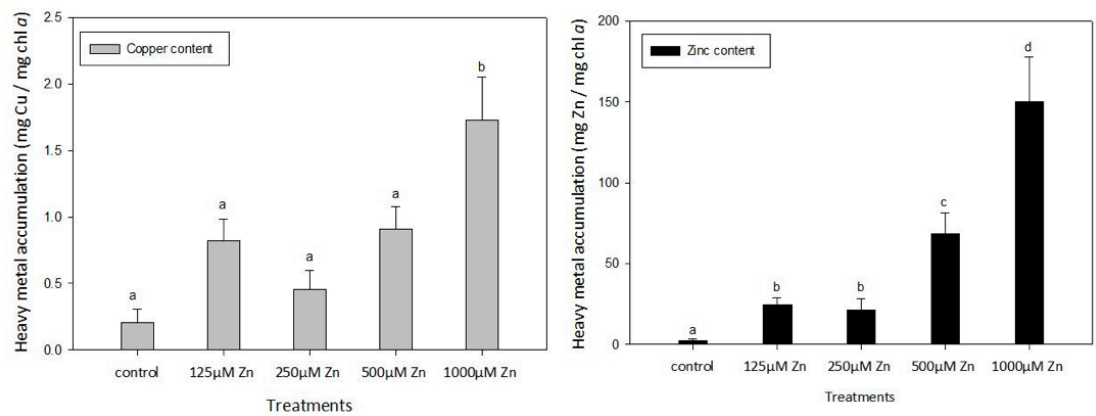
2. การศึกษาปริมาณของทองแดงและสังกะสีสะสมในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* มีการสะสมโลหะหนักทองแดง และสังกะสีภายในเซลล์แปรผันตามความเข้มข้นของโลหะหนักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, one-way ANOVA, ภาพที่ 15) การสะสมปริมาณทองแดงเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองเติมทองแดงความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ และ 1,000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, LSD test) แต่จากการพิจารณาพบว่าการสะสมของโลหะหนักทองแดง ไม่ส่งผลต่อการดูดซึมโลหะหนักของสังกะสีแต่อย่างใด จากภาพที่ 15a พบว่าเมื่อชุดการเติมทองแดงมากขึ้นไม่ส่งผลต่อการสะสมของสังกะสี ในทิศทางเดียวกันการเพิ่มขึ้นของการสะสมสังกะสีภายในเซลล์สาหร่ายเพิ่มมากขึ้นและแปรผันตามความเข้มข้นของสังกะสีที่ให้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, one-way ANOVA, ภาพที่ 15) การสะสมของสังกะสีเพิ่มขึ้นในชุดการเติมสังกะสีความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ และ 1,000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, LSD test) แต่ที่น่าสนใจพบว่าชุดการทดลองเติมสังกะสี 1,000 ไมโครโมลาร์เหนี่ยวนำการดูดซึมของทองแดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 15b)

a.



b.

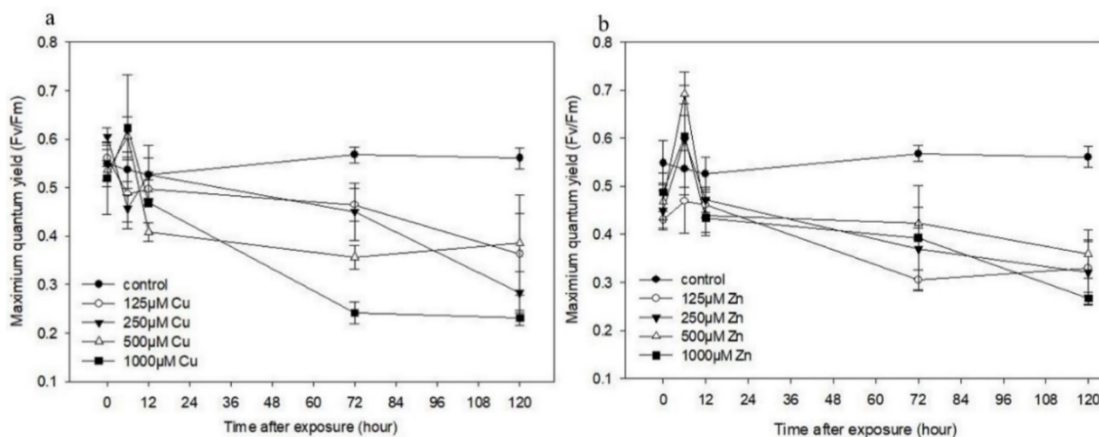


ภาพที่ 15 การสะสมโลหะหนักทองแดงและสังกะสี ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เมื่อเติมโลหะหนักทองแดงหรือสังกะสีในความเข้มข้นต่างๆ a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี หลังการทดลองผ่านไป 5 วันเมื่อเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($n=3$, ค่าเฉลี่ย \pm SE)

หมายเหตุ ตัวอักษร แทนความแตกต่างของชุดข้อมูลเมื่อเทียบกับสถิติ LSD test, $\alpha = 0.05$

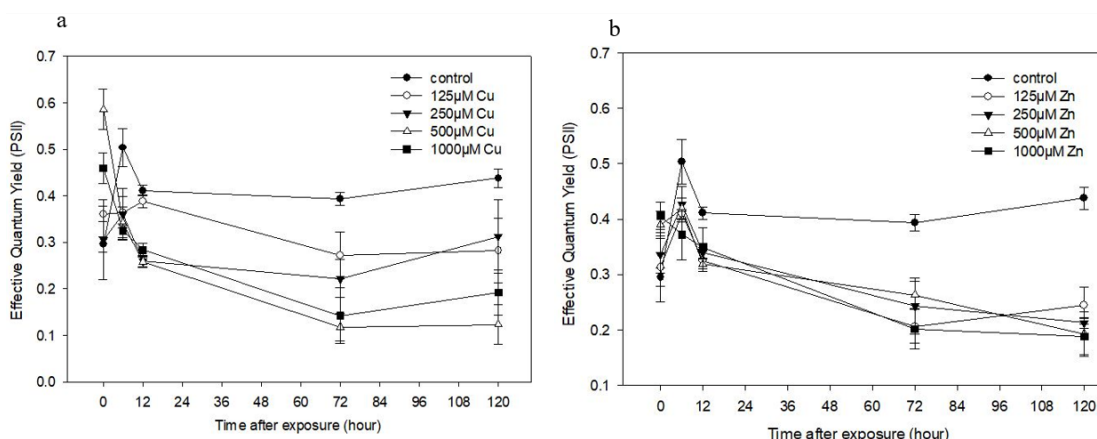
3. การศึกษาประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 ของการทดลอง พบว่าปฏิสัมพันธ์ของเวลาและความเข้มข้นของโลหะหนักส่งผลต่อประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (ภาพที่ 16 – 17) จากการศึกษาพบว่าค่าความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดในระบบแสงที่ 2 (maximum quantum yield of photosystem II, F_v/F_m) ในชุดการทดลองเติมทองแดง และสังกะสีพบว่ามีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, repeated ANOVA, ภาพที่ 16) แต่เมื่อทดสอบความแตกต่างของการถดถอยด้วยสถิติ ANCOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบการจับคู่พหุคูณพบว่าชุดที่เติมทองแดง (ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์) และสังกะสีมีค่าลดลงจากชุดควบคุมตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป ($p < 0.05$, LSD test) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 5) พบว่าชุดการทดลองเติมทองแดงทุกความเข้มข้น มีค่า F_v/F_m ต่ำกว่าชุดควบคุม ($p < 0.05$, LSD test) จากภาพ 16a และยังพบว่าในวันที่ 5 ของการทดลอง ชุดการทดลองเติมทองแดง 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ มีค่า F_v/F_m ต่ำที่สุด (ร้อยละ 55 เทียบกับชุดควบคุม) และชุดการทดลองที่เติมสังกะสีพบว่ามีค่าของ F_v/F_m มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ วันที่ 3 เป็นต้นไป เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 5) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นของสังกะสี (ร้อยละ 57 เทียบกับชุดควบคุม) (ภาพที่ 16b)



ภาพที่ 16 ค่าความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุดในระบบแสงที่ 2 (maximum quantum yield, Fv/Fm) ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เมื่อเติมโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่างกัน a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 หลังการเติมโลหะหนัก (n=3, ค่าเฉลี่ย±SE)

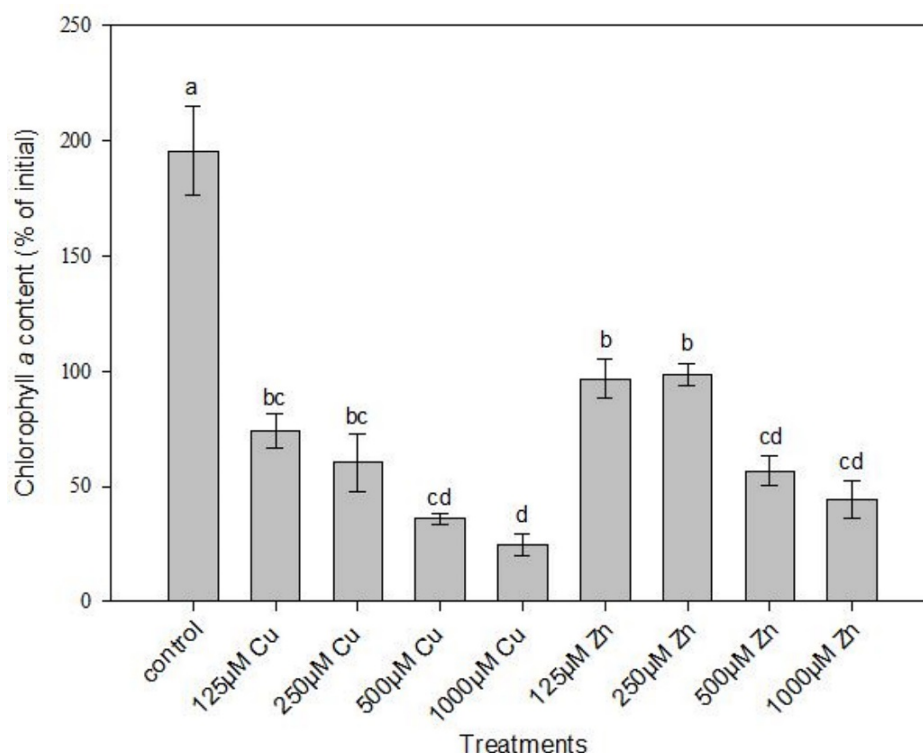
เมื่อศึกษาค่าประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 (effective quantum yield of photosystem II, Φ PSII) ในชุดการทดลองที่เติมทองแดงและสังกะสีพบว่าค่า Φ PSII ลดลงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, repeated ANOVA, ภาพที่ 17) แต่เมื่อทดสอบด้วยสถิติ ANCOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง ค่า Φ PSII มีการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับค่า Fv/Fm นั่นคือคือมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p < 0.05$, LSD test) จากภาพ 17a พบว่าค่า Φ PSII ชุดการเติมทองแดงทุกความเข้มข้นมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (72 ชั่วโมง) ($p < 0.05$, LSD test) ต่างจากชุดที่เติมสังกะสีที่มีการลดลงของค่า Φ PSII ณ ชั่วโมงที่ 12 (วันที่ 0) เป็นต้นไปซึ่งมีความต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, LSD test) (ภาพที่ 17b) และ ณ วันสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของ Φ PSII ทั้งชุดที่เติมทองแดง และสังกะสีมีค่าลดลงร้อยละ 52.09 และ 47.75 ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม



ภาพที่ 17 ค่าประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 (effective quantum yield of photosystem II, Φ PSII) ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เมื่อเติมโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่างกัน a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 หลังการเติมโลหะหนัก ($n=3$, ค่าเฉลี่ย \pm SE)

4. การศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ

จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* ระหว่างก่อนและหลังการทดลองพบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าชุดควบคุมมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เพิ่มขึ้น 195 ± 33 % แต่ปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ ในชุดการเติมโลหะหนักทั้งทองแดงและสังกะสีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 18) โดยชุดการทดลองเติมทองแดงหรือสังกะสีมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นและมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, one-way ANOVA) จากการวิเคราะห์จับคู่พหุคูณพบว่าชุดการทดลองเติมโลหะหนักทองแดงหรือสังกะสีทุกความเข้มข้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, LSD test) แต่ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์พบปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 35.93 และ 24.65 ในชุดการเติมทองแดงร้อยละ 56.67 และ 44.24 ในชุดเติมสังกะสี เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง

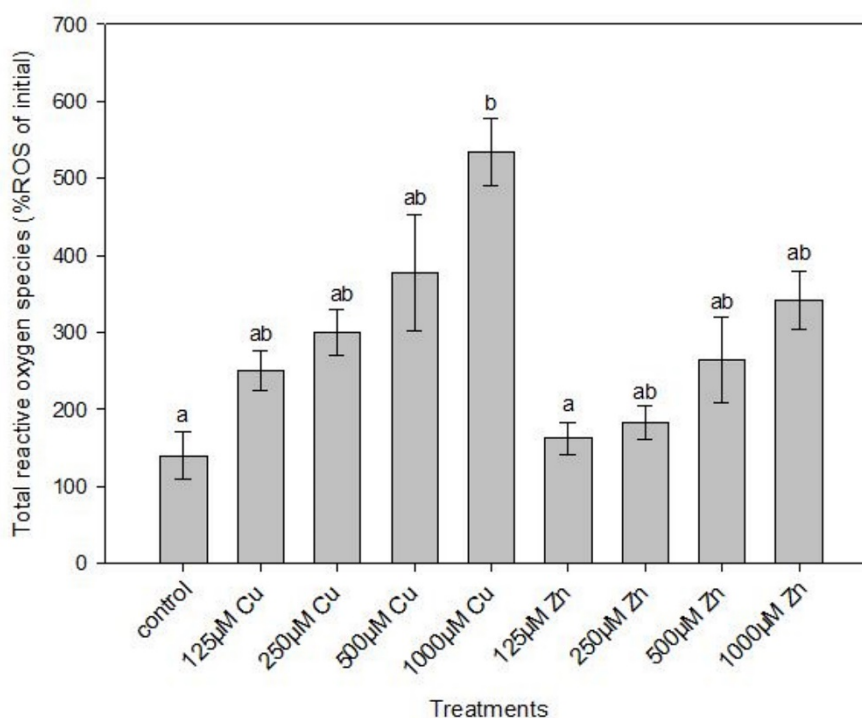


ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในวันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) เทียบกับวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง) ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* หลังจากการเติมโลหะหนัก ทองแดง และสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ (n=3, ค่าเฉลี่ย±SE)

หมายเหตุ ตัวอักษร แทนความแตกต่างของชุดข้อมูลเมื่อเทียบกับสถิติ LSD test , $\alpha = 0.05$

5. การศึกษาปริมาณอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive Oxygen Species)

จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสะสมอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (total reactive oxygen species, ROS) ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 0) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p < 0.05$, one-way ANOVA, ภาพที่ 19) จากการจับคู่พหุคูณพบว่าชุดการเติมทองแดงความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ (ปริมาณ ROS ร้อยละ 534.12 เทียบกับวันที่ 0) ทำให้สาหร่ายสะสมอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดอาหารมาตรฐาน (ร้อยละ 140.23 เทียบกับวันที่ 0) ($p < 0.05$, LSD test) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองเติมสังกะสี

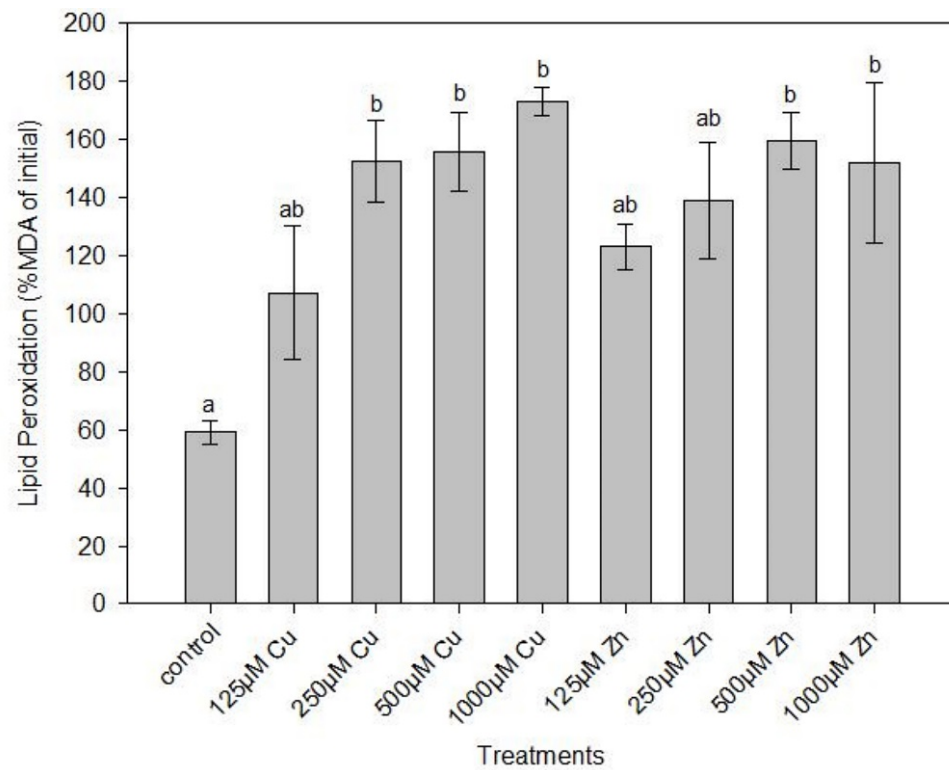


ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์ของการสะสมอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (total reactive oxygen species, ROS) ในวันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) เทียบกับวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง) ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* หลังจากการเติมโลหะหนักทองแดงและสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ (n=3, ค่าเฉลี่ย±SE)

หมายเหตุ ตัวอักษร แทนความแตกต่างของชุดข้อมูลเมื่อเทียบกับสถิติ LSD test , $\alpha = 0.05$

6. การศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไขมัน

วัดปริมาณการเพิ่มขึ้นของกรดมาลลอนอัลดีไฮด์ (malonaldehyde acid, MDA) ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน พบว่าร้อยละการเพิ่มขึ้นของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (total lipid peroxidation, LPO) ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 0) มีความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง ($p < 0.05$, one-way ANOVA, ภาพที่ 20) โดยจากการจับคู่พหุคูณพบว่าชุดการทดลองเติมทองแดงความเข้มข้น 250 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ และชุดการทดลองที่เติมสังกะสีความเข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์มีปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

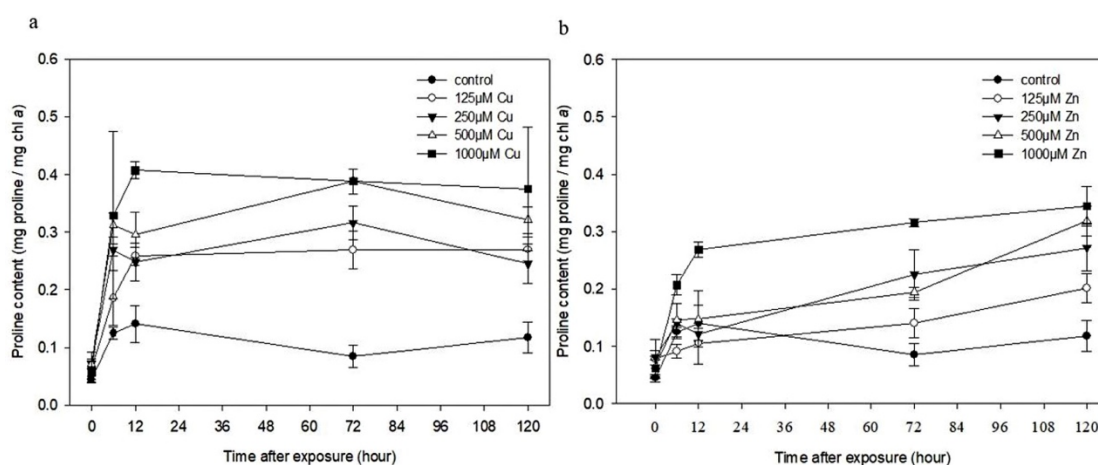


ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การสะสมกรดมัลลอนอัลดีไฮด์ (malonaldehyde acid, MDA) ในวันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) เทียบกับวันที่ 0 (เริ่มต้นการทดลอง) ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* หลังจากการเติมโลหะหนักทองแดงและสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ (n=3, ค่าเฉลี่ย±SE)

หมายเหตุ ตัวอักษร แทนความแตกต่างของชุดข้อมูลเมื่อเทียบกับสถิติ LSD test , $\alpha = 0.05$

7. การศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนโพรลีน

ปริมาณกรดอะมิโนโพรลีนมีการแปรผันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโลหะหนักและเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายรวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้งสองปัจจัย ($p < 0.05$, repeated ANOVA, ภาพที่ 21) ถึงแม้ว่าปริมาณโพรลีนในชุดควบคุมจะมีความผันแปรค่อนข้างสูง จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (analysis of covariance) ยังพบความแตกต่างระหว่างโลหะหนักความเข้มข้นแตกต่างกัน ($p < 0.05$, ANCOVA) โดยภาพรวมพบว่าชุดการทดลองที่ให้ทองแดงมีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีนมากกว่าชุดการทดลองที่ให้สังกะสี จากการจับคู่พหุคูณพบว่าชุดการทดลองให้ทองแดงทุกความเข้มข้นมีปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ชั่วโมง 6 (วันที่ 0) เป็นต้นไป ($p < 0.05$, LSD test, ภาพที่ 21a) ต่างจากชุดที่ให้สังกะสีที่ ณ ชั่วโมงที่ 6 พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีนที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์เท่านั้น ที่ ($p < 0.05$, LSD test, ภาพที่ 21b) แต่อย่างไรก็ตามทั้งชุดการเติมทองแดงและสังกะสี พบว่า ณ วันที่ 5 (สิ้นสุดการทดลอง) ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์มีปริมาณโพรลีนใกล้เคียงกันและยังคงสูงกว่าชุดควบคุม ($p < 0.05$, LSD test)



ภาพที่ 21 ปริมาณกรดอะมิโนโพรลีนเปรียบเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เมื่อเติมโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่างกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 6 12 (วันที่ 0) วันที่ 3 และวันที่ 5 หลังการเติมโลหะหนัก a แทนชุดการเติมทองแดง และ b แทนชุดการเติมสังกะสี (n=3, ค่าเฉลี่ย±SE)

บทที่ 4

อภิปรายผลการศึกษา

1. อภิปรายผลการศึกษา

การสะสมโลหะหนักในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

จากการศึกษาพบว่าปริมาณการสะสมของโลหะหนักทองแดง และสังกะสีในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* แปรผันตามความเข้มข้นของโลหะหนัก ณ เวลาสิ้นสุดการศึกษา จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าทำให้สังกะสีที่ความเข้มข้นสูงเหนี่ยวนำให้มีการดูดซึมทองแดงเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย จากผลการศึกษาเสนอว่าสามารถใช้การสะสมโลหะหนักทองแดงและสังกะสีเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของโลหะหนักในระบบนิเวศแหล่งน้ำในสิ่งแวดล้อม โดยมีความจำเพาะของสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละชนิดและชนิดของโลหะหนักด้วย (Harris and Ramlow, 1989; Zhou *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013; Piccini *et al.*, 2019) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Elsayed (2017) ทดลองการสะสมโลหะหนักชนิด แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ความเข้มข้น 1 5 10 20 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Scenedesmus obliquus* พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กสะสมปริมาณของโลหะหนัก (แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี) ปริมาณ 3.4 4.25 และ 4.42 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (dry weight) ภายใน 96 ชั่วโมงหลังจากเติมโลหะหนักตามลำดับ และการทดลองเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* และ *Spirulina platensis-Spirulina maxima* ด้วยโลหะหนักปรอท แคดเมียม และทองแดง พบว่าสาหร่ายทั้งสองชนิดมีการสะสมโลหะหนักภายในเซลล์เท่ากับ 144 161 และ 138 มิลลิกรัมต่อกรัม ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* และ 100 34 และ 76.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่ายผสมของสกุล *Spirulina* (Konig-péter *et al.*, 2014) ต่างจากการทดลองของ Wang และคณะ (2017) ทำการศึกษาการสะสมโลหะหนักทองแดงความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ด้วยสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Closterium ehrenbergii* เป็นเวลา 3 วันหรือ 96 ชั่วโมง โดยการเก็บผลการ

ทดลองทุกๆ 12 ชั่วโมงพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงสาหร่ายลดการดูดซึมทองแดงลง 47% และสะสมปริมาณทองแดงมากที่สุดเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือ 0.56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 24 และการทดลองการสะสมทองแดง และสังกะสีด้วยสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Pseudokirchneriella subcapitata* ระยะเวลา 7 วันพบว่าสาหร่ายชนิดดังกล่าวสามารถดูดซึมโลหะหนักทั้งสองชนิดได้เพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.075 มิลลิกรัมต่อลิตร ของชุดทองแดงและสังกะสีตามลำดับ (Soto *et al.*, 2011)

โลหะหนักหลายชนิดที่เป็นธาตุอาหารรองของพืชจะถูกกักเก็บในส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก เช่น ภายในส่วนประกอบเยื่อหุ้มเซลล์ คลอโรพลาสต์ เอนโดพลาสมิตเรติคูลัม เพอร์รอกซิโซม คอลติซอล เซนทรัลแวคคิวโอล และไมโทคอนเดรีย (Metha and Guar, 1999; Johnson *et al.*, 2007) ทองแดงและสังกะสีสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ผ่านหลายช่องทาง โดยเซลล์พืชและสาหร่ายประกอบไปด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของทองแดงและสังกะสีอยู่หลายกลุ่ม เช่น copper transporter (COPT) ซึ่งแทรกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย กลุ่มของ zinc transporter (ZIP) (Bueleigh *et al.*, 2003) ที่จำเพาะการเข้าออกของไอออนของสังกะสี (Zn^{2+}) เข้าสู่ภายในเซลล์สาหร่าย กลุ่มของ cation diffusion facilitation หรือกลุ่ม CDF เป็นบริเวณที่ดูดซึมโลหะหนักในรูปประจุของไอออนของทองแดง (Cu^+ และ Cu^{2+}) และสังกะสี (Zn^+ และ Zn^{2+}) แพร่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์โดยอิสระ กลุ่ม metal tolerance proteins หรือกลุ่ม MTP (Vert *et al.*, 2002; Grotz and Guerinot, 2006) ทำหน้าที่ส่งสัญญาณการเข้าออกของไอออนของโลหะหนัก เช่น ทองแดง สังกะสี นิกเกิล แคดเมียม และ กลุ่ม heavy metal ATPase หรือ HMA (Grotz and Guerinot, 2006) ซึ่งกลุ่มบริเวณดังกล่าวทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดโลหะที่มากเกินไปโดยการนำออกจากเซลล์ (Penarrubia *et al.*, 2015)

ผลของโลหะหนักต่อประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง

จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของโลหะหนักภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสามารถยับยั้งประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง ทั้งค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 (ϕ PSII) และค่าความสามารถในการสังเคราะห์แสงสูงสุดของระบบแสงที่ 2 (Fv/Fm) ระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นระบบที่มีความไวต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น สภาวะที่มีแสงมาก (Patsikka and Tyystjarvi, 1998) การขาดธาตุอาหารและน้ำ (Cheng and He, 2014) รวมถึงพิษจากโลหะหนัก (Hernandez, 2006; Donnelly *et al.*, 2011; Belyaeva *et al.*, 2012) จากการศึกษาในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Closterium ehrenbergii* พบว่าสาหร่ายมีอัตราส่วนของ Fv/Fm ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมทองแดงความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรภายในเวลา 12 ชั่วโมง และลดลงอย่างต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง (Wang *et al.*, 2017) และกลุ่มแพลงก์ตอนพืชชนิด *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot ซึ่งเป็นกลุ่มมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยโลหะหนักแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี พบว่า *P. lanceolatum* มีค่าการสังเคราะห์แสงสูงสุดในระบบแสงที่ 2 ลดลงแตกต่างกันโดย แคดเมียมเป็นพิษมากที่สุด โดยมีสังกะสี และทองแดงรองลงมา เมื่อวัดค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 พบว่าโลหะหนักทั้งสามชนิดสามารถลด ϕ PSII ร้อยละ 60 65 และ 85 เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ตามลำดับ (Sbihi *et al.*, 2012) และการทดลองของ Mykhaylenko และ Zolotareva (2017) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* ด้วยทองแดง ความเข้มข้น 0.6 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่าค่าของ Fv/Fm และ ϕ PSII เพิ่มขึ้นในเวลา 96 ชั่วโมงหลังการทดลอง และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 150 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่พบการลดลงของประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงอย่างรวดเร็วหลังจากสาหร่ายได้รับโลหะหนักไปเพียง 12 ชั่วโมง การลดลงของ ϕ PSII อาจเป็นผลมาจากการยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสงที่ 2 เนื่องจากไอออนทองแดง และสังกะสี มีผลต่อระบบการขนส่งของอิเล็กตรอนในระบบ Q_A เข้าสู่ Q_B ตามลำดับ (Tripathi *et al.*, 2006; Bakor *et al.*, 2007; Mamboya *et al.*, 2007; Yruela, 2013; Gilroy *et al.*, 2014; Cecchin *et al.*, 2018; Merino *et al.*, 2019) ส่วนการลดลงของ Fv/Fm อาจเป็นผลมาจากไอออนของโลหะหนักทั้งทองแดง และสังกะสีเข้าทำปฏิกิริยากับระบบแสงที่สอง (PSII) ส่งผลให้ลดประสิทธิภาพของหน่วยรับ

พลังงานแสง (light harvesting antenna) หรือกลุ่มของโปรตีน D1 ซึ่งอยู่ที่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) (Patsikka and Tyystjarvi, 1998; Volland *et al.*, 2014)

การลดลงของประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ โดยพบการลดลงของคลอโรฟิลล์ทั้งในชุดการทดลองที่เติมทองแดงและสังกะสี โดยทองแดงส่งผลให้เกิดการลดลงของคลอโรฟิลล์มากกว่า จากการรายงานพบว่าการเพิ่มขึ้นของโลหะหนักสังกะสีส่งผลให้สาหร่ายขนาดเล็กปรับเปลี่ยนโครงสร้างของรงควัตถุภายในคลอโรพลาสต์โดยสังกะสีจะเข้าไปแทนที่ตำแหน่งการจับอย่างจำเพาะของแมกนีเซียม ทำให้ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงลดลงตามไปด้วย (Sharma and Chopra, 1987; Dobermann and Fairhurst, 2000; Enany and Issa, 2001) นอกจากนี้คลอโรฟิลล์ เอ ยังถือเป็นตัวแทนของอัตราการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก โดยพบว่าในชุดควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของ คลอโรฟิลล์ เอ ถึงเกือบ 2 เท่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นจากวันเริ่มต้น ดังนั้นการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อสาหร่ายได้รับทองแดงจึงอาจแปลผลได้เป็นสองกรณี ได้แก่ ทองแดงและสังกะสีรบกวนโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เอ ส่งผลลดการสังเคราะห์ด้วยแสง และ/หรือ ทองแดงและสังกะสีส่งผลยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง (Enany and Issa, 2001) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou และคณะ (2012) ที่รายงานว่า การได้รับทองแดงและสังกะสีส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *C. pyrenoidosa* และ *Scenedesmus obliquus* และทำให้เซลล์ของสาหร่ายมีขนาดใหญ่มากกว่าปกติ และมีโครงสร้างของรงควัตถุที่เปลี่ยนแปลงไป

ตาราง 5 ตารางเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสรีรวิทยาวิทยาของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* ต่อโลหะหนักทองแดง และสังกะสีความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดและความเข้มข้น โลหะหนัก	ระยะเวลา	การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก	อ้างอิง
ทองแดง 10 ไมโครโมลาร์	75 ชั่วโมง	Fv/Fm 32.14 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 45.54 % เทียบกับวันที่ 0 Chl <i>a</i> 43.99 % เทียบกับวันที่ 0 MDA 232.16% เทียบกับวันที่ 0	Bakor และคณะ, 2007
ทองแดง 3.77 ไมโครโมลาร์	48 ชั่วโมง	Fv/Fm 60.60 % เทียบกับวันที่ 0 Chl <i>a</i> 4.54 % เทียบกับวันที่ 0	Wang และคณะ, 2007
ทองแดง 251.4 ไมโครโมลาร์ สังกะสี 880.3 ไมโครโมลาร์	12 ชั่วโมง	Fv/Fm 25.00 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 26.47 % เทียบกับวันที่ 0 Fv/Fm 78.65 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 32.35 % เทียบกับวันที่ 0	Kumar และคณะ 2013
ทองแดง 5 ไมโครโมลาร์	75 ชั่วโมง	Fv/Fm 8.57 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 17.65 % เทียบกับวันที่ 0 MDA 150.72% เทียบกับวันที่ 0	Chen และคณะ, 2016
สังกะสี 200 ไมโครโมลาร์		Fv/Fm 44.12 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 28.99 % เทียบกับวันที่ 0 MDA 102.34 % เทียบกับวันที่ 0	
ทองแดง 25 ไมโครโมลาร์	24 วัน	Fv/Fm 26.67 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 28.95 % เทียบกับวันที่ 0	Mykhaylenko และ Zolotareva, 2017

สังกะสี 200 ไมโครโมลาร์		Fv/Fm 47.87 % เทียบกับวันที่ 0 ΦPSII 38.16 % เทียบกับวันที่ 0	
ทองแดง 99.45 ไมโครโมลาร์ สังกะสี 733.59 ไมโครโมลาร์	150 ชั่วโมง	Chl a 36.49 % เทียบกับวันที่ 0 Chl a 19.58 % เทียบกับวันที่ 0	Kondzior และ Butarewicz, 2018

การเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดทีฟ

โลหะหนักที่อยู่ในรูปไอออนอิสระภายในเซลล์จะส่งผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (ROS) ผ่านกระบวนการรีดักชัน เช่น O_2^- , H_2O_2 และ hydrogen radicals ซึ่งสารกลุ่ม ROS จัดเป็นสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ เพื่อควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ และการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายขนาดเล็ก (Choudhary *et al.*, 2007; Elbaz *et al.*, 2014) แต่เมื่อมีอนุพันธ์มากเกินไปจะส่งผลต่อความเป็นพิษภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดทีฟ (oxidative stress) (Sokolnik *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012) การศึกษาครั้งนี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของกลุ่มอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (ROS) ซึ่งส่งผลต่อเนื้อให้มีการเพิ่มขึ้นของกรดมาลลอนอัลดีไฮด์ (MDA content) ซึ่งเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน (LPO) เหตุเกิดมาจากกลุ่มสมาชิกของ ROS เช่น อนุพันธ์ของไฮโดรเจน และออกซิเจนมีการทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นกลุ่มของไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid radical) ที่มีประจุอันเนื่องมาจากการจับของอนุพันธ์ ROS ด้วยพันธะคู่ เมื่อเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ไปยังบริเวณอื่นๆ ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และปลดปล่อยส่วนของเพอร์ออกไซด์ออกมา (lipid peroxide) (Gill and Tuteja, 2010; Palipoch and Koomhin, 2015) ซึ่งไขมันเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างของฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของสาหร่ายและออร์กาเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม เช่น คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย นิวเคลียส เป็นต้น สอดคล้องกับผลการศึกษาจากงานวิจัยอื่นๆ เช่นงานวิจัยของ Tripathi และคณะ (2006) ซึ่งทำการศึกษาในสาหร่ายชนิด *Scenedesmus* sp. ในอาหารที่ปนเปื้อนโลหะหนักทองแดงและสังกะสี พบการเพิ่มขึ้นของ ROS และการเกิดออกซิเดชันของไขมันอย่างมีนัยสำคัญในออร์กาเนลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย และ

คลอโรพลาสต์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่รายงานการเพิ่มขึ้นของอนุพันธ์ของไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *C. pyrenoidosa* และ *Microcystis aeruginosa* เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโลหะหนักทองแดง แคดเมียม และปรอท (1-15 ไมโครโมลาร์ของทองแดง และแคดเมียม 10 ไมโครโมลาร์ของปรอท, Lu *et al.*, 2015) และสาหร่ายชนิด *Scenedesmus* sp หลังการเพาะเลี้ยงด้วยทองแดงและสังกะสีความเข้มข้น 2.4-40 และ 5-100 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (Tripathi and Gaur, 2004) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) ความเข้มข้น 1-300 ไมโครโมลาร์ทั้งทองแดง และสังกะสี (Choudhary *et al.*, 2007) ที่ถูกกระตุ้นด้วยซิงค์คลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Choudhary *et al.*, 2007)

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อพิจารณาระดับความเป็นพิษจากการสะสมของ ROS และการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ทองแดงสามารถส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของ ROS และส่งผลการเพิ่มขึ้นของกระบวนการออกซิเดชันของไขมันรวดเร็วและรุนแรงกว่าสังกะสี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS ที่แตกต่างกัน (Choudhary *et al.*, 2007; Elbaz *et al.*, 2014) ทองแดงจัดว่าเป็นโลหะหนักชนิดรีดอกซ์แอคทีฟ (redox active) สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ ROS ผ่านปฏิกิริยา Haber-Weiss และ ปฏิกิริยา Fenton ได้โดยตรง แต่กลุ่มของสังกะสีจัดเป็น รีดอกซ์อินแอคทีฟ (redox inactive) ซึ่งกระตุ้นให้เกิด ROS ผ่านกระบวนการอื่นๆ ได้แก่ การกระตุ้นปฏิกิริยาของกรดลิววิส และส่งผลต่อการเข้าออกของกลุ่ม secondary messenger เช่น แคลเซียมไอออน ทำให้ระบบของไซโทโครมซี ผิดปกติและปลดปล่อยอนุพันธ์ของไฮโดรเจนออกมา (Angelé-Martínez *et al.*, 2014; Feigl *et al.*, 2015) ทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันช้ากว่ากลุ่มรีดอกซ์แอคทีฟ (Pinto *et al.*, 2003) ความสามารถของทองแดงในการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดทีฟที่รุนแรงมากกว่าสังกะสีนั้นอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการยับยั้งประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสงในสาหร่าย *C. vulgaris* ที่ได้รับทองแดงมากกว่าสาหร่ายที่ได้รับสังกะสี ทั้งนี้เนื่องมาจากเป้าหมายของการทำปฏิกิริยาของ ROS นั้นคือไขมัน จึงอาจส่งผลกระทบต่อความเสถียรและโครงสร้างของเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์และไทลาคอยด์ ทำให้รบกวนปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง (Soto *et al.*, 2011; Volland *et al.*, 2014; Palipoch and Koomhin, 2015; Merino *et al.*, 2019)

การสะสมของกรดอะมิโนโพรลีน

การตอบสนองทางสรีรวิทยาที่น่าสนใจของงานวิจัยนี้คือการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีนภายในเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยพบว่าโลหะหนักทั้งทองแดงและสังกะสีกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสมกรดอะมิโนโพรลีนได้อย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง บทบาทของกรดอะมิโนโพรลีนที่สำคัญคือการรักษาสมดุลการเข้าออกของไอออนและของเหลวของเซลล์ (osmoregulation) และการรักษาระบบเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ในสภาวะเครียดจากต่างๆ เช่น ความเค็มสูง ความเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส (Alla and Saradhi, 1991; Saradhi, 1991; Smironoff and Cumbes, 1989; Schat *et al.*, 1997; Ambikapathy *et al.*, 2002; Ashraf and Foolad, 2007) และกระตุ้นการสร้างสารเมือกเพื่อลดการดูดซึมโลหะหนักภายในเซลล์ (Wu *et al.*, 1998a&b) นอกจากนี้หน้าที่ของกรดอะมิโนโพรลีนจัดว่าเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารสำคัญภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และการสังเคราะห์ไขมันในส่วนของไฟรินอยด์ของสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิด (Soto *et al.*, 2011) ในการศึกษาครั้งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับโลหะหนักและการสังเคราะห์โพรลีนซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ เช่น จากการศึกษาของ Choudhary และคณะ (2007) การเติมโลหะหนักทองแดงและสังกะสีในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Arthrospira platensis* พบว่าสาหร่ายจะสร้างโพรลีนมากขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของโลหะหนัก และกระตุ้นการสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลูตาไธโอนสอดคล้องกับรายงานวิจัยความสัมพันธ์ระหว่างทองแดง และสังกะสี ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสาหร่ายขนาดเล็กชนิด *Scenedesmus quadricauda* และ *Chlorella vulgaris* (Wu *et al.*, 1995b; Tripathi and Gaur, 2004)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในระดับเชิงชีวโมเลกุลของกลุ่มยีนที่จัดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนโพรลีน เช่น Pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนโพรลีน พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนดังกล่าว (overexpression) มีการสะสมกรดอะมิโนโพรลีนเพิ่มขึ้น และมีความทนต่อโลหะหนักแคดเมียมมากกว่ากลุ่มควบคุม (wild type) โดยการศึกษาชี้เสนอว่าปริมาณกรดอะมิโนโพรลีนที่เพิ่มขึ้นส่งเสริม

ความทนต่อแคดเมียม (Siripornadulsil *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่สามารถอธิบายว่าบทบาทของกรดอะมิโนโพรลีนจัดเป็นตัวกลางในการสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell signaling) ดังนั้นเมื่อปริมาณของ ROS เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ นิวเคลียสจะส่งสัญญาณด้วยการเพิ่มระดับของโพรลีนเพื่อเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์กลุ่มสารต่างๆ ในการยับยั้งปริมาณของ ROS (Costa and Morel, 1994; Enany and Issa, 2001; Siripornadulsil *et al.*, 2002; Tripathi and Gaur, 2004; Liang *et al.*, 2013)

2. การนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก

จากผลการศึกษา และการอภิปรายผลการศึกษาเบื้องต้นรวมทั้งการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ได้มีการเสนอนำการใช้สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* เป็นดัชนีชี้วัดความอุดมสมบูรณ์เชิงระบบนิเวศ (bioindicators) (Hu *et al.*, 2012; Sakset and Chankeaw, 2012; Brahmbatt *et al.*, 2013; Czaplicka and Lodowska, 2014; Parmar *et al.*, 2016; Ureses *et al.*, 2016) ร่วมกับกลุ่มของแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น กลุ่มของไรติเฟอร์ คาโดเซอเรียน เมื่อนำข้อมูลข้างต้นผนวกกับผลการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา เช่น ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Fv/Fm) ปริมาณการเพิ่มขึ้นของอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว ปริมาณของกรดมัลลอนอัลดีไฮด์ และที่สำคัญการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรลีน ในการศึกษาครั้งนี้มีการเพิ่มขึ้นของอนุพันธ์ต่างๆ อย่างรวดเร็วภายในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง ผู้ทำการศึกษาได้เสนอนำสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* ใช้ในกระบวนการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก ทองแดง และสังกะสีได้ โดยเป็นทั้งตัวชี้วัดทางกายภาพ (bioindicators) และตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) ที่นำมาใช้ในการติดตามการปนเปื้อนของโลหะหนักดังกล่าวได้ (Chia *et al.*, 2013; Aderemi *et al.*, 2015; Elsayed, 2017; Merino *et al.*, 2019) และ Saradhi (1991) ได้เสนอประโยชน์ของกรดอะมิโนโพรลีนต่อการเป็นหนึ่งในสารอนุมูลอิสระในการตรวจสอบสถานะเครียดจากพืชทั่วไปจากสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อม เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ เป็นต้น ด้วยเหตุผลการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของกรดอะมิโนเมื่อรับการกระตุ้น/ดูดซับจากสิ่งเร้า แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของกรดอะมิโนดังกล่าวไม่สามารถเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนโลหะหนักเพียงพารามิเตอร์เดียว เนื่องจากต้องมีการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลต่อไป (Siripornadulsil *et al.*, 2002) และการทบทวนเอกสารพบว่ายัง

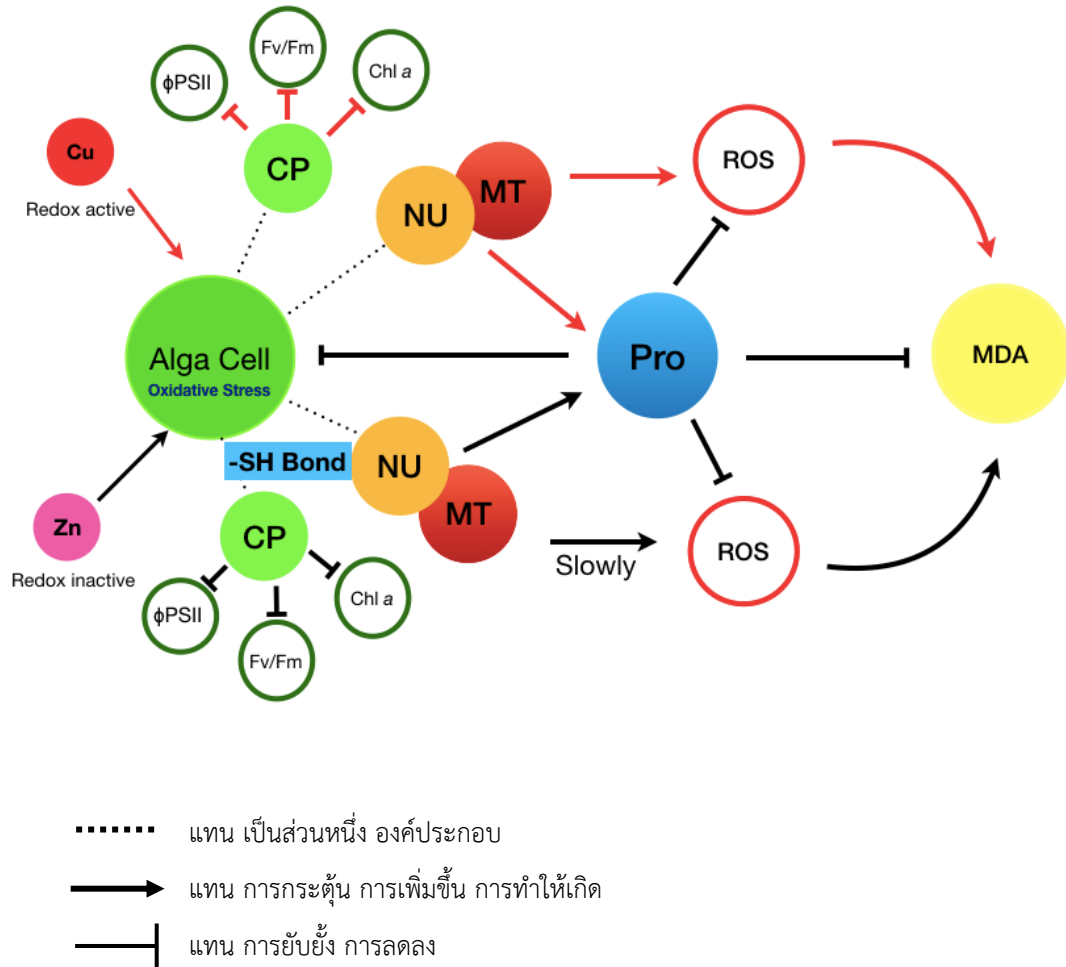
มีการเสนอการใช้สำหรับขนาดเล็กเป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนร่วมกับพารามิเตอร์อื่นๆ ร่วมด้วย เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณกลูตาไธโอน สารกลุ่มซูปเปอร์ออกซิเดตติสมิวเตส (Carfagna *et al.*, 2013) สารกลุ่มของอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต (Bajgus, 2011; Sbihi *et al.*, 2012) และกรดอะมิโนกลุ่มกลูตาเมต (Pavlikova *et al.*, 2008; Ciupa *et al.*, 2016) เป็นต้น

จากการศึกษาในครั้งนี้จัดเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้พารามิเตอร์ทางด้าน สรีรวิทยาของพืช ร่วมกับปัจจัยทางกายภาพนำมาทำนายการปนเปื้อนโลหะหนักทองแดงและสังกะสี ในระบบนิเวศแหล่งน้ำ เพื่อประโยชน์การบูรณาการการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในแหล่ง น้ำธรรมชาติได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* ต่อโลหะหนักทองแดงและสังกะสีขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของโลหะหนักและเวลาในการถูกกระตุ้น จากการติดตามพารามิเตอร์ทางสรีรวิทยาต่างๆ เช่น ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณของอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว ปริมาณของการเพิ่มขึ้นของการออกซิเดชันของไขมัน และการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนโพรสีน โดยความเข้มข้นของทองแดงและสังกะสี 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 22) ผู้ทำการศึกษาค้นคว้าพบว่าสามารถใช้สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *C. vulgaris* เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนโลหะหนักสำหรับทองแดงและสังกะสีในระบบนิเวศแหล่งน้ำ



ภาพที่ 22 แผนภาพสรุปกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Chlorella vulgaris* ต่อโลหะหนักทองแดงและสังกะสี Cu แทน ทองแดงไอออน; Zn แทน สังกะสีไอออน; CP แทน ส่วนของคลอโรพลาสต์; MT แทน ไมโทคอนเดรีย; NU แทน นิวเคลียส; Fv/Fm แทน ค่ากะประมาณความเครียดของพีชในระบบแสงที่สอง; ϕ PSII แทน ค่ากะประมาณอัตราการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสงที่สอง; Chl *a* แทน คลอโรฟิลล์ เอ ; ROS แทน อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว; MDA แทน กรดมัลลอนด์ไฮด์ ผลิตภัณฑ์ของกระบวนการออกซิเดชัน; Pro แทน กรดอะมิโนโพรลีน

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2548a. **มาตรฐานคุณภาพน้ำแห่งประเทศไทย**. ประกาศกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.), กรุงเทพฯ; 32 หน้า.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2548b. **มาตรฐานและเกณฑ์ควบคุมปริมาณโลหะหนักในตะกอนดิน**. ประกาศกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.), กรุงเทพฯ; 32 หน้า.
- นวรรตน์ อุดมประเสริฐ. 2558. **สรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาวะเครียด**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ; 266 หน้า.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. **คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช**. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ; 467 หน้า.
- Aderemi, A., Hunter, C. and Shu, X. 2015. Optimization of cell disruption in *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* for biomarker evolution. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science** 46: 481-489.
- Afkar, E., Ababna, H. and Fathi, A.A. 2010. Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris*, to Some Heavy Metals. **American Journal of Environmental Sciences** 6: 230-237.
- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B.N., Munjal, A.K. Baunthiyal, M. and Sharma, V. 2012. Metal Toxicity and Photosynthesis. **American Journal of Environmental Sciences** 26: 13-56.
- Alam, M.A., Wan, C., Gou, S.L., Zhao, X.Q., Huang, Z.Y., Yang, Y.L. and Bai, F.W. 2014. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 118: 29-33.
- Alam, M.A., Wan, C., Zhao, X-Q., Chen, L-J., Chang, J-S. and Bai, F-W. 2015. Enhanced removal of Zn²⁺ or Cd²⁺ by the flocculating *Chlorella vulgaris* JSC-7. **Journal of Hazardous Materials** 269: 38-45.

- Alla and Saradhi, P.P. 1991. Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress. **Journal of Plant Physiology** 138: 554-558.
- Ambikapathy, J., Marshall, J.S., Hocast, C.H. and Haedham, A.R. 2002. The Role of Proline in Osmoregulation in *Phytophthora nicotianae*. **Fungal Genetics and Biology** 35: 287–299.
- Amini, S., Ghobadi, C. and Yamchi, A. 2015. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of *P5CS* gene in plant. **Journal of Plant Molecular Breeding** 3: 44-55.
- Angelé-Martínez, C., Goodman, C. and Brumaghim, J. 2014. Metal-Mediated DNA Damage and Cell Death: Mechanisms, Detection Methods, and Cellular Consequences. **Metallomics** 45: 1-67.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. **Environmental and Experimental Botany** 59: 206-216.
- Aslam, M., Saeed, M.S., Sattar, S., Sajad, S., Sajjad, M., Adnan, M., Iqbal, M. and Sharif, M.T. 2017. Specific Role of Proline Against Heavy Metals Toxicity in Plants. **International Journal of Pure & Applied Bioscience** 5: 27-34.
- Aswani, V., Rajsheel, P., Bapatla, P.B., Sunil, B. and Raghavendra, A.S. 2018. Oxidative stress induced in chloroplasts or mitochondria promotes proline accumulation in leaves of pea (*Pisum sativum*): another example of chloroplast-mitochondria interactions. **Protoplasma** 12: 1-12.
- Ayala, A., Muñoz, M.F. and Argüelles, S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 34: 12-54.

- Bajguz, A., 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by Cadmium, Lead, and Copper stress and Its restoration by *Endogenous brassinolide*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 60: 406-416.
- Bakor, M., Váczi, P., Barták, P., Budová P. and Dzubaj A. 2007. Uptake, Photosynthetic Characteristics and Membrane Lipid Peroxidation Levels in the Lichen Photobiont *Trebouxia erici* Exposed to Copper and Cadmium. **The Bryologist** 110: 100-107.
- Barcelo, J. and Poschenrieder, Ch. 2013. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. **Journal of Plant Nutrition** 13: 1-37.
- Baron, M., Arellano, J.B. and Gorge, J.L. 1995. Copper photosystem II: a controversies relationship. **Plant Physiology** 94: 174-180.
- Bate, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water- stress studies. **Plant and Soil** 39: 205-207.
- Belyaeva, E.A., Sokolova, T.V., Emelyanova, L.V. and Zakharova, I.O. 2012. Mitochondrial Electron Transport Chain in Heavy Metal-Induced Neurotoxicity: Effects of Cadmium, Mercury, and Copper. **The Scientific World Journal** 31: 1-14.
- Brahmbhatt, N., Patel, R. and Jasrai, R.T. 2013. Heavy metal accumulation in *Oscillatoria* sp. Induced biochemical response. **Advanced in Applied Science Research** 4: 182-189.
- Brinza, L., Dring, M.J. and Gavrilescu, M. 2007. Marine micro and macro algal species as biosorbents for heavy metals. **Environmental Engineering Management Journal** 6: 237-251.
- Burda, K., Kruk, J., Strzalka, K. and Schmid, G.H. 2002. Stimulation of oxygen evolution in Photosystem II by copper (II) ions. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung** 57: 853-857.

- Burleigh, G.H., Kristensen, B.K. and Bechmann, I.E. 2003. A plasma membrane zinc transporter from *Medicago truncatula* is up-regulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization. **Plant Molecular Biology** 52: 1077-1088.
- Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G. Basile, A. Sorbo, S. and Vona, V. 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana*. **Springerplus** 2: 147:157.
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, S., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., Delledonne, M. and Ballottari, M. 2018. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. **Scientific REPOrTS** 8: 6465-6478.
- Chan, A., Salsali, H. and McBean, E. 2013. Heavy Metal Removal (Copper and Zinc) in Secondary Effluent from Wastewater Treatment Plants by Microalgae. **American Chemical Society Sustainable chemistry and engineering** 12: 1-8.
- Chekroun, K.B. and Baghour, M. 2013. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. **Journal of Materials and Environmental Science** 4: 873-880.
- Chen, C.-T., Chen, T.-H., Lo, K.F. and Chiu, C.Y. 2004. Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. **Plant Science** 166: 103–111.
- Chen, W. X., Zhang, S. S., Rong, J. F., Li, X., Chen, H. and He, C. L. 2016. Effective biological denox of industrial flue gas by the mixotrophic cultivation of an oil-producing microgreen alga *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science Technology** 50: 1620–1627.
- Cheng, D. and He, Q. 2014. Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production – an overview. **Frontiers in energy research** 2: 3-10.

- Cheng, J., Qiu, H., Chang, Z., Jiang, Z. and Yin, W. 2016. The effect of cadmium on growth and antioxidants response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. **SpringerPlus** 5: 192-211.
- Chia, M.A., Lombardi, A.T., Melao, M.G.G. and Parrish, C. 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trevouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology** 129: 171-187.
- Choudhary, M., Jetley, U.K., Knan, M.A., Zutshi, S. and Fatma, T. 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. **Ecotoxicology and environmental safety** 36: 1-6.
- Chu, K.H. and Hashim, M.A. 2014. Quantitative Analysis of Copper Biosorption by the Microalga *Chlorella vulgaris*. **Environmental engineering science** 21: 13-25.
- Chun, C.H., Paramasivan, M. and Chandrasekaran, M. 2018. Proline Accumulation Influenced by Osmotic Stress in Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic **Plants**. **Frontiers in Microbiology** 13: 1-13.
- Ciupa, M.K., Ciepala, R., Nadgóska, A.-S. and Barczyk, G. 2016. Accumulation of heavy metals and antioxidants responses in *Pinus sylvestris* L. needles in polluted and non-polluted site. **Ecotoxicology** 25: 970-981.
- Clausen, A., McClanahan, T., Ji, S.G. and Weiss, J.H. 2013. Mechanisms of Rapid Reactive Oxygen Species Generation in Response to Cytosolic Ca²⁺ or Zn²⁺ Loads in Cortical Neurons. **PLoS ONE** 8: 3347-3355.
- Clijsters, I.I. and Assche, F.V. 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metal. **Photosynthesis Research** 7: 31-40.
- Costa, G. and Morel, J.-L. 1994. Water relation, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. **Plant physiology biochemistry** 32: 560-571.
- Cushman, J.C. 2001. Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture. **American Zoologist** 41: 758-769.

- Czaplicka, A.K. and Lodowska, J., 2014. Biomonitoring of surface water by synchronous culture of *Chlorella vulgaris* algae. **Environment Protection Engineering** 40: 37-57.
- Dar, M.R., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F. and Khan, F.A. 2016. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development. **Environmental assessment on contaminated sites of Ganga river basin** 13: 1-13.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, H., Stransky, H., Biehl, H., Leister, D., Graaff, E.V.D., Kunze, R. and Frommera, W.B. 2014. The Role of D1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation. **The Plant Cell** 16: 3413–3425.
- Din, R.A.S.E., Gharib, A.A., Ghazy, S.M. and Johny, E.Y.R. 2009. Effect of some heavy metals on growth of *scenedesmus obliquus* (turpin) kützing. **Egyptian Journal of Phycology** 10: 22-37.
- Dobermann, A. and Fairhurst, J. 2000. Rice: **Nutrient Disorders and Nutrient Management**. Philiines: Potash & Phosphate Institute of Canada (IC) and International Rice Research Institute. 1029pp.
- Donnelly, P.S., Liddell, J.R., Lim, S.H., Paterson, B.M., Cater, M., Savvac, M.S., Mot, A.I., James, J.L., Trounce, I.A., White, A.R. and Crouch, P.J. 2011. An impaired mitochondrial electron transport chain increases retention of the hypoxia imaging agent diacetyls (4-methylthiosemicarbazonato) copper. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 109: 50-61.
- Du, F., Shi, H., Zhang, X. and Xu, X. 2014. Responses of Reactive Oxygen Scavenging Enzymes, Proline and Malondialdehyde to Water Deficits among Six Secondary Successional Seral Species in Loess Plateau. **PLoS ONE** 34: 1-8.

- Elbalz, A.-Y., Rosenfeld, G., Shinder, E., Futerman, A., Geiger, T. and Schudiner, M. 2014. A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. **Developmental Cell** 30: 95–102.
- Elewa, T.A., Sadak, M.S. and Saad, A.M. 2017. Proline treatment improves physiological responses in quinoa plants under droughts tress. **Bioscience research** 14: 21-33.
- Elsayed, J. 2017. Bio-chemical biomarkers in algae *scenedesmus obliquus* exposed to heavy metals Cd, Cu and Zn. **Acta Chemica Malaysia** 1: 16-20.
- Enany, A.E. and Issa, A.A. 2001. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. **Folia Microbiologica** 46: 227-230.
- Fathi, A.A., A.M. El-Shahed, M.A. Shoulkamy, Ibraheim, H.A. and Abdel Rahman, O.M. 2008. Response of Nile water phytoplankton to the toxicity Cobalt, Copper and Zinc. **Research Journal of Environmental Toxicology** 2: 67-76.
- Feigl, G.B., Lehotai, N.R., Molna, N.R.D., Ruiz, M.R.G., Palma, J.M., Corpas, F.J. and Erdei, L. 2015. Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two *Brassica* species with different sensitivity. **Annals of Botany** 116: 613–625.
- Filippis, L.F. and Pallaghy, C.K. 1976. The Effect of Sub-Lethal Concentrations of Mercury and Zinc on *Chlorella*: II. Photosynthesis and Pigment Composition. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie** 78: 314-322.
- Franklin, R.E., Duis, L., Smith, B.R., Brown, R. and Toler, J.E. 2003. Elemental concentrations in soils of South Carolina. **Soil Science** 168: 280–291.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 48: 909-930.

- Gilroy, S., Susuki, N., Miller, G., Choi, H., Toyota, M. and Deyireddy, A.R. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in Plant Science** 19: 623–630.
- Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernández, F.G.A., Medina, A.R. and Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances** 20: 491-515.
- Grotz, N. and Guerinot, M.L. 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1763: 595-608.
- Hafeez, B., Khanif, Y.M. and Saleem, M. 2013. Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. **American Journal of Experimental Agriculture** 3: 374-391.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, New York. 936pp.
- Hamed, S.M., Zinta, G., Klock, G., Asard, H., Selim, S. and AbdElgawad, H., 2017. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 140: 256-263.
- Handique, G.K. and Handique, A.K. 2009. Proline accumulation in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf.) due to heavy metal stress. **Journal of Environment Biology** 30: 299-302.
- Harris, P.O. and Ramelow, G.J. 1989. Binding of Metal Ions by Particulate Biomass Derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. **Biophysica Acta** 19: 1-9.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments. **Plant Signaling & Behavior** 7: 1559-1578.
- Hernandez, H.P.V. 2006. Effects of heavy metals ions on primary photosynthetic processes in Antarctic filamentous. **Czech polar reports** 6: 180-185.

- Hernandez, H.P.V. 2016. Effects of heavy metals ions on primary photosynthetic processes in Antarctic filamentous alga *Zygnema* sp. **Czech polar reports** 6: 180-185.
- Horn, D. and Barrientos, A. 2008. Mitochondrial Copper Metabolism and Delivery to Cytochrome c Oxidase. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology** 60: 421–429.
- Hossain, M.A., Piyatida, P.P., Silva, J.T.D. and Fujita, M. 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. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany** 2014: 1-38.
- Hu, L.-F., Long, Y.-Y., Shen, D.-S. and Jiang, C.-J. 2012. Can *Chlorella pyrenoidosa* be a bioindicator for hazardous solid waste detoxification?. **Science of the Total Environment** 416: 232-238.
- Huiling, O., Xingzhen, K., Wei, H., Ning Q., Qishuang, H., Yan, W., Rong, W. and Fuliu, L. 2012. Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Chinese Science Bulletin** 57: 3363-3370.
- Ikram, K., Yssaad, H.A.R. and Topcuoglu, B. 2017. Effect of heavy metals (Copper, zinc, cadmium and lead) on the accumulation of proline and soluble sugars in *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. **International Journal of Biosciences** 11: 205-212.
- Jakaityte, A.I., Kalnaityte, A.E. and Bagdonas, S. 2014. Effects of heavy metal ions and quantum dots on the autofluorescence of freshwater microalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 104: 51-71.

- Johnson, H.L., Stauber, J.L., Adams, M. and Jolley, D.F. 2007. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. **Environmental Toxicology** 22: 234-244.
- Juneau, P., Berdey, A.E. and Popovic, R. 2002. PAM Fluorometry in the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper. **Archives of environmental contamination and toxicology** 42: 155–164.
- Kaciene, G., Zaltauskaite, J., Milce, E. and Juknys, R. 2015. Role of oxidative stress on growth responses of spring barley exposed to different environmental stressors. **Journal of plant ecology** 8: 605-616.
- Kalaikandhan, R., Vijayarengan, P., Sivasankar, R. and Mathivanan, S. 2014. The pigment content of *Sesuvium portulacastrum* L. under copper and zinc stress. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 3: 1056-1066.
- Kaur, G. and Asthir, B. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia plantarum** 37: 34-44.
- Kebeish, R., Ayouty, Y.-E. and Husain, A. 2014. Effect of copper on growth, bioactive metabolites, antioxidant enzymes and photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. **World Journal of Biology and Biological Sciences** 2: 34-43.
- Kondzior, P. and Butarewicz, A. 2018. Effect of Heavy Metals (Cu and Zn) on the Content of Photosynthetic Pigments in the Cells of Algae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Ecological Engineering** 19:18-28.
- Konig-Péter, A., Kilar, F., Felinger, A. and Pernyeszi, P. 2015. Biosorption characteristics of *Spirulina* and *Chlorella* cells for the accumulation of heavy metals. **Journal of the Serbian Chemical Society** 80: 407–419.

- Kowalewska, G., 1999. Phytoplankton the main factor responsible for transport of polynuclear aromatic hydrocarbons from water to sediments in the Southern Baltic ecosystem (extended abstract). **Journal of Marine Science and Engineering** 56: 219–222.
- Kumar, D., Santhanam, P. Thillaiyanayagam, J. and Kumar, N. 2013. Optimization of pH and reaction time on the removal of nutrient and heavy metal (Zinc and Copper) using immobilized marine microalgae *Chlorella marina*. **Journal of Biological Sciences** 24: 234-243.
- Kumar, K.S., Dahms, H.U., Lee, S.J., Kim, S.C., Lee, W.C. and Shin, K.-S. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 104: 51–7.
- Kumar, K.S., Dahms, H.U., Won, E.-J., Lee, J.-S. and Shin, K.-S. 2015. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 113: 329–352.
- Kumar, D., Pandey, L.K. and Gaur, J.P. 2016. Metal sorption by algal biomass: From batch to continuous system. **Algal Research** 18: 95–109.
- Lee, S.R. 2018. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. **Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2019: 1-18.
- Levy, J.L., Stauberand, J.L. and Jolley, D.F. 2007. Sensitivity of marine microalgae to Copper: The effect of biotic factors on Copper adsorption and toxicity. **Science of the Total Environment** 387: 141-154.
- Liang, X., Zang, L., Natarajan, S.K. and Becker, D.F. 2013. Proline Mechanisms of Stress Survival. **Antioxidants & redox signaling** 19: 1-14.

- Lim, C.Y., Yoo, Y.H., Sidharthan, M., Ma, C.W., Bang, I.B., Kim, J.M., Lee, K.S., Park, N.S. and Shin, H.W. 2006. Effects of copper (I) oxide on growth and biochemical compositions of two marine microalgae. **Journal of Environmental Biology** 27: 461-466.
- Liu, J., Wang, J., Lee, S. and Wen, S. 2018. Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. **PLoS ONE** 13: 1-18.
- Lu, L., Ding, H., Wu, Y. and Zhang, W. 2015. The combined and second exposure effect of copper (II) and chlortetracycline on freshwater algae, *Chlorella pyrenoidosa* and *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 40: 140-148.
- Mamboya, F.A., Pratapc, H.B., Mtolerad, M. and Björk, M. 2007. Accumulation of Copper and Zinc and their Effects on Growth and Maximum Quantum Yield of the Brown Macroalga *Padina Gymnospora*. **Western Indian ocean journal of marine science** 6: 17-28.
- Marreiro, D.N., Cruz, K.J.C., Morais, J.B.S., Beserra, J.B.J., Severo, J.S. and Oliveira, A.R. 2017. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. **Antioxidants** 6: 24-37.
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A. and Goffin, D. 2015. Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. **International Journal of Molecular Sciences** 16: 23929-23969.
- Mehta, S.K. and Gaur, J.P. 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. **New Phytologist Journals** 143: 253-259.

- Merino, J.J., Parmigiani-Izquierdo, J.M., Gasca, A.T. and Cabaña-Muñoz, M.E. 2019. The Long-Term Algae Extract (*Chlorella* and *Fucus* sp) and Aminosulphurate Supplementation Modulate SOD-1 Activity and Decrease Heavy Metals (Hg⁺⁺, Sn) Levels in Patients with Long-Term Dental Titanium Implants and Amalgam Fillings Restorations. **Antioxidants** 101: 20-41.
- Mendoza, D.G., Gil, F.E.Y., Garcia, F.G., Santamaría, J.F. and Perez, O.Z. 2013. Copper Stress on Photosynthesis of Black Mangle (*Avicennia germinans*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 85: 665-670.
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L. and Malcata, F.X. 2012. Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. **Biotechnology Progress** 28: 299–311.
- Mori, I.C. and Schroeder, J.I. 2004. Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca₂₁ Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechano transduction. **Plant Physiology** 135: 702–708.
- Murmu, M., Murmu, S., Kundu, C.K. and Bera, P.S. 2017. Exogenous Proline and Glycine Betaine in Plants under Stress Tolerance. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 6: 901-913.
- Mykhaylenko, N.F. and Zolotareva, E.K. 2017. The Effect of Copper and Selenium Nanocarboxylates on Biomass Accumulation and Photosynthetic Energy Transduction Efficiency of the Green Algae *Chlorella Vulgaris*. **Nanoscale Research Letters** 12: 47-56.
- Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2014. Physical and microbiological qualities of clear bottled drinking water distributed in Nan province. **Journal of Science & Technology, Ubon Ratchathani University** 16: 57-64.

- Oukarroum, A., Perreault, F. and Popovic, R. 2012. Interactive effects of temperature and copper on photosystem II photochemistry in *Chlorella vulgaris*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 110: 9-14.
- Orzechowaska, A., Bock, R., Piramowicz, M.O., Strzałka, K. and Burda, K. 2008. Cu²⁺ binding sites in PSII. In: Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J., Osmond, B. (Eds.), **Photosynthesis: Energy from the Sun**. Springer, Netherland; 657–660.
- Oves, M., Saghir, K.M., Huda, Q.A., Nadeen, F.M. and Almeelbi, T. 2016. Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. **Journal of Bioremediation and Biodegradation** 7: 334-344
- Ozden, M., Demirel, U. and Kahraman, A. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae** 119: 163–168.
- Palipoch, S. and Koomhin, P. 2015. Oxidative Stress-Associated Pathology: A Review. **Sains Malaysiana** 44: 1441–1451.
- Parma, T.K., Rawtani, D. and Agrawal, Y.K. 2016. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in life science** 9: 110-118.
- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J. and Goltsev, V. 2018. Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. **International Journal of Molecular Sciences** 15: 1-13.
- Pavlikava, D., Pavilik, M., Staszko, L., Motyka, V., Szakova, J., Tluos, P. and Balik, J. 2008. Glutamate kinase as a potential biomarker of heavy metal stress in plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 70: 223-230.
- Patsikka, E., Aro, E.-M. and Tyystjarvi, E. 1998. Increase in the Quantum Yield of Photoinhibition Contributes to Copper Toxicity in Vivo. **Plant Physiology** 117: 619–627.

- Penarrubia, L., Romero, P., Segui, A.-C., Bordersia, A.-A. Moreno, J. and Sanz, A. 2015. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. **Frontiers in Plant Science** 6: 1-18.
- Perales, H.V., Pena-Castro, J.M. and Canizares-Villanueva, R.O. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. **Chemosphere** 64: 1-10.
- Petrovi, J., Nikoli, P. and Markovi, D. 2006. In vitro complexes of copper and zinc with chlorophyll. **Journal of the Serbian Chemical Society** 71: 501-512.
- Petsas, A.S. and Vagi, M.S. 2017. Exposure to Various Organic and Inorganic Pollutants Exposure to Various Organic and Inorganic Pollutants. **Sustainable Energy Fuels** 3: 1-10.
- Piccini, M., Railova, S., Allen, M.J. and Chuck, C.J. 2019. A synergistic use of microalgae and macroalgae for heavy metal bioremediation and bioenergy production through hydrothermal liquefaction. **Sustainable Energy Fuels** 3: 1-10.
- Pinto, E., Sigvad, K., leito, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D. and Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of phycology** 39: 1008–1016.
- Plekhanov, S. E. and Chemeris, Y.K. 2003. Early Toxic Effects of Zinc, Cobalt, and Cadmium on Photosynthetic Activity of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. **Biology Bulletin** 30: 506–511.
- Radic, S., Babic, M., Skobic, D., Roje, V. and Kozlina, P.J. 2009. Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 89: 89-97.
- Ramaraj, R., Unpaprom, Y. and Dussadee, N. 2016. Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. **International Journal of New Technology and Research** 2: 117-122.
- Ravet, K. and Pilon, M. 2013. Copper and Iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling** 19: 1-14.

- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Carvalho, J.C.M., Lodi, A., Finocchio, E. and Converti, A. 2012. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: multi-metal systems. **Journal of Hazardous Materials** 217–218: 246–255.
- Rub, F.A., Naas, M.H., Ashour, I. and Marzouqi, A. 2006. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. **Process Biochemistry** 41: 457-464.
- Saavedra, R., Munoz, R., Taboada, M.E., Vega, M. and Bolado, S. 2018. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. **Bioresource Technology** 263: 49-57.
- Saijo, Y. 1975. A method for determination of chlorophyll. **Japanese Journal of Limnology** 36: 103-109.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O. and Pontalier, P. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 35: 265-278.
- Saglam, A., Yetissin, F., Demiralay, M. and Terzi, R. 2016. **Copper stress and responses in plant**: 1-20.
- Sakset, A. and Chankaew, W. 2013. Phytoplankton as a Bio-indicator of water quality in the freshwater fishing area of Pak Phanang river Basin (Southern Thailand). **Chiang Mai Journal Science** 40: 344-355.
- Saradhi, A.P.P. 1991. Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress. **Journal of Plant Physiology** 138: 554-558.
- Sbihi, K., Cherifi, O., Gharmali, A.E., Oudra, B. and Aziz, F. 2012. Accumulation and toxicological effects of cadmium, copper and zinc on the growth and photosynthesis of the freshwater diatom *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot: A laboratory study. **Journal of Materials and Environmental Science** 3: 497-506.

- Schat, H., Sharma, S.S. and Vooijs, R. 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. **Physiologia Plantarum** 101: 477-487.
- Shahid, M., Dumet, C., Pourrut, B. and Nadeem, M. 2014. Heavy-Metal-Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity and Physicochemical Changes in Plants. **Reviews of environmental contamination and toxicology** 12: 1-45.
- Shanab, S., Essa, A. and Shalaby, E. 2012. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (*Egyptian Isolates*). **Plant Signaling & Behavior** 7: 1-8.
- Schlösser, U.G. 1982. Sammlung von Algenkulturen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft** 95; 181-276.
- Schutzendubel, A. and Polle, A. 2003. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of experimental botany** 53: 1351-1365.
- Senevirathne, M., Kim, S.-H., Siriwardhana, N., Ha, J.-H. and Jeon, Y.-J. 2006. Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. **Food Science and Technology International** 12: 12-27.
- Shama, S.D. and Chopra, R.N. 1987. Effect of lead nitrate and lead acetate on growth of the moss *Semibarbula orientanum* (Web) at many growths *in vitro*. **Journal Plant Physiology** 129: 242-249.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarali, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany** 23: 2-28.

- Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, N.R. and Singh, N. 2010. Biosorption optimization of lead (II), cadmium (II) and copper (II) using response surface methodology and amicability in isotherms and thermodynamics modeling. **Journal of Hazardous Materials** 174: 623-634.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S. and Sayre, R.T. 2002. Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. **Plant Cell** 14: 2837-2847.
- Smironoff, N. and Cumbes, Q.J. 1989. Hydroxyl radicals scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry** 28: 1057-1060.
- Sokolnik, A.Z., Asard, H., Koplinska, K.G. and Gorecki, R.J. 2009. Cadmium and zinc-mediated oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. **Acta Physiologiae Plantarum** 31: 43-49.
- Son, J.A., Narayanankutty, D.P. and Roh, K.S. 2014. Influence of exogenous application of glutathione on rubisco and rubisco activase in heavy metal-stressed tobacco plant grown in vitro. **Saudi Journal of Biological Sciences** 21: 89-97.
- Soto, P., Gaete, H. and Hidalgo, M.E. 2011. Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-*a*, and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. **Latin American Journal of Aquatic Research** 39: 280-285.
- StatSoft, An incorporated company. 2011. **STATISTICA** (data analysis software system), version 10. <http://www.statsoft.com>. Cited 18 July 2018.
- Stiborova, M. 1988. Cd²⁺ ions copper the quaternary structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from barley leaves. **Biochemie und Physiologie Pflanzen** 183: 371-378.
- Sun, X., Zhong, Y., Huang, Z. and Yang, Y. 2006. Selenium Accumulation in Unicellular Green Alga *Chlorella vulgaris* and Its Effects on Antioxidant Enzymes and Content of Photosynthetic Pigments. **PLoS ONE** 9: 1-8.

- Terry, P.A. and Stone, W. 2002. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. **Chemosphere** 47: 249-255.
- Theriappan, P., Gupta, P.K. and Dhasarathan, P. 2011. Accumulation of Proline under Salinity and Heavy metal stress in Cauliflower seedlings. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management** 15: 251-255.
- Tripathi, B.N. and Guar, J.P. 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. **Planta Toronto** 219: 397-404.
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K., Amar, A. and Gaur, J.P. 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. **Chemosphere** 62: 538-544.
- Uleses, R., Luciana Maria, R., Gabriel, V.E., Lourdes, M.M., Cristina, Z. and Maria, G.A. 2016. Water polluted with glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using *Chlorella vulgaris* growing as bioindicator. **Journal of Applied Phycology** 1: 2279-2286.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S. and Yang, X. 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany** 117: 28-40.
- Veenstra, J.N., Sanders, D. and Ahn, S. 1999. Impact of chromium and copper on fixed film biological systems. **Journal of Environmental Engineering** 125: 522-531.
- Vert, G., Gratz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerino, M.L., Briat, J.-F. and Curie, C. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. **Plant Cell** 14: 1223-1233.
- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lütz, C., Sima, E. and Lütz-Meindl, U. 2014. Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. **Journal of Plant Physiology** 171: 154-163.

- Wang, H., Sathasivam, R. and Ki, H.J. 2017. Physiological effects of copper on the freshwater alga *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae) and its potential use in toxicity assessments. **Algae** 32: 131-137.
- Wang, J.S., Chou, H.N., Fan, J-J. and Chen, C-M. 1998. Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota. **Chemosphere** 36; 1201–1210.
- Wang, S.H., Yang, Z.M., Lu, B., Li, S.Q. and Lu, Y.P. 2004. Copper induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. Botanical. **Bulletin of Academia Sinica** 45: 203–212.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J. and Ruan, R.R. 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology** 101: 2623-2628.
- Wilham, J.M. 2007. **The role of Zinc and Reactive Oxygen Species in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase**. Graduate Student Theses, Dissertations, & Professional Paper: pp. 1077
- Wintermans, J.F.G.M. and DeMots, A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta** 109: 448-453.
- Woodrow, L. 2014. **ANOVA, ANCOVA and MANOVA**. In: Writing about Quantitative Research in Applied Linguistics. Palgrave Macmillan, London, 118pp.
- Wu, J.T., Chang, S.J. and Chou, T.L. 1998a. Intracellular proline accumulation in some algae exposed to copper and cadmium. **Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei** 36: 89-93.
- Wu, J.T., Hsieh, M.-T. and Know, L.-C. 1998b. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cell. **Journal of Phycology** 34: 113-117.
- Yruela, I. 2013. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomic**: 1-20.

- Zeraatkar, A.K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A.F., Moheimani, N.R. and McHenry, M.P. 2016. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **Journal of Environmental Management** 122: 132-144.
- Zhou, G.J., Peng, P-Q., Zhang, L.-J. and Ying, G.-G. 2012. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Environmental Science and Pollution Research** 19: 2918-2929.
- Zlobin, I.E., Kholodova, V.P., Rakhmankulova, Z.F. and Kuznetsov, V.V. 2014. *Brassica napus* responses to shortterm excessive copper treatment with decrease of photosynthetic pigments, differential expression of heavy metal homeostasis genes including activation of gene NRAMP4 involved in photosystem II stabilization. *Photosynthesis Research* 125: 141–150.
- Zvezdanovi, J. and Markovi, D. 2009. Copper, iron and zinc interactions with chlorophyll in extracts of photosynthetic pigments studied by vis spectroscopy. **Structure of matter and quantum chemistry** 9: 1718-1722.

ภาคผนวก



Faculty of Fisheries, Kasetsart University

50 Ngamwongwan Rd. Chatuchak. Bangkok 10900 Thailand www.fish.ku.ac.th
Telephone +66 2 9428364, 9428936 Facimile +66 2 948364, 9427447

May 13, 2019

Department of Biology,
Faculty of Science, Prince of Songkla University,
Hat Yai Campus, Songkhla, Thailand

Dear Phruetthiphong Phetchuay

According to your submitting the manuscript, entitled " Toxicity effects of copper and zinc on the photosynthetic efficiency and oxidative stress-related parameters of the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck "to the Journal of Fisheries and Environment. The editorial committee would like to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal of Fisheries and Environment, Volume 43(2) : 2019.

Please be informed accordingly

Best wishes,

Assoc. Prof. Dr. Shettapong Meksumpun
Dean
Associate Editor
Journal of Fisheries and Environment.

Fisheries KU

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายพฤทธิพงษ์ เพชรช่วย

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810220051

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์ พนักงานจ้างเอกชนดำเนินงานปฏิบัติงานวิจัยด้านสัตว์ป่า สถานีวิจัยสัตว์ป่า ป่าพรุ-ป่าฮาลาบาลา สังกัดกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

นักวิจัยวิเคราะห์วิจัยคุณภาพแหล่งน้ำ สำนักงานอุตสาหกรรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Phetchuay, P., Peerakietkhajorn, S., Duangpan, S. and Buapet, P. 2019. Toxicity effects of copper and zinc on the photosynthetic efficiency and oxidative stress-related parameters of the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. The Journal of Fisheries and Environment 42(2): XX-XX.

Phetchuay, P., Peerakietkhajorn, S., Duangpan, S. and Buapet, P. 2019. Toxicity effects of copper and zinc on physiology of the green microalga, *Chlorella vulgaris* Beyerinck. The 9th national Algal and Plankton conference. Oral presentation. Kasetsart University, Thailand. 22-24 March 2019. (Abstract include).

Phetchuay, P., Peerakietkhajorn, S., Duangpan, S. and Buapet, P. 2019. Toxicity effects of copper and zinc on physiology of the green microalga, *Chlorella vulgaris* Beyerinck. The 5th EnvironmentAsia International conference. Oral presentation. The empress conference hall, Chiang Mai, Thailand. 13-15 June 2019. (Abstract include).

Phetchuay, P., Peerakietkhajorn, S., Duangpan, S. and Buapet, P. 2019. Toxicity effects of copper and zinc on the photosynthetic efficiency and oxidative stress-related parameters of the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. The 5th of Health Challenge. Oral presentation. The royal embassy exhibition hall, London, England. 25 June 2019. (Abstract include).