



ผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิลิกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ
และการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่



โดย
นางสาวปณญ์ธีรา แท่งหิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิงกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ
และการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่



โดย
นางสาวปณญ์ธีรา แท่งหิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

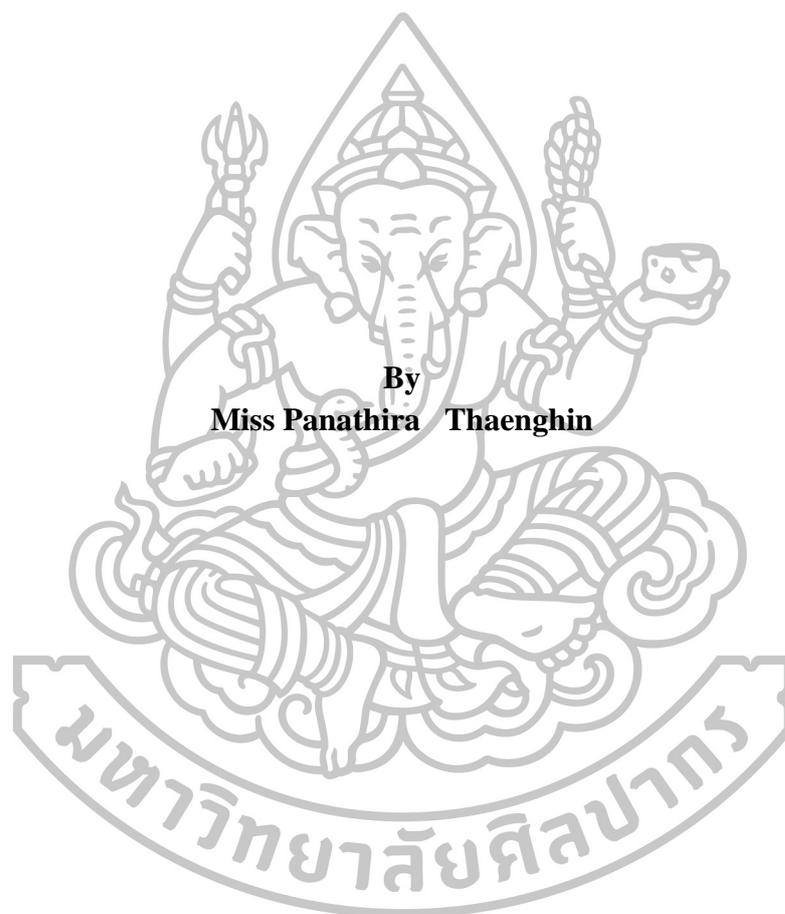
ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**EFFECT OF CADMIUM ON SILICON CONTENT, PIGMENTS,
ANTIOXIDANT ENZYME LEVEL AND PHYTOCHELATIN
FORMATION IN RICE BERRY (*ORYZA SATIVA L.*)**



**By
Miss Panathira Thaenghin**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
Master of Science Program in Chemistry study
Department of Chemistry
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2011
Copyright of Graduate School, Silpakorn University**

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศิลปากรอนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิลิกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่” เสนอโดย นางสาว ปณญ์ธีรา แห่งหิน เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ฝิวนิม

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวิตา สุวรรณชวลิต)

...../...../.....

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. เอกราชนันท์ ไชยชนะ)

...../...../.....

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ฝิวนิม)

...../...../.....



57301205 : สาขาวิชาเคมีศึกษา

คำสำคัญ : ข้าวไรซ์เบอร์รี่ แคดเมียมคลอไรด์ ซิลิกอน รงควัตถุ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ไฟโตเคโรติน

ปณญ์ธีรา แห่งหิน : ผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิลิกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร. ธนิต ผิวนิยม. 112 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุในใบ 2) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณซิลิกอนและคุณภาพของรูปร่างซิลิกอน (silicon bodies) ในส่วนต่างๆของข้าว 3) วัดระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในรากข้าว และ 4) ศึกษาการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรติน Phytochelatin ในส่วนราก ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ปลูกในระบบ hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน โดยการศึกษาข้าวกลุ่มควบคุม (กลุ่ม 1) เทียบกับกลุ่มที่ปลูกในสารละลายแคดเมียมความเข้มข้น 250 (กลุ่ม 2) และ 2500 μM (กลุ่ม 3)

ผลการวิจัยพบว่า

1. โลหะแคดเมียมมีผลทำให้ข้าวกลุ่มควบคุม กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 71.76% และ 90.63% ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลง 21.13% และ 74.38% ตามลำดับ ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินมีการลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2. ปริมาณซิลิกอนที่วัดด้วยเทคนิค ICP-OES พบว่าการเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ การศึกษารูปร่างซิลิกอน (Silicon bodies) ด้วยเทคนิค SEM พบว่า มีลักษณะการจัดเรียงตัวของกลุ่มซิลิกอนที่แตกต่างกัน ในกลุ่มควบคุมจะมีซิลิกอนจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ในขณะที่กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ นั้นมีการจัดเรียงตัวของกลุ่มซิลิกอนเป็นระเบียบน้อยกว่า

3. รากข้าวกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ มีการสร้าง reactive oxygen species เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้น 8.69 % และ 30.43 % ตามลำดับ

4. ไม่พบการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรตินในการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel Electrophoresis แม้ว่าจะเปลี่ยนระบบในการสกัดและการแยกแถบโปรตีนแล้วก็ตาม

อย่างไรก็ตามข้อมูลจาก SEM ในงานวิจัยครั้งนี้ทำให้พบสิ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับกระบวนการ rhizofiltration ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ ที่ควรจะศึกษาต่อไปในอนาคต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

57301205 : MAJOR: CHEMISTRY EDUCATION

KEY WORDS: RICEBERRY, CADMIUM CHLORIDE, SILICON, PIGMENT, ANTI-OXIDANT, EMZYME, PHYTOCHELATINS

PANATHIRA THAENGIN: EFFECT OF CADMIUM ON SILICON CONTENT, PIGMENT, ANTI-OXIDANT EMZYMES LEVEL AND PHYTOCHELATINS FORMATION IN RICEBERRY. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. THANIT PEWNIM. 112 pp.

The objectives of this research were to investigate; 1) pigment changes in Riceberry leaves, 2) contents of silicon (Si) and qualities of silicon bodies in all parts of Riceberry, 3) to assess anti-oxidative levels in Riceberry roots, and 4) to search for phytochelatin formation in Riceberry roots.

The results of this research were as the followings:

1) Cadmium significantly reduced the chlorophyll contents over the control by 71.76% and 90.63%; and carotenoid contents by 21.13% and 74.38% in Cd 250 μM treated and Cd 2500 μM treated, respectively, while the anthocyanin did not show significant changes.

2. The amount of silicon as assayed by ICP-OES varied in the three groups. Study by SEM showed that the silicon bodies appeared in an orderly fashion in control while Cd 250 μM and Cd 2500 μM treated showed less order patterns.

3. The levels of reactive oxygen species increased over control in Cd 250 μM and Cd 2500 μM treated at values of 8.69 % and 30.43 %.

4. Phytochelatin could not be detected in roots of all plant groups under investigation.

However, data from the SEM works indicated interesting points related to the rhizofiltration process of Riceberry that warranted deeper investigation.

Department of Chemistry

Graduate School, Silpakorn university

Student's signature

Academic Year 2016

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ ได้รับทุนการอุดหนุนการวิจัยจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย (สสวท.) ในโครงการทุน สวค. และสำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ผิวนิม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องเสร็จสมบูรณ์ และประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวิตา สุวรรณชวลิต และอาจารย์ ดร. เอกราพันธ์ ไชยชนะ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบและให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคูนนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความรู้ความสามารถพิเศษทาง วิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สสวค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาและการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบิดา มารดา ผู้มีพระคุณทุกท่าน และครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้ให้กับผู้วิจัยทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ขอขอบคุณ พี่ เพื่อน น้องๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ใน การทำวิจัยครั้งนี้



วิทยานิพนธ์นี้

ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความรู้ความสามารถพิเศษทาง
วิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สสวค.)

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
สมมติฐานงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
ประโยชน์ที่จะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
แคดเมียม (CdCl ₂).....	4
ข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	8
ความทนทานต่อแคดเมียมของข้าว.....	11
เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในพืช.....	13
กระบวนการสังเคราะห์แสงและรงควัตถุ.....	16
ซิลิคอน (Silicon).....	20
Gel electrophoresis.....	23
Scanning Electron Microscope (SEM).....	24
Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).....	26
Ultraviolet-visible-spectrophotometer.....	27
3 วิธีการทดลอง	
เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี.....	30
การปลูกข้าวด้วยระบบ Hydroponics.....	32
การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าว.....	34
การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ แคดเมียมและซิลิคอน.....	34
การศึกษาลักษณะการจัดตัวของซิลิกอน.....	35
การศึกษาลักษณะการยึดเกาะของแคดเมียม.....	35

	การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ	36
	การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ	37
	การแยกโปรตีน Phytochelatins	38
	การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ราก	44
	การทดสอบคาร์โบไฮเดรต.....	45
	ข้อมูลทางสถิติ (Statistical design).....	45
4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
	ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	46
	การวิเคราะห์ปริมาณโลหะแคดเมียมและซิลิกอน.....	49
	การศึกษาลักษณะของธาตุซิลิกอน.....	50
	การศึกษาลักษณะการยึดเกาะของแคดเมียม	65
	การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ.....	74
	การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DCFH-DA staining.....	77
	การศึกษาการเหนี่ยวนำโปรตีนในข้าว.....	79
	การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้สารละลาย Evans blue.....	81
	การทดสอบชนิดของน้ำตาลในข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	82
5	สรุปผลการทดลอง	
	สรุปผลการดำเนินงานวิจัย.....	83
	ปัญหาและแนวทางแก้ไข.....	84
	ข้อเสนอแนะ.....	84
	รายการอ้างอิง.....	85
	ภาคผนวก.....	90
	ภาคผนวก ก	91
	ภาคผนวก ข.....	98
	ประวัติผู้วิจัย.....	112

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณการดูดซึมแคดเมียมของข้าวทั่วไปและข้าวสาลี.....	5
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.3 การเตรียมสารเคมี.....	39
3.4 การเตรียม acrylamide gel.....	39
4.1 การเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ที่ปลูกในระบบ Hydroponics เป็นระยะเวลา 1 วัน.....	47
4.2 ปริมาณแคดเมียมและซิลิกอนที่สะสมในส่วน ราก ลำต้น และใบของข้าวไรซ์เบอร์รี่..	49
4.3 ค่า Rf แสดงชนิดของน้ำตาลในข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	82
ภาคผนวก	
ก. 1 Descriptives ของอัตราความยาวของราก.....	92
ก. 2 Anova ของอัตราความยาวของราก.....	92
ก. 3 Descriptives ของอัตราความสูงของลำต้น.....	92
ก. 4 Anova ของอัตราความสูงของลำต้น.....	92
ก. 5 Descriptives ปริมาณแคดเมียมในราก.....	93
ก. 6 Anova ปริมาณแคดเมียมในราก.....	93
ก. 7 Descriptives ปริมาณแคดเมียมในลำต้น.....	93
ก. 8 Anova ปริมาณแคดเมียมในลำต้น.....	93
ก. 9 Descriptives ปริมาณแคดเมียมในใบ.....	93
ก. 10 Anova ปริมาณแคดเมียมในใบ.....	94
ก.11 Descriptives ปริมาณซิลิกอนในราก.....	94
ก. 12 Anova ปริมาณซิลิกอนในราก.....	94
ก. 13 Descriptives ปริมาณซิลิกอนในลำต้น.....	94
ก. 14 Anova ปริมาณซิลิกอนในลำต้น.....	95
ก. 15 Descriptives ปริมาณซิลิกอนในใบ.....	95
ก. 16 Anova ปริมาณซิลิกอนในใบ.....	95
ก. 17 Descriptives ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ.....	96
ก. 18 Anova ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ.....	96
ก. 19 Descriptives ปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบ.....	96
ก. 20 Anova ปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบ.....	97
ก. 21 Descriptives ปริมาณแอนโทไซยานินในใบ.....	97
ก. 22 Anova ปริมาณแอนโทไซยานินในใบ.....	97

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางกายภาพของโลหะแคดเมียม.....	4
2.2	ลักษณะสรีระวิทยาของเมล็ดข้าวทั่วไป.....	9
2.3	ลักษณะเมล็ดของข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) รวงข้าว (ข) ข้าวที่หุงแล้ว.....	11
2.4	โครงสร้างทั่วไปของ Phytochelatins (n = 2-11).....	12
2.5	สารประกอบเชิงซ้อนของแคดเมียมและไฟโตคีเรติน	13
2.6	Biosynthesis PCs ในพืชชั้นสูง.....	13
2.7	กลไกการเปลี่ยนอนุมูลอิสระเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H ₂ O ₂) ของ SOD และ H ₂ O ₂ เปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลของน้ำ (H ₂ O) และออกซิเจน (O ₂).....	15
2.8	เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ในระบบการป้องกันร่างกายจากอนุมูลอิสระและไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ ประกอบด้วย SOD, CAT, GPx และ GR.....	15
2.9	โครงสร้างคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี.....	16
2.10	โครงสร้างของ Phycobilins.....	17
2.11	โครงสร้างและ Precursor ของแคโรทีนอยด์	18
2.12	โครงสร้างแอนโทไซยานิน.....	19
2.13	แถบแสดงความยาวคลื่นการดูดกลืนแสง.....	19
2.14	ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วย Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	23
2.15	แถบสารตัวอย่างที่แยกด้วย Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	24
2.16	เครื่อง Scanning electron microscope.....	24
2.17	หลักการทํางานของเครื่อง SEM.....	25
2.18	ลักษณะเส้นด้ายที่ถ่ายผ่านกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 500X.....	26
2.19	เครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrometry.....	26
2.20	กระบวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES.....	27
2.21	UV-VIS Spectrophotometer.....	28
2.22	หลักการทํางานของเครื่อง Ultraviolet-visible-spectrophotometer.....	28
4.1	อัตราการเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) อัตราความยาวของราก (ข) อัตราความสูง ของลำต้น(เซนติเมตร/วัน) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3.....	50
4.2	ภาพถ่าย SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในใบข้าวกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3 อายุการปลูก 16 วัน กำลังขยาย 500 เท่า.....	54
4.3	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในลำต้นข้าวกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 อายุการปลูก 16 วัน กำลังขยาย 500 เท่า.....	58

4.4	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในรากข้าวกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 อายุการปลูก 16 วัน กำลังขยาย 500 เท่า.....	64
4.5	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของตะกอนที่เกิดจากการผสมแคดเมียม กับสารละลาย Hydroponics	66
4.6	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มที่ 1 หลังปลูก ในสารละลาย Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน	67
4.7	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มที่ 2 หลัง ปลูกในสารละลาย Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน	68
4.8	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มที่ 3 หลังปลูก ในสารละลาย Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน	69
4.9	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวแห้ง ที่แช่ในสารละลาย Hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM เป็นระยะเวลา 16 วัน	70
4.10	ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวแห้ง ที่แช่ในสารละลาย Hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM เป็นระยะเวลา 16 วัน	71
4.11	กลไกการตอบสนองของรากต่อความเป็นพิษของธาตุเหล็ก (Pb) (a) Pb ฉาบบนผิวหน้า ของ Fe/Mn plaques; (b) Pb จับกับ callose บนผนังเซลล์(c) Pb ไหลเข้าสู่ plasma membrane; (d) เกิดการ Chelation ของ Pb กับ phytochelatin; (e) PC-Pb complex เคลื่อนย้ายเข้าสู่ Vacuole	73
4.12	ข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง อายุ 16 วัน ซ้ำมือคือกลุ่มที่ 1 ถัดมาคือกลุ่มที่ 2 และขวามือ คือกลุ่มที่ 3	74
4.13	ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในข้าวไรซ์เบอร์รี่	74
4.14	ปริมาณแคโรทีนอยด์ในข้าวไรซ์เบอร์รี่	75
4.15	ปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่	75
4.16	ข้อสันนิษฐานโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ a และ b ที่ถูกแทนที่ด้วย Cd^{2+} ตรงตำแหน่ง อะตอมของแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งเป็นอะตอมกลางที่มีประจุเป็นบวกสอง และมีขนาดอะตอมที่ใกล้เคียงกันกับโลหะแคดเมียม จึงสันนิษฐานว่าเมื่อ พืชได้รับแคดเมียมเข้าไปและเก็บสะสมในใบ แคดเมียมอาจจะไปแทนที่ แมกนีเซียมในโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ได้	76
4.17	แสดงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและองค์ประกอบของโมเลกุลที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ของพืชเมื่อได้รับโลหะแคดเมียม	77
4.18	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แสดงผลของ DCFH-DA staining.....	78
4.19	Fluorescence intensity DCFH-DA staining ในราก	78

4.20	แถบโปรตีนที่แยกด้วย Gel electrophoresis	79
4.21	แถบโปรตีนที่แยกด้วย Gel electrophoresis และทำ Derivatizations ด้วย mBBr..	80
4.22	ความเป็นพิษของเซลล์ที่ย้อมด้วยสารละลาย Evans blue	81
4.23	การสะสมน้ำตาลในรากข้าวไรซ์เบอร์รี่	82
ภาคผนวก		
ข. 1	การปลูกข้าวระบบ Hydroponics.....	99
ข. 2	ลักษณะใบของข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	99
ข. 2	การวัดการเจริญเติบโตข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	101
ก. 3	สารสกัดรงควัตถุคลอโรฟิลล์.....	101
ก. 4	สารสกัดรงควัตถุแคโรทีนอยด์.....	102
ก. 5	สารสกัดรงควัตถุแอนโทไซยานิน.....	102
ก. 6	การทดลองแยกแถบโปรตีนโดยใช้เทคนิค Electrophoresis.....	103
ก. 7	ดีเอ็นเอของเซลล์รากข้าวทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	106
ข. 9	ลักษณะของแคดเมียมในรากข้าว.....	107



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ช่วงเวลาที่ผ่านมา มีเหตุการณ์หลายอย่างเกี่ยวกับภัยอันตรายของโลหะแคดเมียม (Cd) ที่มีผลกระทบต่อมนุษย์ เช่น การเกิดโรคอิไต-อิไต ขึ้นในประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี ค.ศ. 1946 ที่เป็นเหตุการณ์ที่เกิดจากพิษของแคดเมียมที่รุนแรงครั้งแรก หรือการเจ็บป่วยของแคดเมียมในข้าวปริมาณที่สูงเกินกำหนดในเขตท้ายเหมืองสังกะสีของจังหวัดแม่ฮ่องสอน หรือการเจ็บป่วยของแคดเมียมปรอท ในอาหารหรือภาชนะต่างๆ ฯลฯ ส่งผลให้ทั้งภาครัฐและเอกชนได้ตระหนักและให้ความสำคัญเกี่ยวกับการจัดการ หาทางแก้ไข หรือป้องกันการปนเปื้อนของโลหะแคดเมียมและโลหะหนักอื่นๆ ทั้งในสิ่งแวดล้อมและสินค้าอุปโภคบริโภคกันเป็นอย่างมาก ประกอบกับช่วงศตวรรษที่ 20 เป็นต้นมา ประเทศไทยได้มีการขยายตัวของตัวเมืองและภาคอุตสาหกรรมอย่างรวดเร็วทำให้มีการปล่อยโลหะหนักออกสู่สิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่เป็นพวกตะกั่ว ปรอท แคดเมียม และโครเมียม ทำให้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นประเทศที่ยึดอาชีพการเกษตรเป็นหลัก มีการใช้ปุ๋ยเคมี สารกำจัดศัตรูพืช หรือยาฆ่าแมลง ในกระบวนการผลิต ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีโลหะแคดเมียม ตะกั่ว และทองแดง เจือปนอยู่ เมื่อมีการปนเปื้อนโลหะหนักสะสมในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้นจะเกิดการแพร่กระจายไปสู่แหล่งน้ำ อากาศและดิน รวมถึงพืช หากมีการปลูกพืชในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน โลหะหนัก พืชที่มีความสามารถในการดูดซึมโลหะหนักก็จะสามารถสะสมโลหะหนักในส่วนต่างๆ และโลหะเหล่านั้นก็จะถูกเคลื่อนย้ายเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ตามวัฏจักรห่วงโซ่อาหารต่อไป

ข้าวเป็นพืชชั้นสูงที่มีความสามารถในการดูดซึมโลหะหนักจากดินหรือน้ำและเก็บสะสมในเซลล์ได้ มนุษย์บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักจึงหลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะได้รับโลหะหนักเข้าสู่ร่างกายโดยตรงส่งผลกระทบต่อสุขภาพอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้เล็งเห็นถึงความสำคัญ และได้มีการวิจัย ค้นคว้าเกี่ยวกับผลกระทบของของโลหะหนักต่อข้าวสายพันธุ์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก เช่น การศึกษาผลของแคดเมียมต่อข้าวในพื้นที่อำเภอจิตตะกอง ประเทศบังกลาเทศ (Kibria et al., 2006) ผลของแคดเมียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในประเทศศรีลังกา (Herath et al., 2014) กลไกการดูดซึมและผลกระทบของโลหะแคดเมียมในข้าว (Rizwan et al., 2016) หรือในประเทศไทยเองก็ได้มีการวิจัยอยู่บ้าง เช่น ผลของแคดเมียมต่อข้าวในกลุ่มน้ำแม่ตา จังหวัดตาก (ปลื้มพวง et al., 2557) เป็นต้น

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาขึ้นมาใหม่ในประเทศไทยและเป็นประเทศเดียวในตอนนี้ที่ปลูกข้าวประเภทนี้ และปัจจุบันยังไม่มีที่แพร่หลายพบยังปลูกเฉพาะในเขตภาคกลางที่มีที่นาอุดมสมบูรณ์เท่านั้น เพราะเป็นข้าวสายพันธุ์ที่ต้องได้รับการดูแล เอาใจใส่เป็นพิเศษกว่าข้าวสายพันธุ์ทั่วไป ข้าวไรซ์เบอร์รี่มีคุณสมบัติเด่นหลายด้านที่น่าสนใจซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยที่ผ่านมามุ่งเน้น

งานวิจัยด้านคุณค่าทางโภชนาการของข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นส่วนใหญ่ แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาในด้าน การตอบสนองของข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก ซึ่งในความเป็นจริงเกษตรกรไม่สามารถ หลีกเลี่ยงหรือมีหลักการสังเกตได้ด้วยตาเปล่าว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ปลูกในพื้นที่นา มีการดูดซึมโลหะ แคลเดียมเข้าไปหรือไม่ มากน้อยเพียงใด หรือหากนำไปปลูกในบริเวณอื่นๆ ที่มีการปนเปื้อนของ แคลเดียม ข้าวชนิดนี้จะสามารถทนต่อความเป็นพิษได้หรือไม่ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาลักษณะ ทางกายภาพและชีวภาพของข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ปลูกในระบบ Hydroponics ที่มีโลหะแคลเดียมที่ความ เข้มข้นต่ำ (250 μM) และสูง (2500 μM) ร่วมด้วย โดยจะทำการศึกษาในด้านผลต่อการเปลี่ยนแปลง รงควัตถุ การสะสมซิลิกอน ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การเหนี่ยวนำสร้างโปรตีนไฟโตคีเรติน Phytochelatins และสมบัติด้านอื่นๆ เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษา เป็นพื้นฐานในการนำไปใช้ ประโยชน์ตลอดจนพัฒนาการวิจัยอื่นๆ รวมถึงอาจนำไปวิเคราะห์ร่วมกับข้าวสายพันธุ์อื่น เพื่อ เลือกปลูกในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยให้เหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณและคุณภาพของ Silicon ในต้นข้าว
- 1.2.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุในใบ
- 1.2.3 วัดระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในราก
- 1.2.4 ศึกษาการสร้างโปรตีนไฟโตคีเรติน Phytochelatins ในส่วนราก

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

- 1.3.1 แคลเดียมมีผลทำให้ปริมาณ Silicon ในส่วนต่างๆ ของข้าวลดลง และลักษณะของ ธาตุที่อยู่ในพืชเปลี่ยนแปลงไป
- 1.3.2 แคลเดียมมีผลทำให้ระดับรงควัตถุในใบข้าวลดลง
- 1.3.3 แคลเดียมมีผลทำให้ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น
- 1.3.4 แคลเดียมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน Phytochelatins ในราก ข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.4.1 ปลูกข้าวในระบบ Hydroponics ที่มีแคลเดียมที่ความเข้มข้น 0, 250 และ 2500 μM จะได้ทั้งหมด 3 กลุ่มตัวอย่าง ปลูกเป็นระยะเวลา 16 วัน
- 1.4.2 วัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุ 3 ประเภท ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และ แคโรทีนอยด์ในใบข้าว โดยใช้เทคนิค Spectrophotometer
- 1.4.3 ใช้เทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) ในการวิเคราะห์ปริมาณซิลิกอนและแคลเดียมในส่วนใบ ลำต้น และราก ของต้นข้าว
- 1.4.4 ศึกษาลักษณะซิลิกอนและการยึดเกาะของแคลเดียมโดยการถ่ายภาพทาง Scanning electron microscope (SEM)
- 1.4.5 วัดการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการย้อมด้วยสารละลาย DCFH-DA ร่วมกับการใช้เทคนิค UV-vis Spectrophotometry

1.4.6 การสร้างโปรตีน Phytochelatins ในรากข้าว แยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของแคดเมียม 3 ระดับความเข้มข้น ที่มีต่อลักษณะทางชีวภาพและกายภาพบางประการของข้าวไรซ์เบอร์รี่เพียงสายพันธุ์เดียว ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) อายุ 16 วัน

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 แคดเมียม คือ สารละลายแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$)

1.6.2 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ คือ ข้าวที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ลักษณะเป็นข้าวเจ้า สีม่วงเข้ม รูปร่างเมล็ดเรียวยาว อายุหลังเก็บเกี่ยว 60 วัน

1.6.3 ระบบ Hydroponics (DFT (Deep Flow Technique) คือ เป็นระบบที่ปลูกพืชโดยรากแช่อยู่ในสารละลายลึกประมาณ 15 - 20 เซนติเมตร โดยจะมีการปลูกข้าวบนวัสดุที่ลอยน้ำได้เพื่อยึดลำต้นแต่จะปล่อยให้รากเป็นอิสระในน้ำเป็นระบบที่มีการหมุนเวียนตลอดเวลา

1.6.4 รงควัสดุในพืช คือ คลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์

1.6.5 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ คือ เอนไซม์ที่ควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่สมดุล ประกอบด้วย superoxide dismutase, Catalase และ Peroxidase

1.6.6 โปรตีนไฟโตเคโรติน คือ โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นจาก GSH มีหน้าที่ทำลายพิษของโลหะหนัก โปรตีนไฟโตเคโรตินจะจับกับโลหะหนักนั้นด้วยพันธะโคออดิเนชันกับหมู่ไทออล (Thiols Group; SH)

1.6.7 การตายของเซลล์ คือ สภาวะที่เซลล์ถูกโลหะแคดเมียมทำลายให้เกิดความเสียหาย

1.7 ประโยชน์ที่ได้รับ

เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยอื่นๆ รวมถึงอาจนำไปวิเคราะห์ร่วมกับข้าวสายพันธุ์อื่น เพื่อเลือกปลูกในพื้นที่ต่างๆ ตามภูมิประเทศและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยให้เหมาะสมต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แคดเมียม

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแคดเมียม

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงอีกชนิดหนึ่งที่มีน้ำหนักอะตอม 112.40 เลขอะตอม 48 อยู่คาบที่ 5 ของตารางธาตุ มีจุดหลอมเหลว 320.9°C และมีจุดเดือด 767°C ผลึกเป็นรูปหกเหลี่ยม (Hexagonal) เป็นโลหะสีขาวเงิน โค้งงอง่าย พบในผิวดินประมาณ 0.15 ppm มักพบร่วมกับสังกะสี แคดเมียมในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของแคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) แคดเมียมและสารประกอบแคดเมียมนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมกว้างขวาง และพบเจือปนในปุ๋ยและยาฆ่าแมลง พิษของแคดเมียมถูกรายงานไว้ครั้งแรกเมื่อปี 1946 ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่รุนแรงสำหรับผู้ที่อยู่อาศัยริมแม่น้ำ Jinzu หมู่บ้าน Miyagawa ในประเทศญี่ปุ่น เนื่องมาจากของเสียจากโรงงานผลิตตะกั่วและสังกะสีที่ชื่อว่า Kamioka เป็นผลพลอยได้ในการผลิตสังกะสี (สังกะสี 1 ตันจะได้แคดเมียม 6.2 ปอนด์) ทั้งนี้เนื่องจากการระบายน้ำของโรงงานลงสู่แม่น้ำและยังพบว่าบริเวณใกล้เคียงทำการเกษตรไม่ได้ผล ต่อมาก่อให้เกิดโรคและตายในสิ่งมีชีวิตรวมถึงมนุษย์ นักวิทยาศาสตร์จึงได้ค้นคว้าหาสาเหตุจนพบว่า เกิดจากแคดเมียม และให้ชื่อโรคนี้ว่า ITAI-ITAI (สุหร้าย., 2537) ภาพที่ 2.1 แสดงโลหะแคดเมียม



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของโลหะแคดเมียม
(ที่มา : <https://a2ua.com/cadmium.html> เข้าถึงเมื่อ 2 สิงหาคม 2559)

แหล่งของแคดเมียมนั้นนอกจากจะพบอยู่ร่วมกับสังกะสีดังที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว ยังพบว่ามีการเจือปนในแร่ธาตุทั่วไปอัตราส่วน 1:100 และพบในดินอัตราส่วน 1:1000 ส่วนอีกด้วย นอกจากนี้แคดเมียมยังกระจายไปในอากาศ น้ำ เนื่องจากการใช้เชื้อเพลิงต่างๆ จากการถลุงแร่ หรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้แคดเมียม เช่น โรงงานสังกะสี โรงงานพลาสติก โรงงานสี ปู่ยงฟอสเฟต เป็นต้น ได้เคยมีงานวิจัยของ Kobayashi ในการดูดัซิมแคดเมียมของข้าวทั่วไปและข้าวสาลีโดยได้รายงานเป็นค่า Yield แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการดูดัซิมแคดเมียมของข้าวทั่วไปและข้าวสาลี

Addition of Cd to soil (% of CdO)	Rice Cd ($\mu\text{g/g}$)			Rice Cd ($\mu\text{g/g}$)	
	Yield (%)	Polished (10%)	Bran	Yield (%)	Whole grain
0	100	0.16	0.59	100	0.44
0.001	100	0.28	0.79	106	8.27
0.003	92	0.40	0.84	72	15.5
0.03	93	1.37	2.68	13	41.4
0.1	69	1.62	2.94	3	60.7
0.3	32	1.94	3.19	3	48.6
0.6	19	1.73	3.94	2	90.8
1	1	-	-	1	139.0

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่หลายฉบับที่ยืนยันว่าแคดเมียมมีการดูดัซิมเข้าไปในรากข้าว ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของแคดเมียมในบริเวณนั้นๆ (สุหรัยและวินนา., 2537)

2.1.2 ประโยชน์ของแคดเมียม

แคดเมียมถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ และสินค้าอุปโภคดังนี้

2.1.2.1 ใช้ผสมกับโลหะอื่นเป็นโลหะผสมอัลลอยด์ (alloy) เพื่อเพิ่มความเหนียวและความทนทานต่อการกัดกร่อน เช่น

1) อัลลอยด์ของทองแดงที่มีแคดเมียม 1%(cadmium bronze) ใช้ในการผลิตเลนส์ โทรเลขและโทรศัพท์

2) อัลลอยด์ของทองแดงและตะกั่ว ซึ่งมีแคดเมียมผสมอยู่ 20% ใช้ในการผลิตแบบพิมพ์ (printing plates)

3) อัลลอยด์ของทองแดง แคดเมียม และเซอร์โคเนียม ใช้ในอุปกรณ์การสื่อสารต่างๆ ที่มีศักย์ไฟฟ้าสูงๆ ทั้งนี้ เพราะโลหะผสมประเภทนี้จะมีความแข็งและมีแรงดึงได้สูงกว่าโลหะผสมของทองแดง กับแคดเมียม

4) ใช้แคดเมียมใช้ผสมกับโลหะอื่นในอุตสาหกรรมเพชรพลอยและเครื่องประดับอัญมณี ต่างๆ โดยอาจผสมกับโลหะอื่นชนิดเดียว(ผสมทอง) ผสมกับโลหะอื่น 2 ชนิด (ทอง 75% เงิน 16.6%) ผสม กับโลหะอื่น 3 ชนิด(ทองแดง เงิน และทอง)

5) ใช้แคดเมียมที่มีความบริสุทธิ์สูงๆในการผสมกับโลหะอื่นเพื่อให้มีคุณสมบัติกึ่งตัวนำ (semiconductor) เช่น cadmium arsenide , cadmium antimonide และ cadmium telluride

2.1.2.2 นำไปใช้ในการชุบโลหะโดยใช้แคดเมียมเคลือบบนแผ่นเหล็ก ทองแดง อะลูมิเนียม โดยการชุบด้วย ไฟฟ้า โลหะที่ได้จากการชุบนำไปใช้เป็นสกรูประกอบของเครื่อง อยุ่ยนต อุปกรณ์ไฟฟ้า อุปกรณ์ อิเล็กทรอนิกส์วิทยุ เป็นต้น

2.1.2.3 ใช้เป็นเม็ดสีในอุตสาหกรรม สารประกอบแคดเมียมซัลไฟด์และแคดเมียมซัลโฟไซด์ใช้ในการ ใสในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น สีอีนามเมล เซรามิกยาง แก้ว ฝา เสนใย หนึ่ง หมึกพิมพ์และพลาสติก

2.1.2.4 ใช้ผลิตแบตเตอรี่ โดยใช้ร่วมกับโลหะนิกเกิลเป็น Cd – Ni battery ซึ่งนำมาใช้เป็นแบตเตอรี่ใน เครื่องคิดเลขแฟลชฉายรูป เครื่องโกนหนวด นาฬิกาและวิทยุเล็กๆ เป็นต้น

2.1.2.5 ใช้ในกิจการอื่น ๆ เช่น

- 1) ใช้ผสมในสารฆ่าเชื้อรา ที่ใช้ในกิจการเกษตร
- 2) ใช้ในเตาปฏิกรณ์ปรมาณูเป็นตัวควบคุมการแตกตัวของนิวเคลียร์
- 3) ใช้ในการผลิตหลอดฟลูออเรสเซนต์
- 4) ใช้ในการถายรูป เช่น Cd – Br, Cd – I
- 5) สารประกอบแคดเมียมบางชนิดใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวของ

พลาสติก เช่น cadmium stearate

6) ใช้ในการผลิตอุปกรณ์ต่างๆ ที่ต้องทนความร้อน เช่น ทำหม้อน้ำ อยุ่ยนต อุปกรณ์ทำความเย็นต่างๆ ที่ต้องระบายความร้อนมากๆ

ความเป็นพิษของแคดเมียม จากการที่แคดเมียมถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมและสินค้าอุปโภคบริโภคที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงทำให้โลหะแคดเมียมเกิดการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม บรรยากาศและในอาหาร ทำให้เราได้รับ แคดเมียมเข้าสู่ร่างกายได้หลายทางโดยไม่รู้ตัว คนทั่วไปจะได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจากอาหารที่บริโภคเข้าไปเป็นหลักโดยอาจติดปะปนมากับพืชผัก ผลไม้หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่นำมาปรุงเป็นอาหาร แคดเมียมอาจจะละลายอยู่ในน้ำที่เราดื่มและได้รับจากอากาศ โดยการหายใจเอาอากาศที่มีฝุ่นแคดเมียมฟุ้ง กระจายอยู่ โดยเฉพาะในแหล่งอุตสาหกรรมที่มีการใช้แคดเมียมเป็นวัตถุดิบ เช่น โรงงานทำแบตเตอรี่ หรือ บริเวณที่เป็นเหมืองทำแร่ สังกะสีตะกั่ว ทองแดง ที่มีแคดเมียมปนอยู่ด้วย การสัมผัสกับสิ่งของที่มีแคดเมียมปนสกรูประกอบและการอยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในอากาศนานๆ จะทำให้แคดเมียมซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายเราได้ด้วย สำหรับผู้ที่สูบบุหรี่จัดจะทำให้ได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายเพิ่มขึ้น โดยไปสะสมอยู่ที่ตับและไต ทำให้เกิดพิษสะสมในคนได้ การขับแคดเมียมออกจากร่างกายนั้นไปค่อนข้างช้า เพราะวงจรครึ่งชีวิตของแคดเมียมในร่างกายมนุษย์นั้นมีระยะเวลาประมาณ 16 -33 ปี

ความเป็นพิษของแคดเมียม แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ ดังนี้

1) ความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

1.1) ความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เมื่อร่างกายได้รับแคดเมียมโดยการกิน ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการกินอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีโลหะแคดเมียมปนเปื้อนหรือบรรจุในภาชนะที่เคลือบด้วยแคดเมียม อาการที่ปรากฏเริ่มแรก คือ รู้สึกคลื่นเหียนอย่างรุนแรง อาเจียน ท้องร่วง เป็นตะคริว และน้ำลายฟุ้งปาก ในรายที่ปนมากอาจเกิดอาการช็อคเนื่องจากร่างกายสูญเสียน้ำมาก ระบบการทำงานของไตล้มเหลวและอาจถึงตายได้

1.2) ความเป็นพิษต่อระบบหายใจ การสูดหายใจเอาไอของแคดเมียมเข้าไปทำให้เกิด อาการระคายเคืองที่หลอดลม ปอด จมูก ลำคอและยังทำให้เกิดอาการไอ เวียนศีรษะอ่อนเพลีย หนาวสั่น มีไข้และเจ็บหน้าอก

2) ความเป็นพิษแบบเรื้อรัง ความเป็นพิษจากแคดเมียมที่เกิดกับคนส่วนใหญ่ มักเป็นแบบชนิด เรื้อรังซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายได้รับแคดเมียมเข้าไปเป็นเวลานานติดต่อกัน ได้แก่

2.1) ความเป็นพิษต่อปอดในคนที่หายใจเอาฝุ่นหรือไอ (fume) ของแคดเมียมเข้าไปติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดการบวมหรือฟองของเนื้อเยื่อปอด ประสิทธิภาพในการระบายลมของ ปอดจะลดลง ทำให้อากาศอยู่ภายในปอดนานกว่าปกติมีอาการหายใจขัดหรือหายใจไม่ออก และนอกจากนี้ยังพบว่าแคดเมียมทำให้เกิดโรคถุงลมโป่งพองและมีพังผืดในปอดจับในทางเดินหายใจส่วนล่าง เนื่องจากแคดเมียมจะเป็นตัวไปขัดขวางการสร้าง antitrypsin ซึ่งเป็นตัวควบคุม trypsin ในร่างกายคน ซึ่งสาร trypsin นี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคถุงลมโป่งพองได้

2.2) ความเป็นพิษต่อไต ผู้ที่ได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายนานติดต่อกันจะพบความเป็นพิษที่ไตก่อนที่ปอดโดยจะเกิดผลที่ไต พิษต่อไตจะปรากฏโดยผู้ป่วยมีอาการของโปรตีนยูเรีย คือ ไตจะมีการขับ ปัสสาวะที่มีโปรตีนมากกว่าปกติซึ่งโปรตีนที่ขับออกมาส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น microglobulin lysozyme ribonuclease retinol binding protein และ immunoglobulin chains โดยชนิด ของโปรตีนที่ถูกขับออกมาจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าไตส่วนใดถูกทำลาย เช่น ถ้าโปรตีนขนาดใหญ่ถูกขับออกมา แสดงว่าโกลเมอรูลัส (glomerulus) ถูกทำลาย แต่ถ้าเป็นโปรตีนขนาดเล็กถูกขับออกมา แสดงว่า ส่วนของทิวบูลถูกทำลาย นอกจากโปรตีนแล้ว ยังอาจมีสารอื่นๆ ถูกขับออกมากผิดปกติด้วย เช่น กรดอะมิโน ทำให้เกิดอาการ aminoaciduria แคลเซียม ทำให้เกิดอาการ hypercalcemia และ กลูโคส ทำให้เกิด อาการ glucosuria เป็นต้น

2.3) ความเป็นพิษที่กระดูก ที่ปรากฏเด่นชัดในกรณีการเกิดโรค อีไต อีไต โรคชนิดนี้เป็นโรคกระดูกผุ คือ กระดูกจะพรุน กระดูกโกลงอโคงไตจะทำให้กระดูกเสียรูปทรง แตกร้าวและหักได้ เนื่องจากร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้น้อยลง

2.4) ความเป็นพิษต่อระบบเลือดและระบบการสลายเม็ดโลหิต จะทำให้เกิด ความดันโลหิตสูง เป็นสาเหตุให้เกิดโรคหัวใจ หัวใจเต้นผิดปกติ ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคอีไต-อีไต และกลุ่ม คนงานที่ต้องสัมผัสกับแคดเมียมจะพบอาการของโรคโลหิตจางด้วย

2.5) ความเป็นพิษต่อตับ มีรายงานค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อตับในคน แต่จากการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่า แคดเมียมในปริมาณน้อย (ในน้ำดื่ม 1 ppm) มีผลทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ในตับเปลี่ยนไป

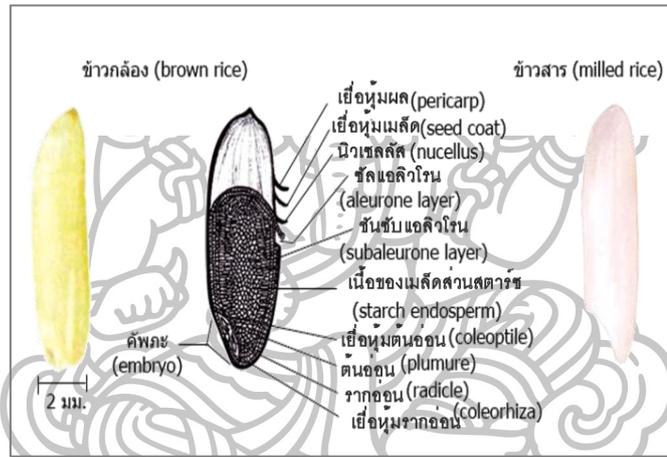
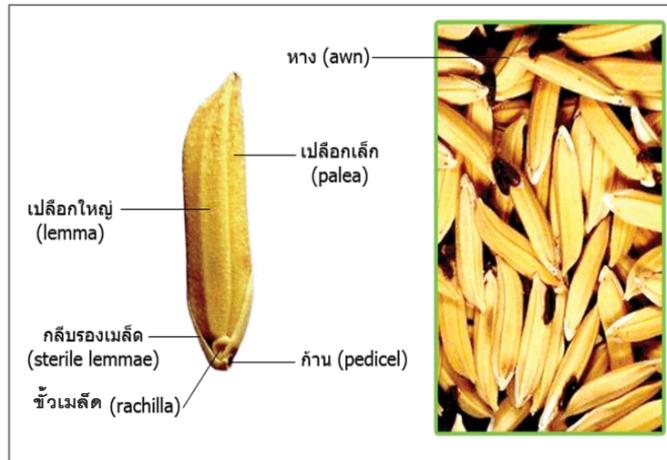
2.6) จากการทดลองในสัตว์พบว่า แคดเมียมยังเป็นสารก่อมะเร็ง โดยทำให้เกิดมะเร็งของ เนื้อเยื่อที่อยู่ลึก (sarcoma) เช่น กล้ามเนื้อกระดูกในหนูทดลอง

2.2 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry)

ข้าวเป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่เป็นอาหารหลักของประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั่วโลก ข้าวเป็นสายพันธุ์เดียวกับหญ้าที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายทางชีวภาพ ปลูกง่ายทนต่อทุกสภาพภูมิประเทศของโลก ข้าวชนิดแรกที่เกิดขึ้นในโลกคือ ข้าวป่า พบเมื่อ 16,000-13,000 ปีที่แล้วหลังจากที่สัตว์เริ่มสูญพันธุ์ มนุษย์หันมาบริโภคของป่าเป็นอาหาร โดยประเทศจีนเป็นแหล่งกำเนิดการปลูกข้าวที่แรก เริ่มต้นเป็นการปลูกไร่เลื่อนลอย ต่อมาเมื่อ 9,000 ปีก่อน ได้มีการพัฒนาโดยนำมาปลูกเป็นนาหว่าน และเข้าสู่รูปแบบการปักดำเมื่อ 5,000 ปีที่แล้ว ข้าวบนโลกมีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่นำมาปลูกมีเพียง 2 ประเภท คือ *Oryza Sativa* ที่นิยมปลูกในเอเชียและ *Oryza glaberrina* ที่ปลูกในแอฟริกา

2.2.1 ลักษณะสรีระวิทยาของข้าวและเมล็ดข้าว

ลักษณะสรีระวิทยาของข้าวและเมล็ดข้าว แสดงดังภาพที่ 2.2 เมล็ดข้าวจะห่อหุ้มด้วยเปลือกหลายชั้น โดยชั้นนอกสุดจะเป็นเซลลูโลสหรือเรียกว่าแกลบ และถัดจากชั้นแกลบเป็นส่วนที่มีสีคล้ำ เรียกว่า เฮมิเซลลูโลสหรือข้าวกล้อง ในเมล็ดข้าวกล้องจะประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งส่วนแรกเรียกว่าจมูกข้าว (germ) และส่วนเมล็ดข้าวสีขาว (Endosperm) หรือข้าวขาว ซึ่ง 2 ส่วนนี้จะห่อหุ้มด้วยชั้นรำข้าว (rice bran) ซึ่งประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดหลายชั้น เยื่ออาลูโรน (aleurone layer) หรือชั้นรำละเอียด เป็นชั้นในสุดที่ติดกับเอนโดสเปิร์ม ในชั้นนี้จะมีโปรตีนและไขมันสูง และส่วนที่ติดอยู่ทางด้าน lemma จะเป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นต่อไปประกอบด้วย cellulose และ hemicellulose จมูกข้าว (germ) ต้นอ่อน (plumule) รากอ่อน (radicle) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) เยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) ท่อน้ำท่ออาหาร (epiblast) และใบเลี้ยง (scutellum) ส่วนนี้จะมีโปรตีน ไขมันวิตามินและแร่ธาตุสูง ส่วนเมล็ดข้าวสารที่นำมารับประทานเรียกว่า เอนโดสเปิร์ม (endosperm) มีคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่เป็นสตาร์ช (starch) เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ และในสตาร์ช (starch granule) จะมี amylose และ amylopectin เป็นส่วนประกอบหลัก โปรตีนในข้าวที่ขัดสีแล้วมีปริมาณ ร้อยละ 7-8 แบ่งออกเป็น 4 ชนิดได้แก่ albumin, globulin, prolamin และ glutelin ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะช่วยขัดขวางการพองตัวของเม็ดสตาร์ช (starch granule)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะสรีระวิทยาของเมล็ดข้าวทั่วไป
 (ที่มา : <http://www.organicricedelivery.com/article/12/>
 สรีระวิทยาของข้าว-ส่วนประกอบของต้นข้าว-เมล็ดข้าว เข้าถึงเมื่อ 2 สิงหาคม 2559)

2.2.2 ประเภทของข้าว

ข้าวที่ใช้เป็นอาหารนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ข้าวพันธุ์ *Oryza saiva* ที่ปลูกในทวีปเอเชียและ *Oryza glaberrima* ปลูกในทวีปแอฟริกา ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวยังสามารถแบ่งได้ตามแหล่งปลูกอีก คือ

ข้าวอินดิกา (Indica rice) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตร้อนตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในอินเดียและต่อมาได้พัฒนาไปปลูกที่ทวีปอเมริกา

ข้าวจาปอนิกา (Japonica rice) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี มีลักษณะเมล็ดป้อมกลมรี ต้นเตี้ย

ข้าวจาวานิกา (Javanica rice) ปลูกในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ มีเมล็ดป้อมใหญ่ แต่ไม่ได้รับความนิยมเพราะให้ผลผลิตต่ำข้าวที่ปลูกในไทยเป็นพันธุ์ข้าวเมล็ดยาว คือ ข้าวอินดิกา พันธุ์ที่สร้างชื่อเสียงให้กับไทยมากที่สุด คือ ข้าวหอมมะลิ (jasmine rice)

การจำแนกชนิดของข้าวตามประเภทของเนื้อใน หรือองค์ประกอบทางเคมีในเมล็ด ข้าวสารแบ่งได้เป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งมีต้นและลักษณะอย่างอื่นเหมือนกันทุกอย่างแตกต่างกันที่ประเภทของเนื้อแข็งในเมล็ด

ข้าวเจ้า สตาร์ช จากข้าวเจ้า ประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) ประมาณร้อยละ 9-33 พันธุ์ข้าวเจ้า ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, ปทุมธานี 60, กข7, เหลืองประทิว 123, ขาวตาแห้ง 17, พัทลุง 60, สุพรรณบุรี 1, สุรินทร์ 1

ข้าวเหนียว สตาร์ชจากข้าวเหนียว ประกอบด้วยอะไมโลเพกทิน (amylopectin) เป็นส่วนใหญ่และมี amylose เพียงเล็กน้อย ประมาณร้อยละ 5-7 เท่านั้น พันธุ์ข้าวเหนียว ได้แก่ สันป่าตอง 1 สกลนคร กข 2 สกลนคร กข 6 และสกลนคร กข 8

การจำแนกชนิดของข้าวเจ้าตามปริมาณ amylose และเนื้อสัมผัสของข้าวหุงสุก แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

- 1) ข้าวที่มีปริมาณ amylose ต่ำ (9-20%) ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 105, กข.15, ปทุมธานี 1 และ กข 21 ลักษณะข้าวสุกจะเหนียวและนุ่ม
- 2) ข้าวที่มีปริมาณ amylose ปานกลาง (20-25%) ได้แก่ กข. 23, กข. 7, สุพรรณบุรี 2 และ สุพรรณบุรี 60 ลักษณะข้าวสุกจะค่อนข้างเหนียวและนุ่ม
- 3) ข้าวที่มีปริมาณ amylose สูง (25-33%) ได้แก่ เหลืองประทิว 123, ชัยนาท 1 และ สุพรรณบุรี 90 ลักษณะข้าวสุกจะร่วนและแข็ง

2.2.3 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae อยู่ในวงศ์ย่อย Bambusoideae เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์จากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว โดยความร่วมมือของคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ลักษณะเป็นข้าวเจ้า เมล็ดสีม่วงเข้มแกมดำ รูปร่างเมล็ดเรียวยาวเหมือนข้าวหอมมะลิทั่วไป เป็นข้าวที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายประเภทและมีปริมาณสูง เช่น เบต้าแคโรทีน แกมมาโอไรซานอล วิตามินอี แทนนิน สังกะสี และฟิลาตสูง มีดัชนีน้ำตาลต่ำถึงปานกลาง



(ก)

(ข)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะเมล็ดของข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) รวงข้าว (ข) ข้าวที่หุงแล้ว
(ที่มา : <http://decembertown.com/ข้าวไรซ์เบอร์รี่/> และ <http://arkadej.com/site/www.ikaset.com/> เข้าถึงเมื่อ 4 สิงหาคม 2559)

สารอาหารสำคัญที่อยู่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ ประกอบด้วยโอเมก้า 3 กรดไขมันจำเป็น มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของสมอง ตับและระบบประสาท ลดระดับคอเลสเตอรอล ธาตุสังกะสี ช่วยสังเคราะห์โปรตีน สร้างคอลลาเจน รักษาผิว ป้องกันผมร่วง กระตุ้นรากผม ธาตุเหล็ก สร้างและจ่ายพลังงานในร่างกาย เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง และเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจนในร่างกาย และสมอง วิตามินอี ชะลอความแก่ ผิวพรรณสดใส ลดอัตราเสี่ยงของโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดสมองและหัวใจ ทำให้ปอดทำงานดีขึ้น วิตามินบี 1 จำเป็นต่อการทำงานของสมอง ระบบประสาท ระบบย่อย ป้องกันโรคเหน็บชา เบต้าแคโรทีน (สารตั้งต้นของวิตามินเอ) ช่วยชะลอความแก่ ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง บำรุงสายตา ลูทีน ป้องกันจอประสาทตาเสื่อม บำรุงการไหลเวียนของเลือดในเส้นเลือดฝอยที่หล่อเลี้ยงตา โพลีฟีนอล ทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง แทนนิน แก๊ท้อกรัง แก๊ทิด สมานแผล แผลเปื่อย แกมมา ไออโรซานอล ลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในหลอดเลือด ทำให้เลือดหมุนเวียนไปเลี้ยงอวัยวะส่วนต่างๆ ได้อย่างเป็นปกติ ลดอัตราเสี่ยงของโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง สมองเสื่อม นอกจากนี้ เส้นใยอาหาร (fiber) มีอยู่ปริมาณมากในข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ ช่วยลดระดับไขมันและคอเลสเตอรอล ป้องกันโรคหัวใจ ช่วยควบคุมน้ำหนัก ช่วยระบบขับถ่าย

2.3 ความทนทานต่อแคดเมียมของข้าว

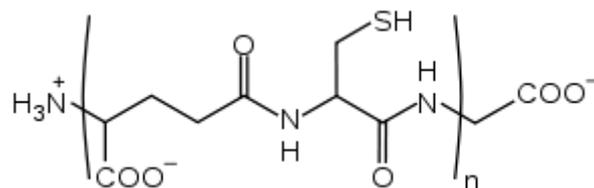
2.3.1 ความเป็นพิษของแคดเมียม

แคดเมียมมีความเป็นพิษที่รุนแรงต่อข้าว รากข้าวทำหน้าที่ดูดซึมน้ำและแร่ธาตุขึ้น ไปสู่ลำต้น เมื่อมีการดูดซึมแคดเมียมร่วมด้วยจะมีกระบวนการต่อต้านทั้งระดับกายภาพและระดับโมเลกุล เมื่อรากสัมผัสกับแคดเมียมจะต่อต้านความเป็นพิษนี้ด้วยการแบ่งส่วนทันที เพื่อให้แคดเมียมเคลื่อนที่ไปสู่ส่วนลำต้นได้น้อยที่สุด ในเบื้องต้นจะมีกระบวนการทำให้แคดเมียม ไปยึดเกาะบริเวณผนังเซลล์ การทำให้แคดเมียมเคลื่อนไปยัง vacuoles และการรวมตัวกับสารประกอบอื่น เช่น กรดออร์แกนิก โปรตีน หรือโพลีแซคคาไรด์ แต่หากดูดซึมแคดเมียมเข้ามาในปริมาณที่มาก ก็จะมี

แคดเมียมบางส่วนที่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ non-protein thiol (NPT) นอกจากนี้ยังทำให้แอกติวิตี้ของ antioxidant enzymes (antioxidant defense system) เพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของแคดเมียมสูงขึ้นอีกด้วย และที่สำคัญจะมีการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษในกลุ่ม glutathione (GSH) และอนุพันธ์อื่นๆ ออกมาพร้อมด้วย ซึ่ง GSH จะถูกผลิตออกมาก็ต่อเมื่อมีแคดเมียมในเซลล์สูงกว่า 10 μM และจะสร้าง PCs เมื่อมีความเข้มข้นของแคดเมียม 100 μM โดยปริมาณ GSH จะสะสมในรากมากกว่าลำต้น เพราะรากมีการบวนการ detoxification สูงกว่าลำต้น กล่าวโดยสรุป คือ ข้าวจะมีกลไกการต่อต้านโลหะแคดเมียมโดยการเพิ่ม sensitive tissues การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดออร์แกนิกและโปรตีน การเพิ่มระดับ PGRs ปรับภาวะสมดุลของเซลล์ และการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ (Rizwan et al., 2016)

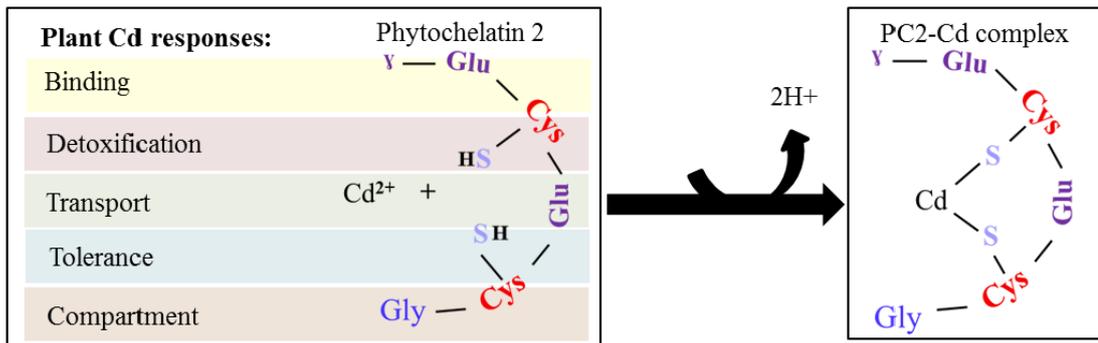
2.3.2 ไฟโตคีเรติน

Phytochelatins (PCs) เป็นสารประกอบในกลุ่ม polypeptides ทำหน้าที่ detoxification พบถูกสร้างขึ้นโดยพืช สาหร่าย และฟังไจ เพื่อใช้ตอบสนองต่อโลหะหนัก โครงสร้างทั่วไปของ PCs จะประกอบด้วย amino acid sequence $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ เมื่อ $n = 2-11$, ส่วนใหญ่ในพืชจะพบ $n = 2-6$ PCs ดังแสดงในภาพที่ 2.4 จะเกิด interaction กับโลหะหนักที่มีค่า affinity สูง ได้แก่ แคดเมียม (Cd), อาร์เซนิก (As), คอปเปอร์ (Cu), สังกะสี (Zn) โดยการเกิดพันธะที่ตำแหน่ง sulfhydryl และ carboxyl residues ดังแสดงในภาพที่ 2.5 (Liu et al., 2015)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทั่วไปของ Phytochelatins ($n = 2-11$)

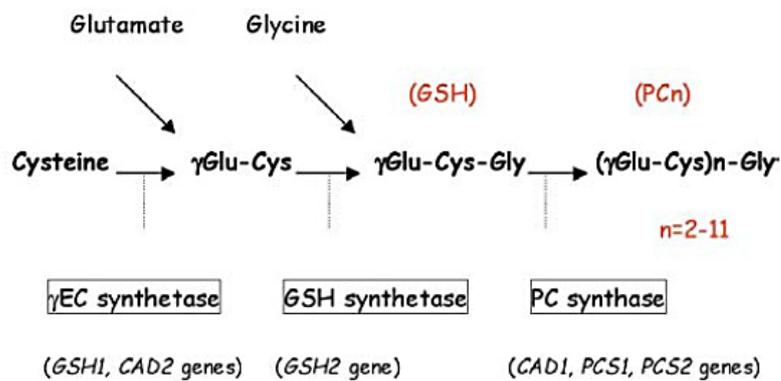
(ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Phytochelatin> เข้าถึงเมื่อ 4 สิงหาคม 2559)



ภาพที่ 2.5 สารประกอบเชิงซ้อนของแคดเมียมและไฟโตคีเรติน
 (ที่มา : <http://www.mdpi.com/1660-4601/10/4/1304/htm> เข้าถึงเมื่อ 4 สิงหาคม 2559)

2.3.3 การสังเคราะห์ PCs ในเซลล์พืช

Biosynthesis partway ของ PCs แสดงดังภาพที่ 2.6 สารตั้งต้นที่ใช้ประกอบด้วย Glutamine (Glu), Cystaine (Cys) และ Glycine (Gly) ที่ทำงานร่วมกับ GSH เพราะ GSH เป็น direct substrate ในการสังเคราะห์ PCs ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะประกอบด้วย 2 ครั้ง ปฏิกิริยา คือ EC synthethase และ GSH synthetase ซึ่งจะใช้พลังงานจาก ATP ทั้ง 2 ปฏิกิริยา ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยานี้เป็น rate limiting enzyme ในการสังเคราะห์ GSH และ activity ของ EC synthethase จะมีค่าสูงขึ้น ก็ต่อเมื่อมีแคดเมียมไอออน (Cd^{2+}) และมีการยับยั้งแบบเฉพาะเจาะจงจากปัจจัยอื่นๆ (Inouhe, 2005)



ภาพที่ 2.6 Biosynthesis PCs ในพืชชั้นสูง (Zargari, 2013)

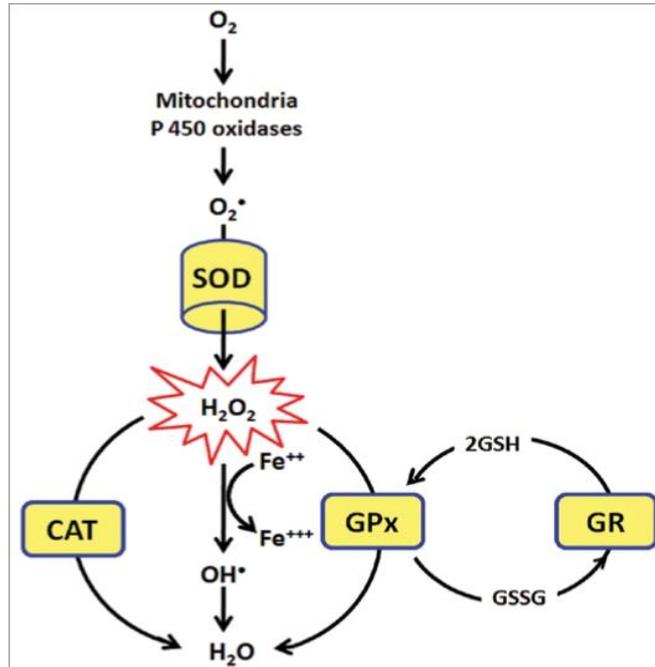
2.4 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในพืช

สารอนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่รอบนอก และมีอายุสั้นมาก จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง คือ hydroxyl radical, superoxide, peroxy, alkoxy และ oxides ของ nitrogen โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในเซลล์อยู่แล้ว แต่ก็จะมีระบบปรับสมดุลในเซลล์โดยการขจัดออกไป แต่ถ้าเซลล์ได้รับโลหะหนักในปริมาณมากเกินไป ก็จะทำให้มีสารอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระอยู่ด้วย เช่น ไฮโดรเจนเพอออกไซด์ โดยรวมเรียกว่า reactive

oxygen species (ROS) ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ ROS ในเซลล์พืช เป็นผลมาจาก สิ่งเร้า ความเครียด abiotic และ biotic ฯลฯ ดังนั้น พืชจะมีการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อ ป้องกันความเสียหายที่เกิดกับเซลล์

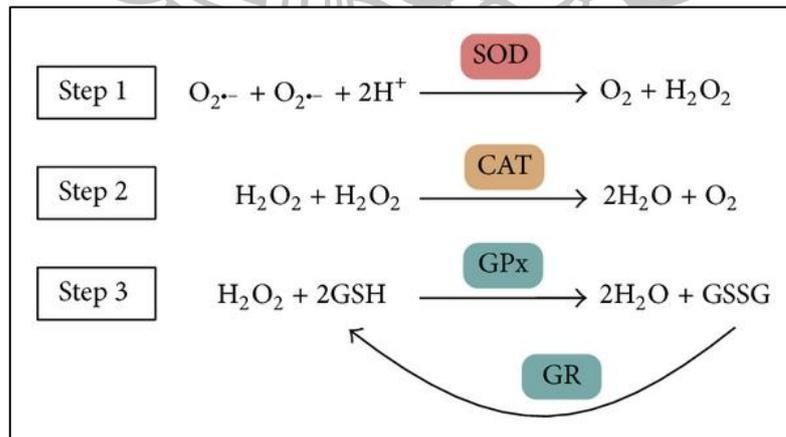
สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ โมเลกุลของสารใดๆ ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆได้ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเป็นปฏิกิริยาที่ เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่งที่เป็นตัวออกซิไดซ์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ให้เกิดความเสียหาย ปฏิกิริยานี้จะยุติลงได้ ก็ต่อเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปจับกับสารอนุมูลอิสระ และยับยั้ง ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการถูกออกซิไดซ์ (Racchi, 2013)

พืชจะรักษาสมดุลโดยการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลูตาไธโอน วิตามินซี วิตามินอี รวมถึง peroxidase ต่างๆ ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึง peroxidase ที่สำคัญ 3 ประเภท ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในพืชที่ช่วยป้องกันระบบ aerobic ในเซลล์ โดยเอนไซม์เหล่านี้ จะทำหน้าที่ป้องกันโดย scavenging superoxide radicals และ hydrogen peroxide โดยตรง ด้วยการปรับเปลี่ยนให้อนุมูลอิสระเหล่านี้ มีความเป็น reactive species ที่ลดลง SOD จะเกิดปฏิกิริยาโดยเปลี่ยน superoxide radical ไปเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) ถึงแม้ว่า H_2O_2 จะไม่ใช่อนุมูลอิสระ แต่มันสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยา กลายเป็นอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว เอนไซม์ GPx จะทำการ neutralizes hydrogen peroxide โดยให้ hydrogen จาก GSH จำนวน 2 โมเลกุล ทำให้ปฏิกิริยานี้เกิดน้ำ (H_2O) ขึ้น 2 โมเลกุล และ GSSG อีก 1 โมเลกุล ซึ่งกลไกนี้จะมีการทำงาน ร่วมกับเอนไซม์ GR ซึ่งจะทำหน้าที่ สร้าง GSH จาก GSSG ส่วน CAT ก็เช่นเดียวกัน โดยจะทำหน้าที่ neutralizes H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O (Pandey and Rizvi, 2010) ซึ่งมีกลไกการทำงาน ดังแสดงดัง ภาพที่ 2.7 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (enzymatic oxidant) ในระบบการป้องกันร่างกายจากอนุมูลอิสระและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกการเปลี่ยนอนุมูลอิสระเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ของ SOD และ H₂O₂ เปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลของน้ำ (H₂O) และออกซิเจน (O₂)

(ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/45694952_fig5_Superoxide-dismutase-SOD-glutathione-peroxidase-GPx-glutathione-reductase-GR-and เข้าถึงเมื่อ 5 สิงหาคม 2559)



ภาพที่ 2.8 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (enzymatic oxidant) ในระบบการป้องกันร่างกายจากอนุมูลอิสระและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ประกอบด้วย SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; and GR, glutathione reductase.

(ที่มา : <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/831841/fig1/> เข้าถึงเมื่อ 5 สิงหาคม 2559)

2.5 กระบวนการสังเคราะห์แสงและรงควัตถุ

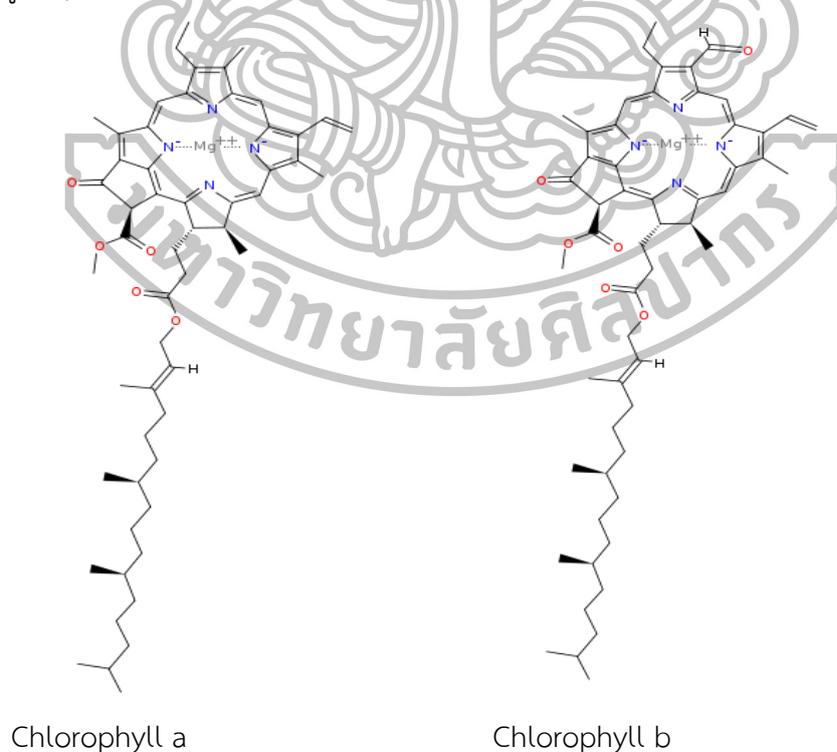
การสังเคราะห์แสง (Photo Synthesis) เกิดขึ้นในพืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ เป็นกระบวนการเปลี่ยนพลังงานแสงให้มาอยู่ในรูปของพลังงานเคมี ในรูปของโมเลกุลสารอินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิตได้ โดยพืชที่จะสังเคราะห์แสงได้ จะต้องมียังรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigments)

2.5.1 รงควัตถุที่พืชใช้สังเคราะห์แสง

1) Chlorophyll

เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในพืชและสิ่งมีชีวิต ที่มีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง Chlorophyll ดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่นแถบสีม่วงและน้ำเงิน ร่องลงมาคือสีแดงและสีเขียว คลอโรฟิลล์ เอ พบในสาหร่ายทุกชนิด สูตรโมเลกุล $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ไม่ละลายในน้ำ เป็นคลอโรฟิลล์ที่สามารถนำพลังงานแสงไปใช้โดยตรง ในขณะที่รงควัตถุอื่นๆ ต้องถ่ายทอดให้คลอโรฟิลล์ เอ อีกทอดหนึ่งจึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้คลอโรฟิลล์ เอ จะดูดกลืนแสงในช่วง 435 670 และ 700 nm คลอโรฟิลล์ บี สูตรโมเลกุล $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ อยู่ร่วมกับคลอโรฟิลล์ เอ พบในพืชทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว

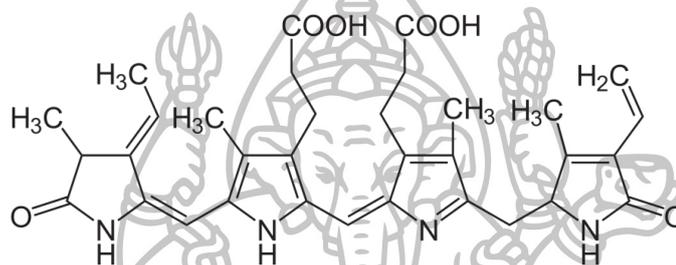
โครงสร้างประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น porphyrin-like structure ซึ่งมี Mg^{2+} อยู่ส่วนกลางของโครงสร้าง และส่วนที่เป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น hydrophobic region ซึ่งฝังตัวอยู่บน photosynthetic membrane ในคลอโรพลาสต์ แสดงดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี
(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll_a เข้าถึงเมื่อ 10 สิงหาคม 2559)

2) Phycobilins

เป็นรงควัตถุสีแดงที่เป็น accessory light-harvesting pigments พบในพวก cyanobacteria และสาหร่ายสีแดง มีโครงสร้างเป็น open-chain tetrapyrroles phycobilins ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปมี 3 ชนิดคือ phycoerythrin (หรือ phycoerythrobilin) phycocyanin (หรือ phycocyanobilin) และ allophycocyanin (allophycocyanobilin) ซึ่งทั้งสามชนิดนี้จะไม่พบในพืชชั้นสูง แต่พบเฉพาะใน cyanobacteria สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีน้ำเงิน และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของ Phycobilins

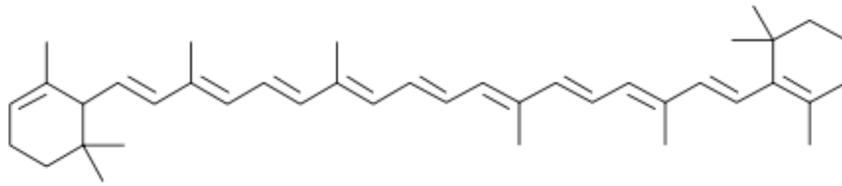
(ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Phycoerythrin> เข้าถึงเมื่อ 20 สิงหาคม 2559)

3) Carotenoids

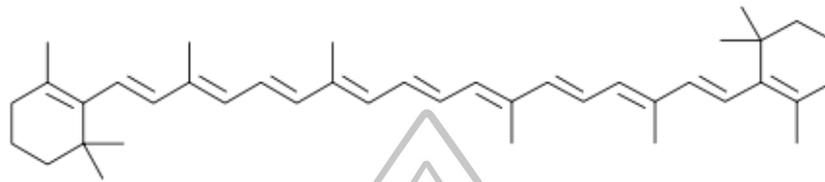
Carotenoids เป็นกลุ่มรงควัตถุที่มีสีเหลือง-ส้ม พบได้โดยทั่วไปในพืชและสิ่งมีชีวิต ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ มีหน้าที่ในการช่วยรับพลังงานแสง เพื่อการสังเคราะห์ด้วยแสง และทำหน้าที่ในการป้องกันอันตรายจากแสง (photoprotective agents) เป็นกลุ่มรงควัตถุที่มีสีเหลือง-ส้ม พบทั่วไปในพืชและสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ และมีหน้าที่ในการช่วยรับพลังงานแสงเพื่อการสังเคราะห์ด้วยแสง และทำหน้าที่ในการป้องกันอันตรายจากแสง โครงสร้างหลักของรงควัตถุกลุ่มนี้ คือ การเป็นสายไฮโดรคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ carotenes และ xanthophylls

Carotenes เป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม หรือส้ม-แดง เป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอน ส่วนรงควัตถุ xanthophyll มีสีเหลือง หรือส้ม-เหลือง ซึ่งนอกจากจะประกอบด้วยสายยาวของไฮโดรคาร์บอน แล้ว ยังมี O เป็นองค์ประกอบอีกด้วย ซึ่ง xanthophylls มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับระดับ oxidation ของโมเลกุลพืชและสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้

แคโรทีนอยต์ในอาหารธรรมชาติมีประมาณ 600 ชนิดพบมาก 6 ชนิด คือ แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene) บีตา-แคโรทีน (beta-carotene) บีตา-คริปโตแซนทีน (beta-cryptoxanthin) ไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) ซึ่งได้แสดงโครงสร้างตามภาพที่ 2.11



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.11 โครงสร้างและ precursor ของแคโรทีนอยด์

(ก) alpha-carotene (ข) beta-carotene

(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Phaseic_acid เข้าถึงเมื่อ 15 สิงหาคม 2559)

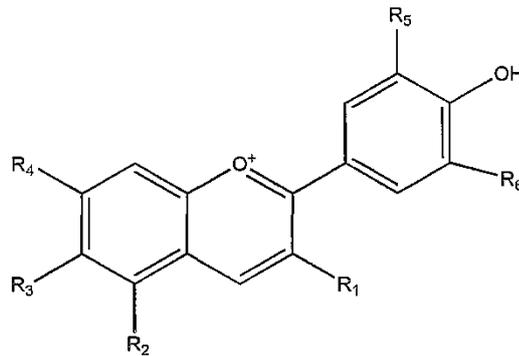
4) Anthocyanin

Anthocyanin เป็นรงควัตถุที่พบในพืชทั้งในดอกและในผลของพืช ให้สีแดง น้ำเงิน หรือม่วง เป็นสารที่ละลายในน้ำได้ดี มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีน และการตกตะกอนของเกล็ดเลือด โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบ 2 หรือ 3 ชนิด ได้แก่

1) แอนโทไซยานิดิน หรืออะไกลโคโคน (aglycone) มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย คาร์บอนเชื่อมต่อกันในรูป C-6-C-3-C-6 เชื่อมต่อกัน ซึ่งแอนโทไซยานิดินที่พบมากในปัจจุบันจะมีอยู่ 6 ชนิด คือ เพลลาโกนินไดนไฮยานิดิน เดลฟินิดิน พีโอนิดิน เพทุนิน และมอลวิดิน

2) น้ำตาล ซึ่งจะเกิดพันธะกับคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 3 และ 5 โดยน้ำตาลที่เกิดพันธะได้ เช่น กลูโคส กาแลกโตส รุติโนส แรมโนส เป็นต้น

3) โครงสร้างที่เป็นกรด ซึ่งส่วนนี้อาจมีหรือไม่มีก็ได้ แอนโทไซยานินที่มีกรดเป็นองค์ประกอบเรียกว่า นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน ถ้าไม่มีกรดเป็นองค์ประกอบเรียกว่า อะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน โดยกรดจะเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน กับน้ำตาล กรดที่เกิดพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาล เช่น กรดคูมาริกกรดเฟอร์รูริก กรดคาร์เฟอิก เป็นต้น โครงสร้างของแอนโทไซยานินแสดงดังภาพที่ 2.12

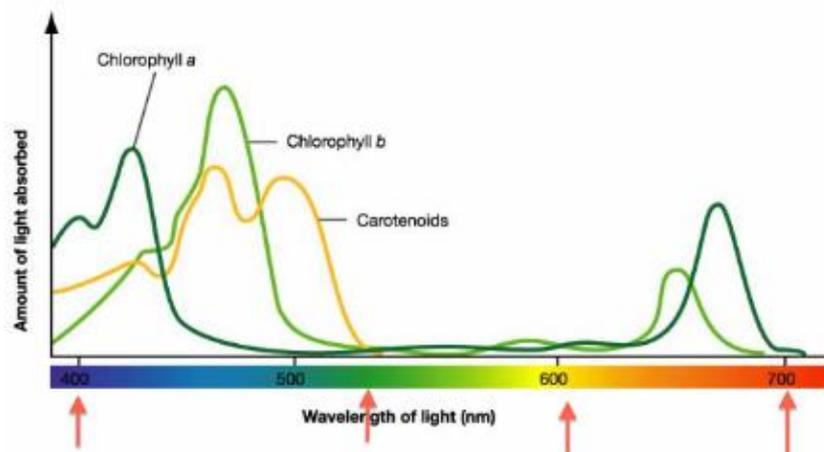


ภาพที่ 2.12 โครงสร้างแอนโทไซยานิน

(ที่มา : <http://www.pathway27.eu/topstory/anthocyanins/> เข้าถึงเมื่อ 12 สิงหาคม 2559)

2.5.2 การดูดกลืนแสงของรงควัตถุ (Light absorption)

รงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง มีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นต่างๆ กัน แสดงดังภาพที่ 2.13 แสงธรรมชาติที่พบ จะประกอบด้วยแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ กัน แสงในช่วงคลื่นที่เราสามารถมองเห็นได้ (visible light) จะอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตรรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงอยู่ที่ใด เมื่อพิจารณาโครงสร้างของรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งสามกลุ่ม จะพบว่ามีส่วนที่ร่วมกันคือ มีส่วนของโมเลกุลที่มีขั้วต่ำ หรือไม่มีขั้ว ดังนั้นโมเลกุลเหล่านี้จะฝังตัวอยู่บนเมมเบรนภายในเซลล์ ในพืชและสิ่งมีชีวิตที่เป็น prokaryote รงควัตถุเหล่านี้จะฝังตัวอยู่บน photosynthetic membrane ในขณะที่พืชและสิ่งมีชีวิตกลุ่ม eukaryote จะมีออร์แกเนลล์พิเศษที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยเฉพาะ คือ คลอโรพลาสต์



ภาพที่ 2.13 แถบแสดงความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงของโมเลกุลรงควัตถุชนิดต่างๆ

(ที่มา <http://aqua.c1ub.net/forum/index.php?action=printpage;topic=240587.0>

เข้าถึงเมื่อ 28 สิงหาคม 2559)

ในการเปลี่ยนพลังงานแสงให้อยู่ในรูปของพลังงานเคมีในโมเลกุลของสารอินทรีย์นั้น จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1) ปฏิกริยาที่ต้องใช้แสง (Light reaction) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นบริเวณไทลาคอยด์ เป็นการที่รงควัตถุรับพลังงานแสง แล้วนำพลังงานนั้นมาใช้ในการสร้างสารที่มีพลังงานสูง ซึ่งได้แก่ ATP และ NADPH เพื่อที่จะได้นำพลังงานจากโมเลกุลเหล่านี้ไปใช้ในการสร้างสารอินทรีย์ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่อไป ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณ สโตรมาในคลอโรพลาสต์ รงควัตถุชนิดต่างๆ ที่อยู่บนไทลาคอยด์ จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มโดยมีการเกาะตัวอยู่กับโปรตีนหลายชนิด กลุ่มของโปรตีนบนไทลาคอยด์ที่มีรงควัตถุประกอบอยู่ด้วยนี้เรียกว่า ระบบแสง (photosystem) ในพืชชั้นสูง รงควัตถุที่ประกอบอยู่ในระบบแสงได้แก่ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ เอ

2) ปฏิกริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ fixation reaction) พบว่าพืชและสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ส่วนใหญ่มีระบบแสง 2 ระบบคือ ระบบแสง I (photosystem I) และระบบแสง II (photosystem II) ซึ่งระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อให้สามารถเกิดการส่งพลังงานในการสร้าง ATP และ NADPH

ความแตกต่างประการหนึ่งของ ระบบแสง I และ ระบบแสง II ในด้านการรับพลังงาน คือ ระบบแสง I ประกอบด้วยหน่วยรับพลังงานแสงที่รับพลังงานในช่วงคลื่นที่มีความยาวคลื่นไม่ต่ำกว่า 700 นาโนเมตร ในขณะที่ ระบบแสง II จะประกอบด้วยหน่วยรับพลังงานแสงที่มีช่วงคลื่นไม่ต่ำกว่า 680 นาโนเมตร ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยพลังงานแสงที่เรียกว่า photolysis กระบวนการที่น้ำสูญเสียอิเล็กตรอนไปให้กับตัวรับอิเล็กตรอนแล้วเกิดผลิตภัณฑ์คือ ออกซิเจน

2.6 ซิลิคอน (Silicon)

ซิลิคอนมีเลขอะตอม 14 เป็นธาตุที่มีมากที่สุดในเปลือกโลกเป็นอันดับ 2 มีอยู่ประมาณ 25.7% โดยน้ำหนัก พบในดินเหนียว เฟลด์สปาร์ (feldspar) หินแกรนิต ควอตซ์ และทราย ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของซิลิคอน ไดออกไซด์ (ซิลิกา) และซิลิเกต (สารประกอบที่ประกอบจากซิลิคอน ออกซิเจน และ โลหะ)

ซิลิคอนเป็นธาตุเสริมประโยชน์ (beneficial mineral elements) หมายถึง ธาตุที่ช่วยกระตุ้น (stimulate) การเจริญเติบโตของพืชแต่ไม่ใช่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืชทุกชนิด มีพืชบางชนิดเท่านั้นที่ต้องการซิลิคอนเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต แม้ซิลิคอน (silicon) จะเป็นธาตุซึ่งมีมากที่สุดในชั้นผิวโลกแต่ปริมาณที่ละลายได้และอยู่ในสารละลายดินมีเพียงเล็กน้อยรูปของธาตุนี้ในสารละลายดินส่วนมาก คือ กรดโมโนซิลิซิก [Si(OH)₄] สภาพละลายได้ของกรดดังกล่าวในน้ำประมาณ 2 มิลลิโมลาร์ หรือ 56 มิลลิกรัม Si ต่อ 3.5-4.0 มิลลิกรัม หากมีค่าเกิน 56 มิลลิกรัมต่อลิตร ถือว่าเป็นสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวดหรือกรดดังกล่าวเริ่มตัวกันเป็นพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของกรดซิลิซิกในสารละลายดินอาจลดลงเนื่องจากสาเหตุ 2 ประการคือ

- 1) พีเอชของดินสูงกว่า 7
- 2) เมื่อมีเซสควิออกไซด์ (sesquioxides) ในดินมากเป็นเหตุให้เกิดการดูดซับ แอนไอออนสูง ซึ่งพบมากในเขตร้อน

2.7.1 การดูดซึมน้ำของราก

ความเข้มข้นและการกระจายในพืช พืชชั้นสูงดูดซึมน้ำจากดินมาใช้ได้มากน้อยแตกต่างกันอาจแบ่งพืชออกเป็นสามกลุ่มโดยพิจารณาความเข้มข้นของซิลิกอนในส่วนเนื้อดิน(% SiO₂ คิดจากน้ำหนักแห้ง) ดังนี้

1) พืชที่มีซิลิกอนสูงเป็นพืชในวงศ์ Cyperaceae เช่น *Equisetum arvense* และพืชในวงศ์ Gramineae ซึ่งอยู่ในดินน้ำขังเช่น ข้าวมี 10-15% SiO₂

2) พืชที่มีซิลิกอนปานกลางเป็นพืชวงศ์ Gramineae ซึ่งอยู่ในดินไร่ เช่น อ้อยกับธัญพืชส่วนมากและพืชใบเลี้ยงคู่บางชนิด มี 1-3% SiO₂

3) พืชที่มีซิลิกอนต่ำ เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ส่วนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลถั่วมีน้อยกว่า 0.5% SiO₂

พืชสะสมซิลิกอน เช่น ข้าวและพืชชนิดอื่นๆ มีอัตราการดูดซึมน้ำที่สัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของรากแต่ไม่เกี่ยวข้องกับการคายน้ำการเคลื่อนย้ายไอออนในรากข้าวฟ่างซึ่งเป็นพืชในกลุ่มนี้จะใช้ซิลิกอนเอาไว้และสะสมมากเป็นพิเศษที่ผนังเซลล์ด้านใน ส่วนปลายรากจะมีธาตุนี้มากกว่าโคนรากจึงเชื่อว่าการสะสมซิลิกอนในผนังเอนโดเดอริสดังกล่าว อาจเป็นกลไกป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าไปในเซลล์รากพืช ซิลิกอนเคลื่อนย้ายจากรากสู่ส่วนเหนือดินทางไซเลมและสะสมอยู่ในผนังของไซเลมเวสเซลล์ค่อนข้างมาก ช่วยให้ไซเลมแข็งแรงและไม่ยุบตัวขณะที่พืชมีอัตราการคายน้ำสูง ส่วนปริมาณการสะสมซิลิกอนในแต่ละอวัยวะของส่วนเหนือดินขึ้นอยู่กับอัตราการคายน้ำของอวัยวะนั้นๆ โดยสะสมที่อะพลาสติของเซลล์ และมีมากขึ้นตามอายุของอวัยวะการสะสมจะเกิดขึ้นเสมอตรงปลายทางของกระแสการคายน้ำ ซึ่งได้แก่ 1) ด้านนอกของผนังเซลล์ชั้นผิวใบทั้งด้านบนและล่าง 2) ใบประดับ (bracts) ของดอกหญ้า 3) ขนหรือไตรโคม (trichomes) และ 4) เซลล์ม้วนหรือเซลล์ยนต์ (buliform cells) ของใบพืชตระกูลหญ้าซิลิกอนที่สะสมในพืชอยู่ในรูปซิลิกาอสัณฐาน (amorphous silica, SiO₂·nH₂O) จัดเรียงเป็นชั้นในผนังเซลล์ จึงมีประโยชน์ต่อพืชคือลดการคายน้ำผ่านผิวเคลือบคิวทิน (cuticle) และเป็นสิ่งขัดขวางการล่งลำของเชื้อโรคเข้าไปในเซลล์

2.7.2 บทบาท Si ในเมแทบอลิซึม ซิลิกอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นของไดอะตอมซึ่งเป็นพืชเซลล์เดียวและพืชที่ชอบซิลิกอน เช่น *Equisetum arvense* และพืชตระกูลหญ้าที่อาศัยในดินน้ำขัง ข้าวซึ่งขาดธาตุนี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำและผลผลิตน้อย ใบเหี่ยวง่ายและเนื้อใบบางส่วนตาย แต่ข้าวที่มีอาการดังกล่าวยังมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ จึงถือว่าธาตุนี้ช่วยเสริมการเจริญเติบโต แต่ในเมื่อข้าวยังมีชีวิตต่อไปได้ซิลิกอนจึงมิใช่ธาตุอาหาร อย่างไรก็ตามต้นข้าวอ่อนต้องการธาตุนี้เพียงเล็กน้อย แต่ต้องการปริมาณมากขึ้นในช่วงเจริญพันธุ์ก่อนข้าวตั้งท้องซิลิกอนจะเคลื่อนย้ายไปสะสมในใบ หากขาดแคลนในช่วงนี้ช่อดอกข้าวจะไม่สมบูรณ์

สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้การพิสูจน์บทบาทของซิลิกอนในแง่ธาตุอาหารพืชเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ก็คือ น้ำที่พืชจัดสิ่งเจือปนออกอย่างเต็มที่แล้วยังมีซิลิกอนถึง 20 นาโนโมลาร์ และพืชพวกสะสมซิลิกอนซึ่งปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่เติมธาตุนี้ก็ยังมีในใบ 1-4 มิลลิกรัม SiO₂ ต่อใบพืชแห้งหนึ่งกรัม อย่างไรก็ตามผลการศึกษากการเปลี่ยนแปลงด้านเมแทบอลิซึมเมื่อไม่ใส่ซิลิกอนในสารละลายปลูกพืชหรือการใส่กรดเยอรมานิก (germanic acid) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเมแทบอลิซึมของซิลิกอนอย่างจำเพาะเจาะจง พบว่า

1) เมื่อขาดซิลิคอนปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP, ADP และน้ำตาลฟอสเฟตจากฟอสเฟตไอออนของใบอ้อยมีอัตราการลดลง

2) สัดส่วนของลิกนินในผนังเซลล์ของรากข้าวสาลีต่ำลงส่วนสารฟีนอลิกสูงชันกว่าปกติบทบาทของซิลิคอนในผนังเซลล์มีความสำคัญเนื่องจากซิลิคอนในผนังเซลล์อยู่ในรูปอนุพันธ์ของซิลิสิกเอสเทอร์ ($R_1-O-Si-O-R_2$) ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมให้พอลิยูโรไนด์ (polyuronides) มีโครงสร้างที่เหมาะสมและซิลิคอนมีอิทธิพลต่อเมทาบอลิซึมของพอลิฟีนอลในผนังเซลล์ กล่าวคือ กรดซิลิสิก แอซิดคล้ายกรดบอริกในแง่มีสัมพรรคภาพสูงต่อ O-diphenols เช่นกรดแคฟเฟอิก และเอสเทอของกรดนี้ จึงทำปฏิกิริยาได้โมโน, ไดและพอลิเมอร์ซิลิคอนคอมเพล็กซ์ซึ่งมีเสถียรภาพสูงและสภาพละลายน้ำต่ำ

3) ซิลิคอนมิใช่มีบทบาทเพียงแต่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์และทำให้ผนังเซลล์มีเสถียรภาพสูงชันเท่านั้น ยังช่วยลดการสังเคราะห์ลิกนินอีกด้วย การมีซิลิคอนเข้าเสริมในผนังเซลล์ทำให้ผนังแข็งแรงโดยใช้พลังงานต่ำกว่าการสังเคราะห์ลิกนิน หากต้องการลิกนิน 1 กรัม ต้องอาศัยพลังงานจากกลูโคสถึง 2 กรัม และเมื่อเทียบความสัมพันธ์พลังงานสำหรับสร้างลิกนินกับการใช้ซิลิคอนเพื่อการนี้คิดเป็นสัดส่วนได้ 20 : 1 ซึ่งแสดงว่าซิลิคอนช่วยเสริมความแข็งแรงให้เซลล์พืชด้วยกระบวนการที่ประหยัดพลังงานอย่างมาก

4) ซิลิคอนช่วยให้ผนังเซลล์มีสภาพยืดหยุ่น (elasticity) ระหว่างที่เซลล์กำลังขยายขนาด ธาตุนี้ในผนังปฐมภูมิจับอยู่กับเพกทิน และพอลิฟีนอลในลักษณะเชื่อมโยง (crosslinks) ซึ่งช่วยให้ผนังมีสภาพยืดหยุ่นที่ดีจึงขยายขนาดเซลล์ได้ตามปกติ

2.7.3 ผลด้านเสริมประโยชน์ซิลิคอน มีผลด้านเสริมประโยชน์ต่อพืชหลายประการ เช่น ช่วยให้ใบตั้งชัน ลำต้นแข็งแรงไม่ล้มง่าย ป้องกันการล่งลำของเชื้อโรคเข้าไปในรากและใบ และป้องกันความเป็นพิษของแมงกานีสหรือเหล็กหรือทั้งสองธาตุ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) ช่วยให้ใบตั้งชัน แปลงที่มีพืชค่อนข้างหนาแน่นหรือใช้ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราสูงใบพืชส่วนปลายมีแนวโน้มที่จะโค้งลงจึงบังแสงกันเอง เมื่อพืชได้รับซิลิคอนเพียงพอก็เคลื่อนย้ายมาสะสมที่ผนังเซลล์ชั้นผิวนอกของใบ แผ่นใบก็จะแข็งแรงและตั้งชันจึงรับแสงได้ดีขึ้น นอกจากนี้บางพืช เช่น แดงกวายังมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงชัน และยืดอายุใบทำให้ใบร่วงหล่นช้าลง

2) ลดการล้ม ข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนอัตราสูงมักมีลำต้นอ่อนและล้มง่าย ซิลิคอนช่วยให้ลำต้นข้าวแข็งแรงขึ้นและล้มน้อยลง

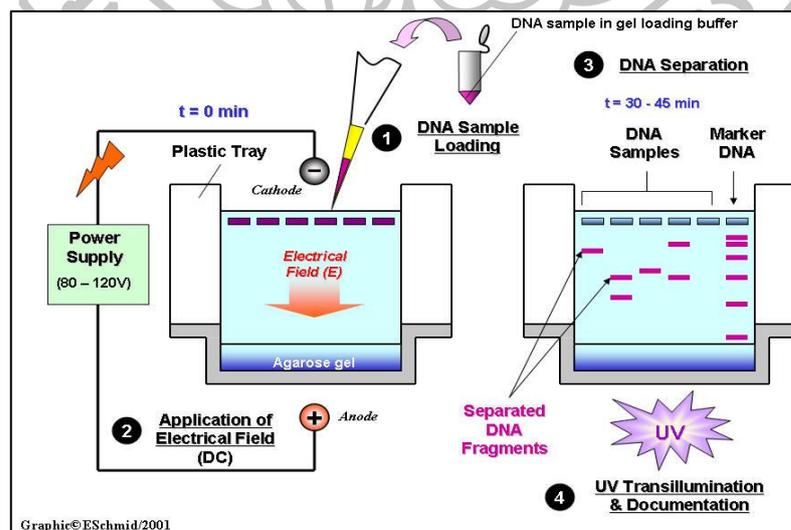
3) ป้องกันการล่งลำของเชื้อโรคเข้าไปในรากและใบ ความแข็งแรงของเซลล์ผิวนอกที่มีซิลิคอนสูงช่วยป้องกันมิให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดล่งลำเข้าไปในเซลล์ และแมลงก็กัดกินใบน้อยลง

4) ซิลิคอนยังมีผลในด้านอื่นๆ อีก เช่น ช่วยปลดปล่อยฟอสเฟตที่ถูกตรึงในดินไร่ ลดการคายน้ำผ่านผิวเคลือบคิวทินของใบข้าว และช่วยให้เมล็ดข้าวสาลีงอกดีขึ้นเมื่อสารละลายที่ใช้เพาะเมล็ดมีโซเดียมคลอไรด์มากกว่าปกติ

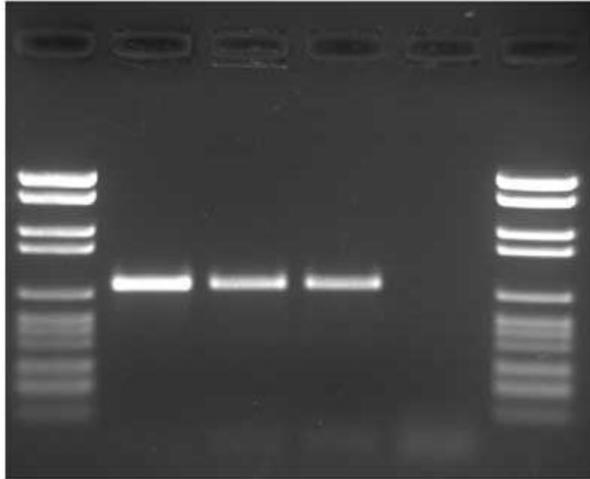
2.7 Gel electrophoresis

อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์สาร และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อให้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วย อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ซึ่งขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสารรูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น และกระแสไฟฟ้า

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยว โดยอาศัยหลักที่ว่า สารตัวอย่าง อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ที่มีประจุลบที่สามารถแยกพอลิเพปไทด์ ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยวมีโครงสร้างเป็น แท่งและทุกสายมีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหา ขั้วบวก (SDS จับพอลิเพปไทด์คงที่ ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS / กรัมโปรตีน โดยมี เบตา-mercaptoethanol เป็น reducing agent ในสารตัวอย่างด้วยเพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีน อัตราการเคลื่อนที่ของพอลิเพปไทด์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล โดยจะเป็น cross-linked polymer ที่เกิดจากการสร้าง polymer ระหว่าง acrylamide monomer กับ bis acrylamide โดยมี temed เป็น catalyst และมี ammonium persulfate หรือ riboflavin เป็น initiator ตัวกลางค้ำจุน ทำหน้าที่เป็น molecular sieve ช่วยในการแยกสารออกจากกันได้ โมเลกุล ขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเจลจะ เคลื่อนที่ผ่านเจลไปได้ ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจะถูกขัดขวางการเคลื่อนที่ส่วนโมเลกุลขนาด กลางสามารถผ่านรูพรุนได้ แต่ไม่เต็มเท่าขนาดเล็ก ขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้นของ acrylamide และ bis acrylamide ขั้นตอนการแยกตัวอย่างแสดงในภาพที่ 2.14 และแถบสารตัวอย่างแสดงในภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.14 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วย Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
(ที่มา : <https://www.premedhq.com/gel-electrophoresis-and-southern-blotting>
เข้าถึงเมื่อ 30 สิงหาคม 2559)



ภาพที่ 2.15 แถบสารตัวอย่างที่แยกด้วย Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
(ที่มา : <https://bioprep.community.uaf.edu/the-basics-of-gel-electrophoresis/>)

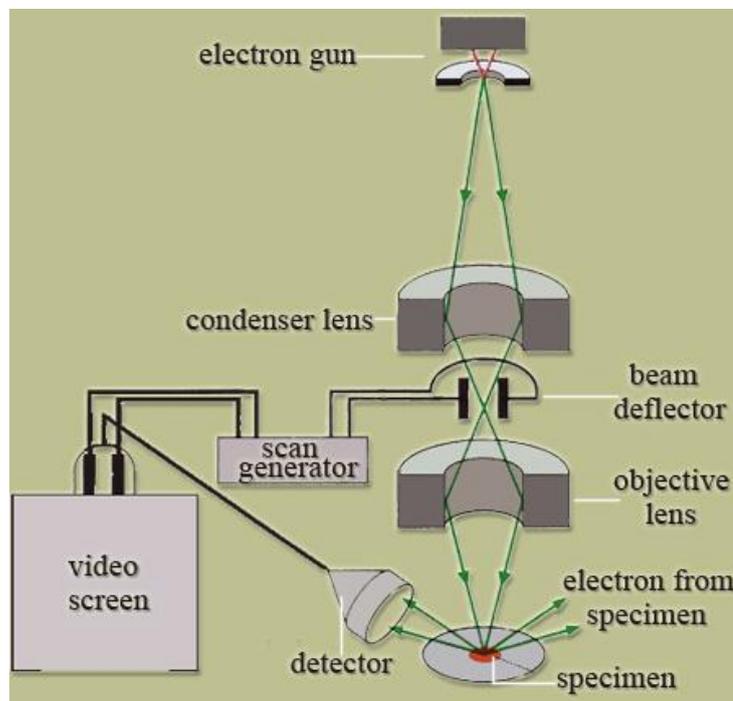
2.8 Scanning Electron Microscope (SEM)

Scanning Electron Microscope (SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบหนึ่งที่ใช้อิเล็กตรอนที่ถูกเร่งความเร็วเป็นแหล่งที่มาของการส่องสว่าง เนื่องจากอิเล็กตรอนมีความยาวคลื่นสั้นกว่าโฟตอนของแสงที่มนุษย์มองเห็นได้ถึง 100,000 เท่า กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจึงมีกำลังขยายสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและสามารถเปิดเผยให้เห็นโครงสร้างของวัตถุที่มีขนาดเล็กมากๆ ได้ โดยมีกำลังขยายสูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร การสร้างภาพทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของ ตัวอย่างที่ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็นภาพลักษณะของ 3 มิติ ดังนั้นเครื่อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น



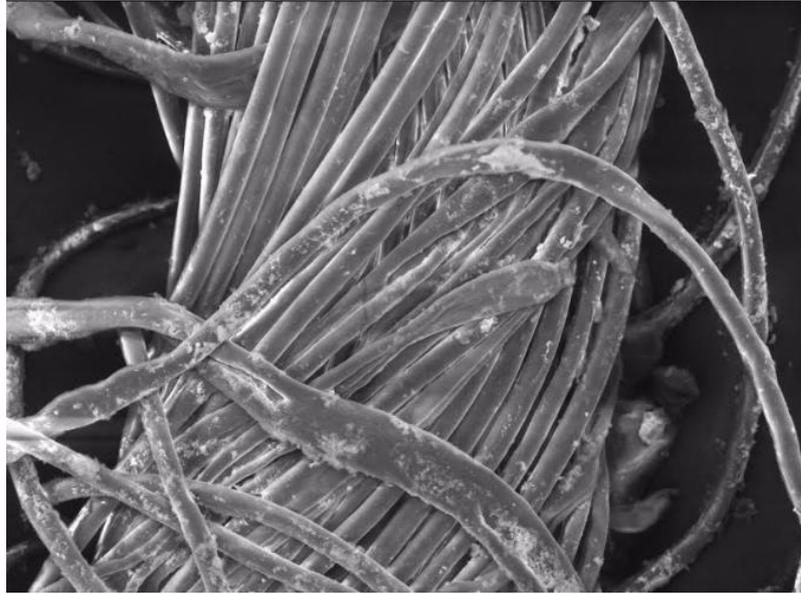
ภาพที่ 2.16 เครื่อง Scanning electron microscope
(ที่มา : <https://ares.jsc.nasa.gov/research/laboratories/sem.html> เข้าถึงเมื่อ 3 กันยายน 2559)

หลักการทำงานของเครื่อง SEM จะประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ หากต้องการภาพที่มีความคมชัดจะปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะถูกปรับระยะโฟกัสโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการศึกษา หลังจากลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (secondary electron) ขึ้นซึ่งสัญญาณจากอิเล็กตรอนทุติยภูมินี้จะถูกบันทึก และแปลงไปเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์และถูกนำไปสร้างเป็นภาพบนจอโทรทัศน์ต่อไป หลักการทำงานแสดงดังภาพที่ 2.17 และลักษณะภาพที่ได้จาก SEM แสดงดังภาพที่ 2.18



ภาพที่ 2.17 หลักการทำงานของเครื่อง SEM

(ที่มา : <http://www.nano.kmitl.ac.th/index.php/tool/218-scanning-eletron-microscopysem-.html>
เข้าถึงเมื่อ 3 กันยายน 2559)



ภาพที่ 2.18 ลักษณะเส้นด้ายที่ถ่ายผ่านกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 500X
(บันทึกสำหรับวิทยานิพนธ์นี้โดยใช้ Hitachi TM3030 Plus SEM)

2.9 inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)

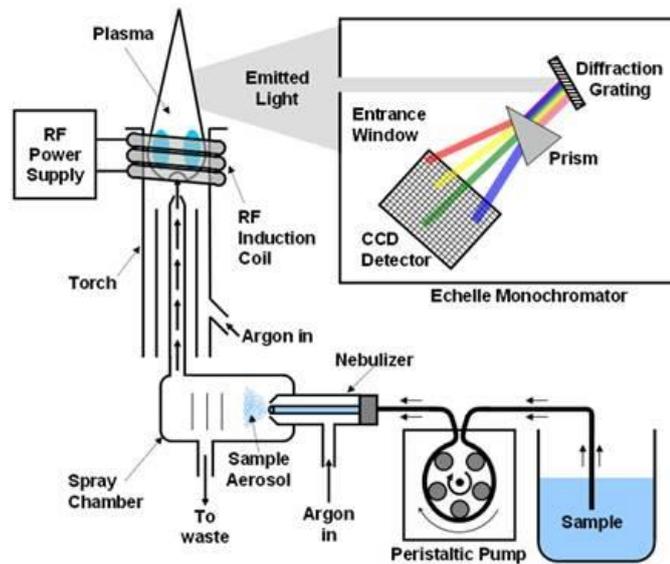
ICP-OES เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ธาตุที่มีปริมาณน้อยๆ (Trace metal) เป็น emission spectroscopy ที่ใช้ inductive couple plasma หรือความร้อนจากพลาสมาที่สูง 6000 to 10000 K เป็นตัวกระตุ้นให้อิออนหรืออะตอมอยู่ในสภาวะ excited state แล้วเกิดการคายพลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าออกมาเพื่อกลับลงมาสู่สภาวะพื้น ที่ความยาวคลื่นที่เฉพาะเจาะจงของแต่ละธาตุ และค่า intensity จะบอกถึงความเข้มข้นของธาตุนั้นๆ ที่อยู่ในสารละลายตัวอย่าง ภาพที่ 2.19 แสดงเครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)



ภาพที่ 2.19 เครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrometry

(ที่มา : <http://www.directindustry.com/prod/skray-instrument/product-54641-1070681.html>

เข้าถึงเมื่อ 3 กันยายน 2559)



ภาพที่ 2.20 กระบวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP OES

(ที่มา : <http://sites.cord.edu/chem-330-lab-manual/experiments/icp-aes> เข้าถึงเมื่อ 10 กันยายน 2559)

2.10 Ultraviolet-visible-spectrophotometer

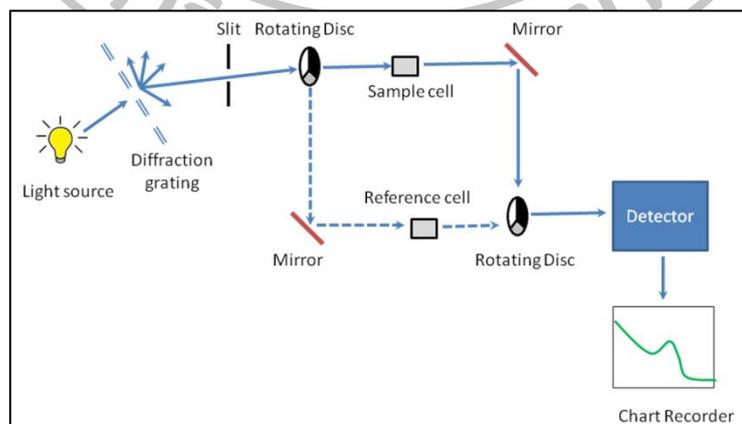
ultraviolet-visible-spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงในช่วงรังสียูวีหรือแสงขาวที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้



ภาพที่ 2.21 UV-VIS Spectrophotometer

(ที่มา : <http://www.mfu.ac.th/school/agro2012/node/269> เข้าถึงเมื่อ 10 กันยายน 2559)

หลักการการทำงานของเทคนิค ultraviolet-visible-spectroscopy เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่าง เทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ หลักการทำงานของเครื่องมือ แสดงดังภาพที่ 2.22



ภาพที่ 2.22 หลักการทำงานของเครื่อง Ultraviolet-visible-spectrophotometer

(ที่มา : <http://sciencepole.com/ultraviolet-visible-spectroscopy/> เข้าถึงเมื่อ 13 กันยายน 2559)

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

ในการศึกษาผลของโลหะแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและชีวภาพบางของข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยการใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาที่หลากหลาย ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็นขั้นตอน ดังต่อไปนี้

- (1) การปลูกข้าวด้วยระบบ hydroponics
- (2) การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าว
- (3) การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ แคดเมียม (Cd) และซิลิกอน (Si) โดยเทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- (4) การศึกษาลักษณะของธาตุซิลิกอนโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM)
- (5) การศึกษาลักษณะการยัดเกาะของแคดเมียมโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM)
- (6) การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ โดยใช้เทคนิค UV-vis spectrophotometry
- (7) การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DCFH-DA staining
- (8) การแยกโปรตีน Phytochelatin โดยเทคนิค gel electrophoresis
- (9) การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้สารละลาย Evans blue
- (10) การทดสอบน้ำตาลในต้นอ่อนข้าวไรซ์เบอร์รี่
- (11) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	การทดลอง	เครื่องมือ
1	การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ แคดเมียม inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)	inductively coupled plasma optical emission spectrometry
2	การศึกษาลักษณะของธาตุซิลิกอน	Scanning electron microscope
3	การศึกษาลักษณะการยึดเกาะของแคดเมียม	Scanning electron microscope
4	การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์	UV-vis spectrophotometry
5	การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ	DCFH-DA staining
6	การแยกโปรตีน Phytochelatins	Gel electrophoresis
7	การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์	UV-vis spectrophotometry
8	การทดสอบน้ำตาลในต้นอ่อนข้าวไรซ์เบอร์รี่	UV-vis spectrophotometry (microplate reader)

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	สารเคมี	แหล่งที่มา
1	Cadmium chloride (CdCl_2)	Fluka
2	Sodium hydroxide (NaOH)	Fluka
3	Hydrochloric (HCl)	J.T. Baker
4	Acetone	J.T. Baker
5	ethanolic hydrochloric	Fluka
6	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka
7	2,7-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA)	Fluka
8	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Merck
9	Tris base	Fluka
10	Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma Aldrich
11	Tris (2-carboxyethyl) Phosphine hydrochloride (TCEP)	Fluka
12	Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)	Fluka
13	β -mercaptoethanol	Fluka
14	monobasic dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Fluka
15	dibasic monohydrogen phosphate (K_2HPO_4)	Fluka
16	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	Fluka
17	(HEPES)	Sigma Aldrich
18	Bromobimane (mBBr)	B.D.H. Chemical
19	Diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)	Sigma Aldrich
20	Acetonitrile	J.T. Baker
21	Alcohol	Fluka
22	Evans blue	Fluka
23	N,N-Dimethyl formamide	Fluka
24	สารละลาย Hydroponics	H_2O hydro garden

3.1 การปลูกข้าวด้วยระบบ Hydroponics

3.1.1 ตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ใช้เมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีอายุหลังเก็บเกี่ยว 60 วัน จากเกษตรกรในโครงการข้าวปิ่นสุข อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ภายใต้การดูแลและควบคุมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ปลูกในพื้นที่นาข้าว อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม เป็นข้าวที่ปลอดสารเคมีเกษตรกรใช้ปุ๋ยอินทรีย์เท่านั้น

3.1.2 การปลูกข้าวระบบ Hydroponics

1) นำเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่มา 3 ส่วน ส่วนละ 100 กรัม ตากแดดนาน 6 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่น้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อแยกเมล็ดที่เสียออก และเตรียมเมล็ดสำหรับการงอก

2) นำเมล็ดข้าวขึ้นจากน้ำ เก็บใส่ไว้ในถุงพลาสติกซิปล็อคปิดให้มิดชิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวร้อนชื้นและมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง

3) จัดเตรียมภาชนะสำหรับปลูกข้าวระบบ Hydroponic ประกอบด้วย

3.1) ตาข่ายสีฟ้าขนาด 40 x 40 เซนติเมตร จำนวน 3 ผืน

3.2) ภาชนะทรง ขนาด (กว้าง x ยาว x สูง) 20 x 30 x 10

เซนติเมตร จำนวน 3 ใบ

3.3) คลิปหนีบกระดาษ 24 ตัว

3.4) นำตาข่ายมาตรึงเข้ากับภาชนะเพาะปลูกให้แน่น แล้วใช้คลิป

ยึดขอบไว้

3.5) เติมน้ำละลายธาตุอาหาร (nutrient solution) ให้ระดับสารละลายต่ำกว่าตาข่ายประมาณ 1 เซนติเมตร ก่อนทำการปลูกข้าว

4) ย้ายข้าวในข้อ 2) มาปลูกในภาชนะที่เตรียมไว้ในข้อ 3) วางภาชนะไว้ในที่ไม่มีแสงสว่างจนกว่าข้าวจะมีใบงอกออกมา (ประมาณ 48 ชั่วโมง)

5) เมื่อข้าวเริ่มมีใบงอกออกมา ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง (แสงไฟ fluorescence) ปลูกข้าวให้เจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 12 วัน เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหาร ทุกๆ 3 วัน

6) เมื่อครบ 12 วัน ให้ดำเนินการ ดังต่อไปนี้

6.1) ภาชนะใบที่ 1 ใส่สารละลายธาตุอาหารชนิดและปริมาณเท่าเดิม (ไม่มีแคดเมียม)

6.2) ภาชนะใบที่ 2 ใส่สารละลายธาตุอาหารพร้อมกับเติมสารละลายแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น $250 \mu M$ เพิ่มลงไป

6.3) ภาชนะใบที่ 3 เติมน้ำละลายธาตุอาหารพร้อมกับเติมสารละลายแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น $2500 \mu M$ เพิ่มลงไป

เมื่อเติมเสร็จแล้วเลี้ยงข้าวให้เจริญเติบโตตามปกติ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการดูดซึมโลหะแคดเมียมเข้าไปในเซลล์พืช

7) หลังจากครบ 15 วัน เก็บเกี่ยวข้าวทั้ง 3 ภาชนะ โดยใช้กรรไกรตัดแยก ราก ลำต้น ใบ ซึ่งจะได้ตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

- 7.1) รากกลุ่มควบคุม 7.2) ลำต้นกลุ่มควบคุม 7.3) ใบกลุ่มควบคุม
- 7.4) รากกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์
- 7.5) ลำต้นแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์
- 7.6) ใบกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์
- 7.7) รากแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์
- 7.8) ลำต้นแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์
- 7.9) ใบกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

นำตัวอย่างทั้งหมดไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส เตรียมนำไปศึกษาและวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่อไป



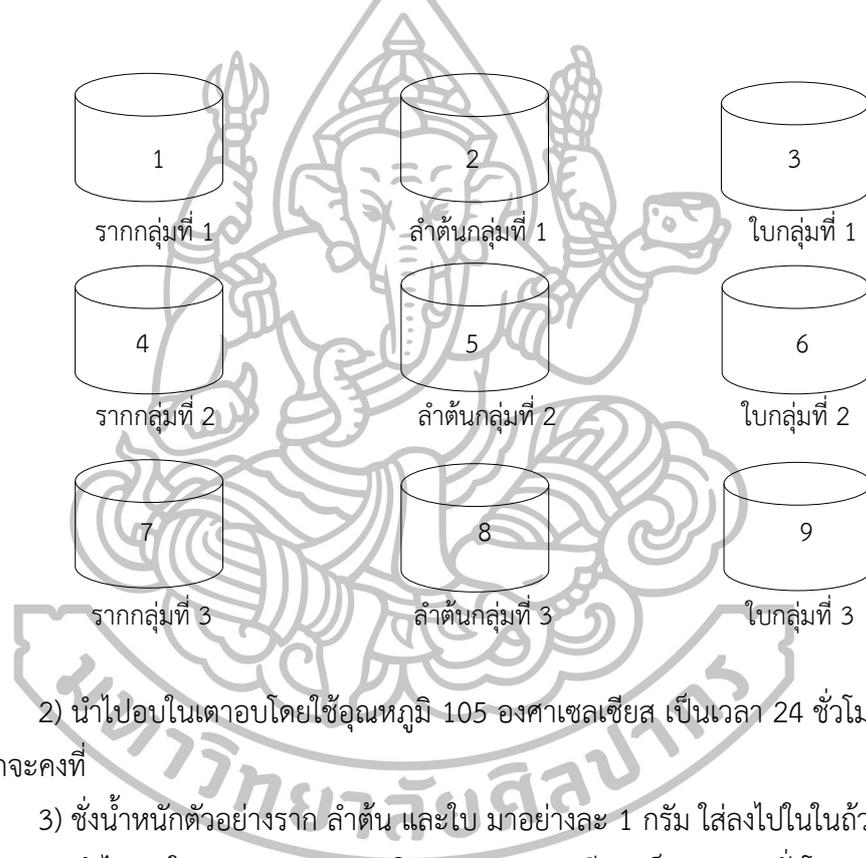
3.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ใช้ไม้บรรทัดวัดความสูงของต้นและความยาวของราก ทุกวัน ณ เวลา 9.00 น. บันทึกค่าในหน่วยเซนติเมตร เพื่อดูการเจริญเติบโตของรากและลำต้น ไปเรื่อยๆ จนครบระยะเวลาเก็บเกี่ยว หรือ 16 วัน ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ แคดเมียม (Cd) และซิลิกอน (Si)

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างสด

- นำตัวอย่างข้าวทั้ง 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์สะอาด ดังนี้



- นำไปอบในเตาอบโดยใช้อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

- ชั่งน้ำหนักตัวอย่างราก ลำต้น และใบ มาอย่างละ 1 กรัม ใส่ลงไปลงในถ้วยโลหะ
- นำไปเผาใน furnace อุณหภูมิ 750 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.3.2 การย่อยตัวอย่าง

- นำตัวอย่างที่เผาเสร็จจากตอนที่ 3.3.1 มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงไป 2.5 กรัม ทั้ง 10 ถ้วย (ถ้วยที่ 10 เป็น Blank)
- นำไปเผา เป็นเวลา 15 นาที จน NaOH ละลายหมด
- วางไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที ให้อุณหภูมิของตัวอย่างลดลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำ Deionized water ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป วางไว้นาน 12 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างละลายหมด

4) นำตัวอย่างในข้อ 3) มาปรับค่า pH ให้เป็นกรดโดยการเติมกรด HCl:H₂O อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 9 ขวดและ Blank อีก 1 ขวด แล้วนำไปวิเคราะห์ธาตุด้วยเทคนิค ICP-OES โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.4 การศึกษาลักษณะการจัดตัวของซิลิกอน (Si)

1) เก็บตัวอย่างดังต่อไปนี้

1.1) ราก ตัดรากให้ห่างจากปลายราก 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร

1.2) ใบ ตัดให้ห่างจากปลายใบ 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร

1.3) ลำต้น ตัดให้ห่างจากโคนต้น 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร

2) นำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อให้แห้ง

3) ตัดตัวอย่างลงบนแท่นวางตัวอย่าง พร้อมเขียนชื่อกำกับตัวอย่างให้ชัดเจน

การเตรียมแท่นวางตัวอย่าง เตรียมโดยการตัดแผ่นสไลด์ขนาด 2 X5 เซนติเมตร หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยด์แล้วติดด้วยแผ่นคาร์บอนเทปลงบนอลูมิเนียมฟอยด์ ลอกแผ่นเทปปิดหน้าออก แล้วติดตัวอย่างลงไป

4) นำไปวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของซิลิกอนด้วย Scanning electron microscope (SEM) ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้เครื่องของบริษัท Hitachi Scanning Electron Microscope รุ่น 3030 Plus วางตัวอย่างอยู่ห่างจากเครื่องตรวจจับ (BSE detector) เท่ากับ 4.5 มิลลิเมตร และใช้พลังงานตรวจจับเท่ากับ 15 กิโลอิเล็กตรอนโวลต์ (keV.) การสแกนไมโครอิเล็กตรอนจะใช้โหมดผสมระหว่าง BSE และ SE ทำงานร่วมกัน การวิเคราะห์ X-ray microanalysis นั้นจะติดตั้ง silicon drift detector (SDD) เพื่อให้ได้องค์ประกอบธาตุของกลุ่มตัวอย่าง ส่วน EDX spectrum จะใช้โหมดสแกนคลื่นความถี่แบบอัตโนมัติภายใน 3 นาที และการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุต่างๆ จะใช้ระบบ auto identification ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล และ Mapping ของธาตุต่างๆจะใช้โหมดการสะสมพลังงาน X-ray ของธาตุนั้นๆซึ่งใช้เวลาวิเคราะห์ 6 นาที

3.5 การศึกษาลักษณะการยึดเกาะของแคดเมียมบนรากข้าว

1) เก็บตัวอย่างดังต่อไปนี้

ราก ตัดรากให้ห่างจากปลายราก 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร

ใบ ตัดให้ห่างจากปลายใบ 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร

ลำต้น ตัดให้ห่างจากโคนต้น 1 เซนติเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร

2) นำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อให้แห้ง

3) ตัดตัวอย่างลงบนแท่นวางตัวอย่าง พร้อมเขียนชื่อกำกับตัวอย่างให้ชัดเจน

4) นำไปส่องดูการยึดเกาะของแคดเมียมด้วยกล้อง Scanning electron microscope (SEM) ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ

3.6.1 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์อ้างอิงตาม Whitham (1971) ดังนี้

1) การเตรียมตัวอย่าง

- 1.1) ชั่งตัวอย่างใบข้าวทั้ง 3 ตัวอย่างมาตัวอย่างละ 1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่ง ให้ละเอียด เติม acetone เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- 1.2) วางไว้ที่มืดนาน 15 นาที กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
- 1.3) ปรับปริมาตรด้วย acetone เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์เป็น 15, 20 หรือ 25 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นขององค์ประกอบสีเขียว
- 1.4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร
- 1.5) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปแทนค่าในสูตร หาปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณ คือ

Chlorophyll a

$$= [12.7(\text{Absorbance at } 663 \text{ nm}) - 2.69(\text{Absorbance at } 645 \text{ nm})] \times (V / 1000 W)$$

Chlorophyll b

$$= [22.9(\text{Absorbance at } 645 \text{ nm}) - 4.68(\text{Absorbance at } 663 \text{ nm})] \times (V / 1000 W)$$

Total chlorophyll

$$= [20.2(\text{Absorbance at } 645 \text{ nm}) + 8.02(\text{Absorbance at } 663 \text{ nm})] \times (V / 1000 W)$$

V คือ ปริมาตรหลังเจือจางแล้ว

W คือ น้ำหนักสดของใบข้าว

ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.6.2 การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินอ้างอิงตาม Ranganna ,1986 ดังนี้

- 1) ชั่งตัวอย่างใบข้าว 3 ตัวอย่างมาตัวอย่างละ 1 กรัม ปั่นให้ละเอียด เติม ethanolic hydrochloric ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท
- 2) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสภาวะมืดนาน 5 ชั่วโมง
- 3) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
- 4) ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย ethanolic hydrochloric ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร
- 6) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณแอนโทไซยานิน ทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสดโดยสูตรที่ใช้คำนวณ คือ

Total absorbance

$$= \frac{\text{Absorbance at 535 nm} \times \text{final volume} \times 100}{\text{Weight of sample}}$$

Total anthocyanin content

$$= \frac{\text{Total absorbance}}{98.2}$$

ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.6.3 การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมอ้างอิงตาม (Pawelzik, 2005) ดังนี้

- 1) ชั่งตัวอย่างใบข้าว 3 ตัวอย่างมาตัวอย่างละ 1 กรัม ปั่นให้ละเอียด แล้วนำไปแช่ใน dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท
- 2) เขย่าสารละลายผสม ด้วยความเร็วและแรงนาน 2 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 16 ชั่วโมง
- 3) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
- 4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 นาโนเมตร
- 5) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปแทนค่าในสูตร เพื่อหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณดังนี้

Chlorophyll a

$$= [(12.19 \times \text{Absorbance at 665}) - (3.45 \times \text{Absorbance at 649})] \mu\text{g/gFW}$$

Chlorophyll b

$$= [(21.99 \times \text{Absorbance at 649}) - (5.32 \times \text{Absorbance at 665})] \mu\text{g/gFW}$$

Total carotenoid

$$= \frac{[(1000 \times \text{Absorbance at 480}) - (2.14 \times \text{Chlorophyll a}) - (70.16 \times \text{Chlorophyll b})]}{220}$$

ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.7 การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DCFH-DA staining

- 1) ปลุกข้าวตามตอนที่ 3.1 เป็นระยะเวลา 15 วัน
- 2) ตัดรากข้าวความยาว 1 เซนติเมตร วัดจากปลายราก โดยใช้กลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ราก (แบ่ง 5 รากมาทำ positive control) และกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ตัวอย่างละ 5 ราก จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 4 กลุ่ม นำไปแช่ไว้ในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนการทดลอง

3) เตรียมสารละลาย 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ความเข้มข้น 25 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด

4) ทำ Positive control โดยนำรากข้าวกลุ่มควบคุมมาจำนวน 5 รากแช่ใน 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นเวลา 15 นาที

4) นำรากข้าวทั้ง 4 ตัวอย่าง ลงไปแช่ในสารละลาย (DCFH-DA) เป็นเวลา 15 นาที

5) นำรากข้าวไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะความเสียหายของเซลล์ โดยใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 10X และทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.8 การแยกโปรตีน Phytochelatin โดยเทคนิค gel electrophoresis

ขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากรากข้าวไรซ์เบอร์รี่และการแยกแถบชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis ในส่วนของการสกัด ได้ปรับปรุงระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด สารละลาย และเวลาในการตกตะกอน ส่วนขั้นตอนอื่น มีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ตามรายละเอียด ดังต่อไปนี้

3.8.1 การสกัดโปรตีนจากรากข้าว

- 1) ชั่งรากข้าวตามน้ำหนักที่ต้องการ ใส่ลงไปไนโคร่ง
- 2) เติมบัฟเฟอร์สกัดให้ท่วมรากข้าว
- 3) เติมไนโตรเจนเหลวลงไปแล้วบดรากข้าวให้เอียดเป็นผงแป้ง
- 4) เติมบัฟเฟอร์ลงไปเพิ่มเล็กน้อย แล้ว incubated ตามที่กำหนด
- 5) นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก supernatant ออกจากกากราก
- 6) นำ crude protein ที่ได้ ไปใช้หรือตกตะกอนก่อนใช้ในขั้นตอนการแยกด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.8.2 SDS-poly acrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารเคมี

สาร	รายละเอียดการเตรียมสาร
a.	28% acrylamide และ 0.74% bis-acrylamide
b.	0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8, 0.4% SDS, 185 μ L TEMED
c.	1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8, 0.4% SDS, 400 μ L TEMED
d.	10% Ammonium persulfate in water
e.	Sample loading solution : 0.27 M Tris-HCl buffer pH 8.0, 2.0 M 2-Mercaptoethanol 6.2% (w/v) SDS, 31.1% (w/v) glycerol and 0.0075% Bromophenol blue in water
f.	Electrophoresis buffer: Tris-glycine buffer, pH 8.3 (3.07 g Tris, 14.4 g glycine and 0.5 g SDS in 500 ml water)
g.	N,N,N,N-tetramethyldiamine (TEMED)
Dye solution	0.1% Coomassie blue R-250 in methanol acetic acid-water (5:1:5)
Distaining solution	Acetic acid- methanol- water (7:7:86)

การเตรียม acrylamide gel

- 1) จัดเตรียมแผ่นกระจกและแท่นวางให้เรียบร้อย
- 2) ปิเปตต์สารละลายตามตารางลงในบีกเกอร์ A และ B ผสมให้เข้ากัน

ตารางที่ 3.4 การเตรียม acrylamide gel

Flask	Layer	% Acryl.	(ml) solution			
			a	b	c	DI water
A	Resolving gel	14%	7.46	-	4.40	4.2
B	Stacking gel	4%	1.6	3.0	-	7.1

3) ทิ้งที่ปิเปตต์สารละลาย d ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงในหลอด A ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วรีปิเปตต์สารละลายนี้ใส่ลงในแผ่นกระจกในข้อ 1

4) ปิเปตต์น้ำกลั่นลงไปผิวหน้าของสารละลายข้อ 3 แล้วตั้งแผ่นกระจกไว้ประมาณ 30 นาที ห้ามให้เกิดการสั่นสะเทือน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Polymerization และผิวหน้าเจลเรียบ

5) เมื่อครบเวลา สังเกตรอยต่อของ Polymerized gel กับน้ำกลั่นให้ชัดเจน แล้วเทน้ำกลั่นทิ้ง

6) ปิเปตต์สาร d. ลงใน Flask B ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วรีบปิเปตต์สารละลายนี้ใส่ลงในแผ่นกระจกในข้อ 5 ความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วตั้งแผ่นกระจกไว้ประมาณ 30 นาที

7) เมื่อครบเวลาให้ดึง comb ออก

8) ประกอบแผ่นกระจกกับเครื่อง electrophoresis ให้เรียบร้อย

การทำ electrophoresis

1) ผสมตัวอย่าง 100 μ l กับสารละลาย e. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที

2) ปิเปตต์ 5 ไมโครลิตร ของสารตัวอย่างและ marker ลงแต่ละช่องของเจล

3) Run electrophoresis ความต่างศักย์ 15 mA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4) แกะแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก ย้อมด้วย dye solution เป็นเวลา 30 นาที

5) ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution

6) เมื่อเห็นแถบโปรตีนแล้ว ทำการหาค่า Rf ของ Std. protein และ unknow

7) plot graph ระหว่าง log MW (แกน y) กับค่า Rf (แกน x)

8) หา MW. ของตัวอย่างจากกราฟ

ต่อไปนี้เป็นรายละเอียดแสดงการพยายามหาวิธีการสกัดโปรตีนและวิธีการแยกแถบโปรตีน ซึ่งได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลจากงานวิจัยที่ผ่านมาๆ และเลือกดำเนินการตามข้อมูลอ้างอิงที่มีความเป็นได้ ตลอดจนความพร้อมด้านสารเคมี เครื่องมืออุปกรณ์ที่สำหรับการดำเนินการครั้งนี้ด้วย ซึ่งมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

การทดลองครั้งที่ 1 อ้างอิงวิธีการของ (Abrahamson et al., 1992) มีรายละเอียดดังนี้

1) บดรากข้าว 5 กรัม

2) เติมน้ำฟอสเฟต Tris HCl (50 mM Tris HCl pH 7.8 และ 1 mM PMSF)

ปริมาตร 5 มิลลิตร

3) Incubated ที่อุณหภูมิ -4°C เป็นเวลา 30 นาที

4) นำ crude protein มาแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 2 ปรับปรุงจากการทดลองครั้งที่ 1 มีรายละเอียดดังนี้

1) บดรากข้าว 15 กรัม

2) เติมน้ำฟอสเฟต Tris HCl buffer (50 mM Tris HCl pH 7.8 และ 1 mM PMSF)

ปริมาตร 10 มิลลิตร

3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated -4°C เป็นเวลา 30 นาที

4) ปั่นเหวี่ยงแล้วแยก supernatant ออกมา

- 5) นำ supernatant มาตกตะกอนใน 80 % acetone
- 6) ละลายตะกอน แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 3 อ้างอิงวิธีการของ (Akhter et al., 2012) มีรายละเอียดดังนี้

- 1) บดรากข้าว 20 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟอรัส 6.3 mM DTPA ,0.1% (v/v), 20 mM TCEP ปริมาตร 10

มิลลิลิตร

- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated ที่อุณหภูมิ -4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) ปั่นเหวี่ยงแล้วแยก supernatant ออกมา
- 5) นำ supernatant มาตกตะกอนใน 80 % acetone
- 6) ละลายตะกอน แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 4 ปรับปรุงจากการทดลองครั้งที่ 3 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) บดรากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟอรัส 6.3 mM DTPA ,0.1% (v/v), 20 mM TCEP, 20 mM EDTA, 10 μL mercaptoethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- 3) Incubated ที่อุณหภูมิ -4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) นำ supernatant มาตกตะกอนใน 80 % acetone
- 5) ละลายตะกอน แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 5 อ้างอิงวิธีการของ (Speiser et al., 1992) มีรายละเอียดดังนี้

- 1) บดรากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟอรัส 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- 3) ปั่นเหวี่ยงแล้วแยก supernatant ออกมา
- 5) นำ supernatant มาตกตะกอนใน 80 % acetone
- 6) ละลายตะกอน แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 6 ปรับปรุงจากการทดลองครั้งที่ 5 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟอรัส 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF, 20 mM EDTA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated ที่อุณหภูมิ -4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) ปั่นเหวี่ยงแล้วแยก supernatant ออกมา
- 5) นำ supernatant มาตกตะกอนใน 80 % acetone

6) ละลายตะกอน แล้วแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 7 อ้างอิงวิธีการของ (Najmanova et al., 2012) มีรายละเอียดดังนี้

- 1) บดรากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟต 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated -4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) ปั่นเหวี่ยงแล้วแยก supernatant ออกมา
- 5) นำ supernatant มาตกตะกอนใน 80 % acetone
- 6) ละลายตะกอน แล้วแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 8 อ้างอิงวิธีการของ (Kawakami et al., 2006) มีรายละเอียดดังนี้

- 1) บดรากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟต 0.1 M HCl, 5 mM EDTA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- 3) ปั่นเหวี่ยง แล้วแยก supernatant ออกมา
- 4) นำ supernatant 250 μL มาเติม 20 mM tris HCl, 5 mM DTPA เป็นเวลา

5 นาที

- 5) เติม 200 mM (HEPES), 5 mM EDTA pH 9.0
- 6) เติม 100 mM mBBr
- 7) นำ crude protein มาแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 9 ปรับปรุงจากวิธีการของ (Fan et al., 2004) มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 20 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟต 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนน้ำฟอสเฟตที่ 70°C ก่อนใช้
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 70°C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 80 % acetone
- 5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 10 ปรับปรุงจากการทดลองที่ 9 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 20 กรัม
- 2) เติมน้ำฟอสเฟต 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4°C
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 80 % acetone
- 5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 11 ปรับปรุงจากการทดลองที่ 10 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 20 กรัม
- 2) เติมน้ำฟเฟออร์ 5.8 mM mBrB, 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนน้ำฟเฟออร์ ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนใช้
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 70 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 80 % acetone
- 5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 12 ปรับปรุงจากการทดลองที่ 11 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 20 กรัม
- 2) เติมน้ำฟเฟออร์ 5.8 mM mBrB, 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ให้ความร้อนน้ำฟเฟออร์ ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนใช้
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 70 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 100 % acetone
- 5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 13 ปรับปรุงจากการทดลองที่ 12 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 20 กรัม
- 2) เติมน้ำฟเฟออร์ 5.8 mM mBrB, 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid, 20 mM EDTA และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ให้ความร้อนน้ำฟเฟออร์ ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนใช้
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 70 °C เป็นเวลา 60 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 80 % acetone และ 100% acetone
- 5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 14 ปรับปรุงจากการทดลองที่ 13 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำฟเฟออร์ 5.8 mM mBrB, 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid, 20 mM EDTA และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ให้ความร้อนน้ำฟเฟออร์ ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนใช้
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 70 °C เป็นเวลา 60 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 80 % acetone

5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การทดลองครั้งที่ 15 ปรับปรุงจากการทดลองที่ 14 มีรายละเอียดดังนี้

- 1) รากข้าว 30 กรัม
- 2) เติมน้ำบัฟเฟอร์ 5.8 mM mBrB, 50 mM HEPPS, 5 mM diethylenetriamine pentaacetic acid, 20 mM EDTA, 0.1% mercaptoethanol และ 50 % acetonitrile pH 8 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ให้ความร้อนบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนใช้
- 3) เมื่อผสมตัวอย่างแล้ว incubated 70 °C เป็นเวลา 60 นาที
- 4) และตกตะกอนใน 80 % acetone
- 5) นำตะกอนมาละลายและแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.9 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ราก

3.9.1 การเตรียมตัวอย่าง

- 1) ปลุกข้าวตามขั้นตอนที่ 3.1 เป็นระยะเวลา 15 วัน
- 2) ตัดรากข้าวความยาว 1 เซนติเมตร วัดจากปลายราก โดยใช้ control 10 ราก (แบ่ง 5 รากมาทำ positive control) และ 250 2500 ตัวอย่างละ 5 ราก จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 4 กลุ่ม นำไปแช่ไว้ในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนทำการทดลอง
- 3) เตรียมสารละลาย 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ความเข้มข้น 25 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด
- 4) ทำ positive control โดยนำรากข้าวกลุ่มควบคุมมาจำนวน 5 รากแช่ใน 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นเวลา 15 นาที

3.9.2 ทดสอบผลของแคดเมียมต่อเซลล์บริเวณปลายรากข้าว

- 1) นำรากข้าวไรซ์เบอร์รี่ 3 ตัวอย่างประกอบด้วย รากข้าวที่เลี้ยงในสารละลายที่มีแคดเมียมความเข้มข้น 0, 250 μ M และ 2500 μ M แช่ในสารละลายอีวานส์ บลู (0.25% w/v ของสารละลาย Evans blue) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) นำรากในข้อ 1 มาล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที และตัดปลายรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โดยวัดจากปลายรากไปหาโคนราก นำไปถ่ายรูปแบบ micro - image
- 3) แช่ใน N,N - Dimethylformamide ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4) กรองเฉพาะสารละลาย N,N - Dimethylformamide และนำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ N,N - Dimethylformamide ที่ไม่ได้ใช้แช่รากเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) กับสารละลาย N,N - Dimethylformamide ที่กรองได้จากการ แช่ปลายราก นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

3.10 การแยกคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

1) เตรียมเฟสเคลื่อนที่ n-butanol : acetic acid : water ในอัตราส่วน 2:1:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในบิกเกอร์ 500 มิลลิลิตร

2) หยดสารละลาย standard และสารละลายตัวอย่างลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี แล้วปล่อยให้แห้ง

3) นำกระดาษโครมาโตกราฟีจุ่มลงไป ในบิกเกอร์ข้อ 1) ใช้แผ่นกระจกปิดปากบิกเกอร์ไว้ ปล่อยให้แห้งจนกว่าเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนขึ้นไปเกือบถึงขอบกระดาษ

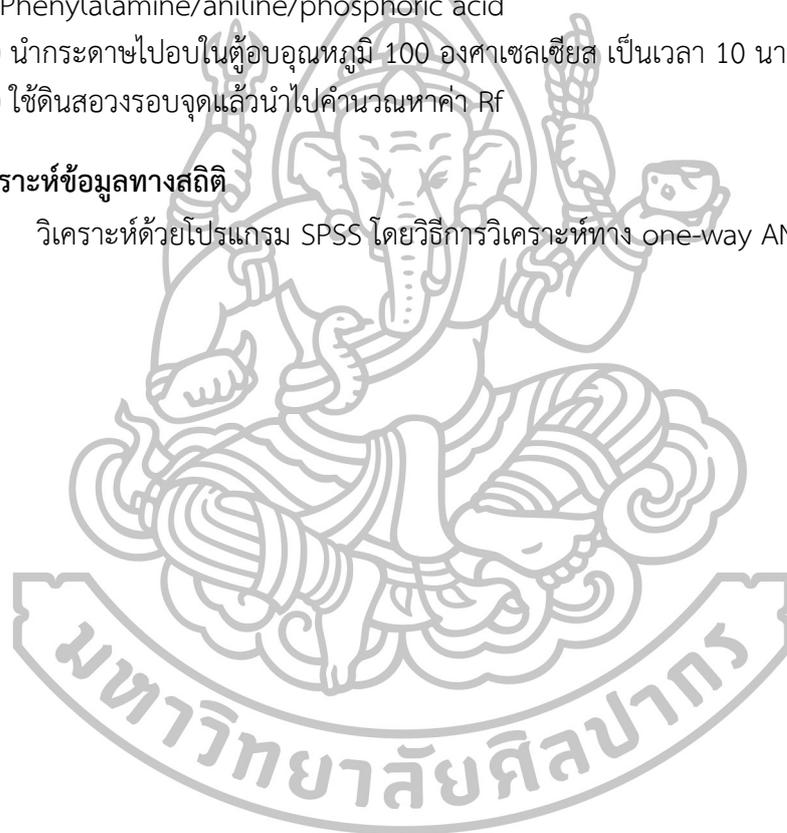
4) นำกระดาษขึ้นจากบิกเกอร์แล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ควีน ก่อนนำไปจุ่มด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย Phenylamine/aniline/phosphoric acid

5) นำกระดาษไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6) ใช้ดินสอวงรอบจุดแล้วนำไปคำนวณหาค่า Rf

3.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิธีการวิเคราะห์ทาง one-way ANOVA



บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การศึกษาผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิลิกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างโปรตีนไฟโตคีเรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและชีวภาพบางประการของข้าวไรซ์เบอร์รี่ ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ อายุการเพาะปลูก 16 วัน โดยการใช้วิธีการและเทคนิคต่างๆที่หลากหลายในการศึกษา ซึ่งในการทดลองได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นกลุ่มที่ปลูกในสารละลาย Hydroponics เพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่ปลูกในสารละลาย Hydroponics ที่มีแคดเมียมผสมอยู่ 250 μM และกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่ปลูกในสารละลาย Hydroponics ที่มีแคดเมียมผสมอยู่ 2500 μM โดยในการปลูกข้าวทั้ง 3 กลุ่มนี้ ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมกับคุณสมบัติด้านต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 ซึ่งรายละเอียดผลการศึกษาวិเคราะห์ต่างๆ จะรายงานตามหัวข้อดังต่อไปนี้

- (1) อัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวไรซ์เบอร์รี่
- (2) วิเคราะห์ปริมาณโลหะ แคดเมียม (Cd) และซิลิกอน (Si) โดยเทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- (3) ลักษณะการจัดตัวของซิลิกอนโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM)
- (4) ลักษณะการยึดเกาะของแคดเมียมโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM)
- (5) การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ A คลอโรฟิลล์ B แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ โดยใช้เทคนิค UV-vis spectrophotometry
- (6) การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DCFH-DA staining
- (7) การแยกโปรตีน Phytochelatin โดยเทคนิค gel electrophoresis
- (8) การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้สารละลาย Evans blue
- (9) การทดสอบน้ำตาลในข้าวโดยเทคนิค Thin layer chromatography

4.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่

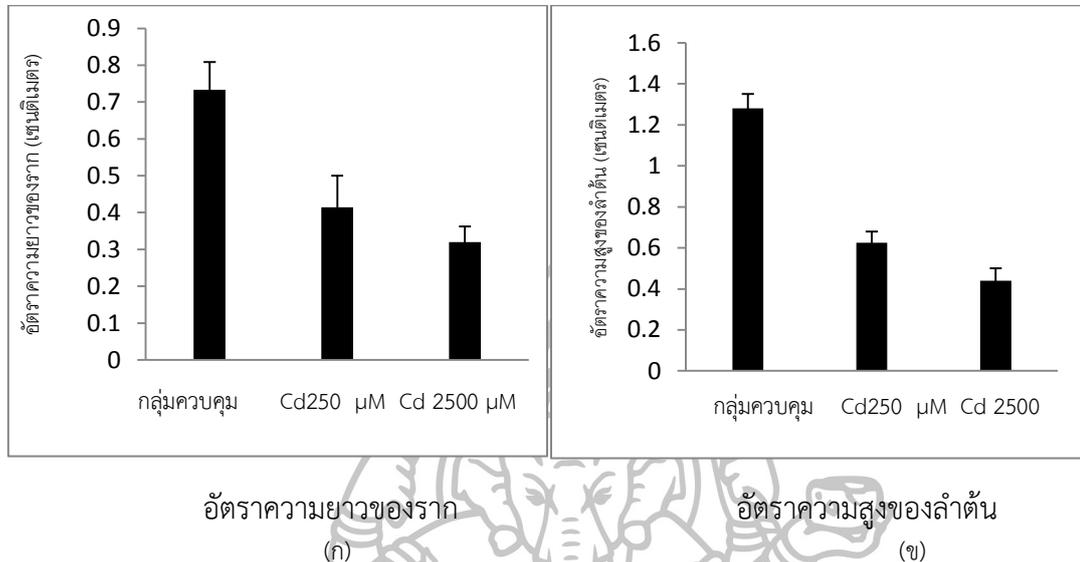
อัตราการเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง เก็บข้อมูลโดยวัดความสูงของลำต้นและความยาวของรากในหน่วยเซนติเมตร โดยบันทึกผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 16 วัน ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของข้าวทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ได้แสดงผลการศึกษาดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ที่ปลูกในระบบ Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน

วันที่	ความยาวราก (เซนติเมตร)			ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
1	0.5	0.27	0.33	0	0.33	0
2	0.97	0.57	0.57	0.27	1	0.17
3	1.53	0.93	0.9	0.63	1.2	0.5
4	2.1	1.43	1.27	1.23	1.8	1.13
5	4.07	1.73	1.57	2.33	3.03	1.63
6	6.17	2.13	1.8	3.83	5.27	2.23
7	7.27	2.6	2	5.6	5.73	2.9
8	8.67	3.07	2.2	8.33	6.5	3.67
9	9.3	3.17	2.4	11.77	6.8	4.23
10	9.9	3.8	2.67	14	7.47	4.83
11	10.3	4.23	2.9	15.17	7.87	5.07
12	10.53	4.77	2.9	16.33	8.17	5.47
13	10.83	5.27	3.5	17.77	8.57	5.73
14	11.33	5.5	4	18.4	8.97	6.17
15	11.67	6.23	4.37	19.17	9.27	6.7
16	11.73	6.63	5.1	20.5	10	6.97

จากตารางพบว่า ข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง มีขึ้นการเจริญเติบโตโดยเริ่มจากการงอกของรากก่อน และเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 24 ชั่วโมงโดยเฉลี่ย จะเริ่มมีลำต้นงอกขึ้นมา และหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จะมีการเพิ่มความยาวรากและความสูงของลำต้นไปพร้อมๆ กัน จนถึงช่วงประมาณวันที่ 10 ความยาวของรากจะเริ่มคงที่และมีการแตกขนรากออกมาอย่างต่อเนื่อง ขณะที่ความสูงของลำต้นยังคงมีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ โดยมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ได้ผลแสดงผลดังรูปที่ 4.1 เมื่อนำ

ข้อมูลการเจริญเติบโตจากตารางที่ 4.1 มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของรากและลำต้น ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ก) อัตราความยาวของราก (ข) อัตราความสูงของลำต้น(เซนติเมตร/วัน) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

จากภาพที่ 4.1 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของรากกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ย 0.733 ± 0.066 เซนติเมตร/วัน กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ เฉลี่ย 0.414 ± 0.026 เซนติเมตร/วัน และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์เฉลี่ย 0.32 ± 0.16 เซนติเมตร/วัน ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของลำต้นพบว่า ในกลุ่มที่ 1 มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 1.28 ± 0.066 เซนติเมตร/วัน กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ย 0.625 ± 0.16 เซนติเมตร/วัน และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์มีค่าเฉลี่ย 0.44 ± 0.06 เซนติเมตร/วัน ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าในกลุ่มควบคุม นั้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ โดยมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองอธิบายได้ว่าพืชตระกูลข้าวมีความไวต่อโลหะแคดเมียมสูง (Chen et al., 2012) โดยอวัยวะส่วนรากจะเป็นเนื้อเยื่อส่วนที่สัมผัสกับดินและดูดซึมแคดเมียมจากดินผ่านกระบวนการ apoplastic transport เข้ามายังลำต้น ทำให้แคดเมียมสะสมส่วนต่างๆ ของต้นข้าวได้ เมื่อแคดเมียมเข้าไปสะสมในเซลล์จะไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนสังเคราะห์ไนเซลล์ เช่น phosphoenol-pyruvate carboxylase (Santos et al., 2012) ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งรากและลำต้นแบบยืดของเซลล์ (elongation growth rate) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลำต้น (Herath et al., 2014) จึงทำให้ข้าวกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะแคดเมียม (Cd) และซิลิกอน (Si)

การวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมที่สะสมในส่วนต่างๆของข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อเป็นการยืนยันว่าข้าวที่เจริญเติบโตในสภาพที่มีโลหะแคดเมียมนั้น มีการดูดซึมแคดเมียมเข้าไปในเซลล์มากน้อยเพียงใด และไปสะสมอยู่ในบริเวณใดมากที่สุด ส่วนการหาปริมาณซิลิกอน เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าแคดเมียมมีผลต่อปริมาณซิลิกอนในส่วนต่างๆ ของข้าวหรือไม่ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแคดเมียมและซิลิกอนที่สะสมในส่วน ราก ลำต้น และใบของข้าวไรซ์เบอร์รี่

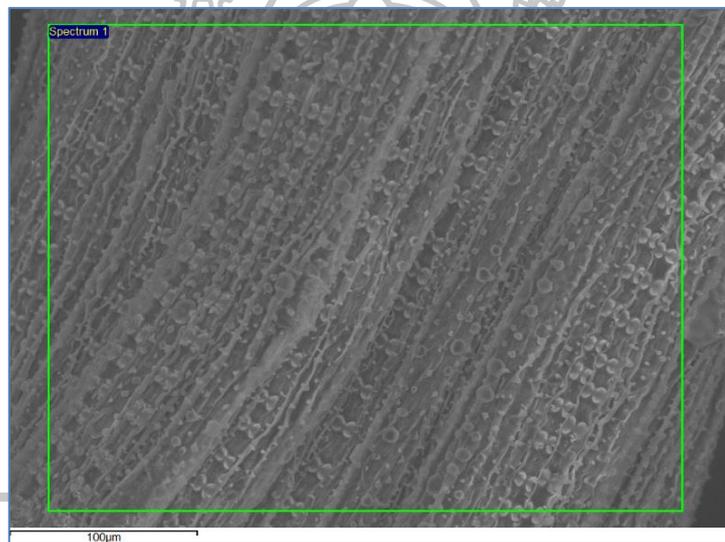
ตัวอย่าง	ปริมาณแคดเมียม ($\mu\text{g/g}$)	ปริมาณซิลิกอน ($\mu\text{g/g}$)
รากกลุ่มที่ 1	0 \pm 0	1.87 \pm 0.5
ลำต้นกลุ่มที่ 1	0 \pm 0	53.59 \pm 7.4
ใบกลุ่มที่ 1	0 \pm 0	50.91 \pm 5.5
รากกลุ่มที่ 2	6.54 \pm 1.8	2.84 \pm 2.0
ลำต้นกลุ่มที่ 2	0.83 \pm 1.2	52.61 \pm 3.9
ใบกลุ่มที่ 2	0.19 \pm 0.14	52.63 \pm 6.0
รากกลุ่มที่ 3	40.98 \pm 1.5	3.24 \pm 0.23
ลำต้นกลุ่มที่ 3	2.85 \pm 1.0	36.48 \pm 7.2
ใบกลุ่มที่ 3	1.06 \pm 0.11	36.63 \pm 6.2

จากตารางพบว่า ข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง มีปริมาณการสะสมของแคดเมียมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 กลุ่ม โดยในกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ มีการดูดซึมโลหะแคดเมียมแล้วไปสะสมในบริเวณราก ลำต้น และใบ ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมในสารละลายสูงขึ้น เมื่อแยกพิจารณาจะเห็นว่ากลุ่มควบคุมไม่มีการสะสมแคดเมียม ขณะที่ในกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ นั้น มีสารสะสมแคดเมียมในราก ลำต้น และใบเท่ากับ 6.54, 0.83 และ 0.19 ตามลำดับ และ 40.98, 2.85 และ 1.06 ในกลุ่มที่ 3 ทั้งนี้ เนื่องมาจากกลุ่มควบคุมนั้นไม่มีการเติมสารละลายแคดเมียมลงไป ในสารละลาย Hydroponics

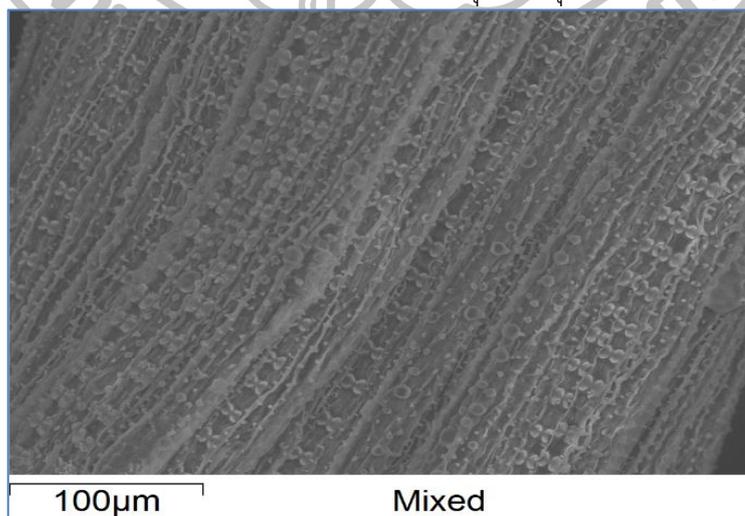
เมื่อพิจารณาปริมาณซิลิกอนพบว่าในส่วนราก กลุ่มควบคุม จะมีปริมาณซิลิกอนต่ำที่สุด เท่ากับ 1.87 และเพิ่มขึ้นในกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 2.84 และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 3.24 ตามลำดับ ส่วนลำต้นและใบพบว่ากลุ่มควบคุม เท่ากับ 53.59 และ 50.91 กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 52.61 และ 52.63 กลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 36.48 และ 36.63 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณการสะสมซิลิกอนทั้ง 3 ส่วนเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันทั้ง 3 กลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3 การศึกษาลักษณะของธาตุซิลิกอน (Silicon bodies) โดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

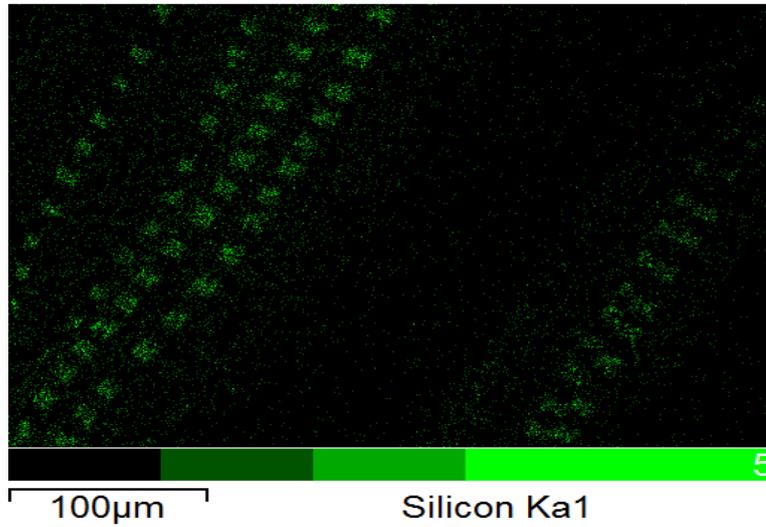
การศึกษาลักษณะของซิลิกอนในส่วนต่างๆ ของต้นข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นผลเนื่องมาจากข้อมูลจากทาง ICP- OES ที่แสดงให้เห็นว่า ปริมาณซิลิกอนในข้าวทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างนั้น มีปริมาณไม่เท่ากัน จึงตั้งสมมติฐานว่าถ้าปริมาณซิลิกอนเปลี่ยนไป การจัดตัวของซิลิกอนในพีชจะเปลี่ยนแปลงด้วยหรือไม่ ดังนั้น จึงใช้เครื่องมือ Scanning electron microscope (SEM) ในการถ่ายภาพเพื่อศึกษาการเรียงตัวของธาตุซิลิกอนภายในส่วนต่างๆ ของข้าว ในทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง และรายงานผลการศึกษาดังต่อไปนี้



โครงสร้างเนื้อเยื่อใบข้าวกลุ่มควบคุม

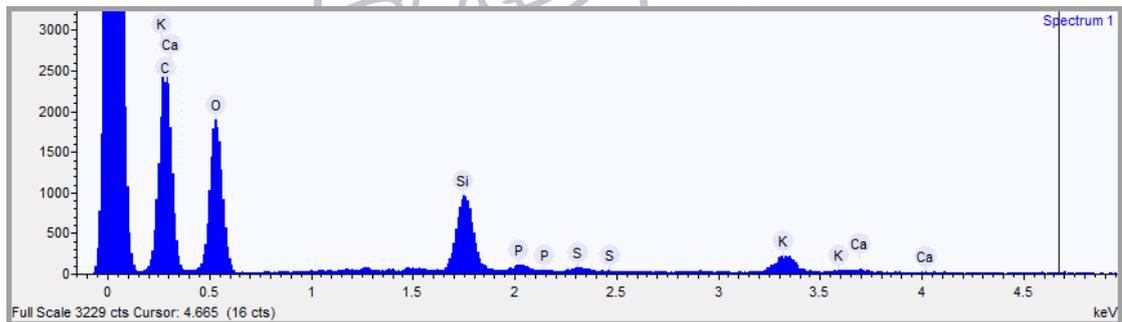


ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในใบข้าวกลุ่มควบคุม

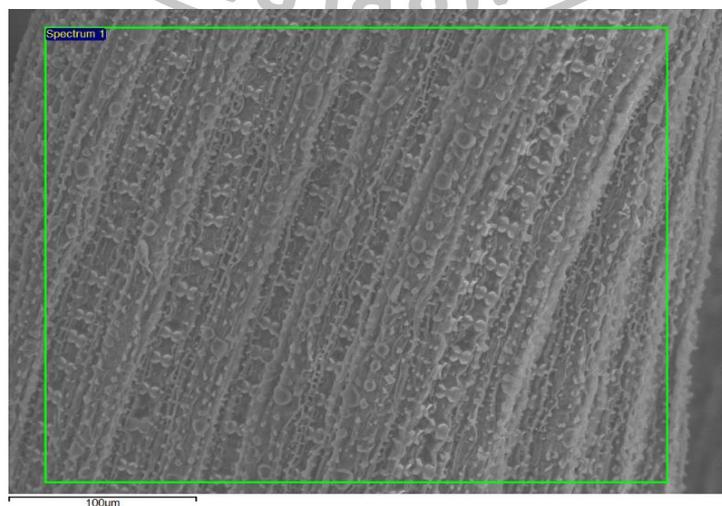


ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในไข้วกลุ่มควบคุม

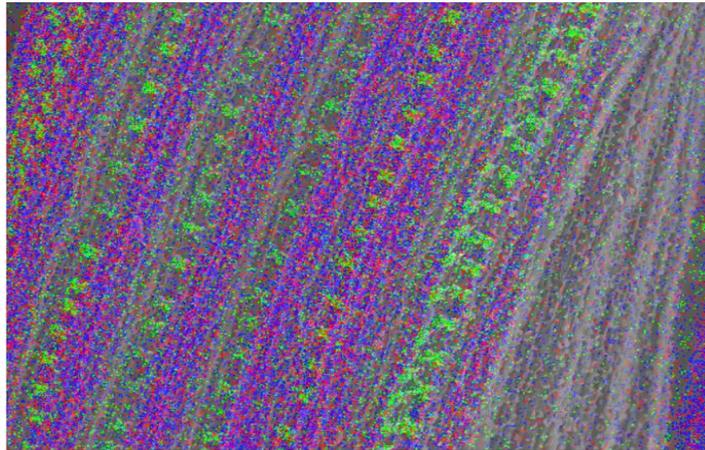
(ก) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในไข้วกลุ่มควบคุม



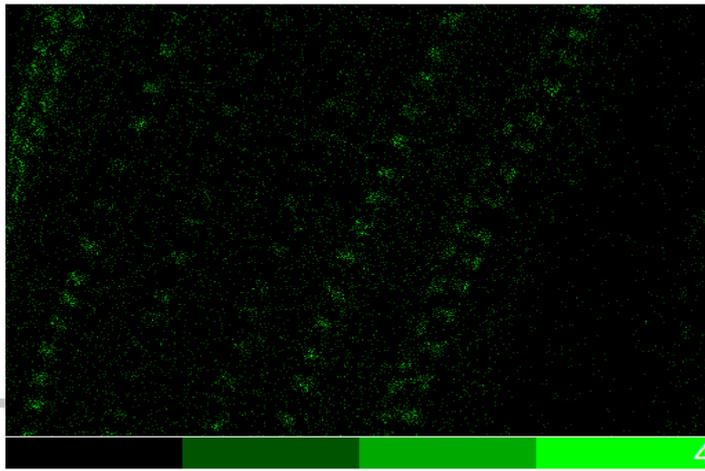
(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในไข้วกลุ่มควบคุม



โครงสร้างเนื้อเยื่อไข้วกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์

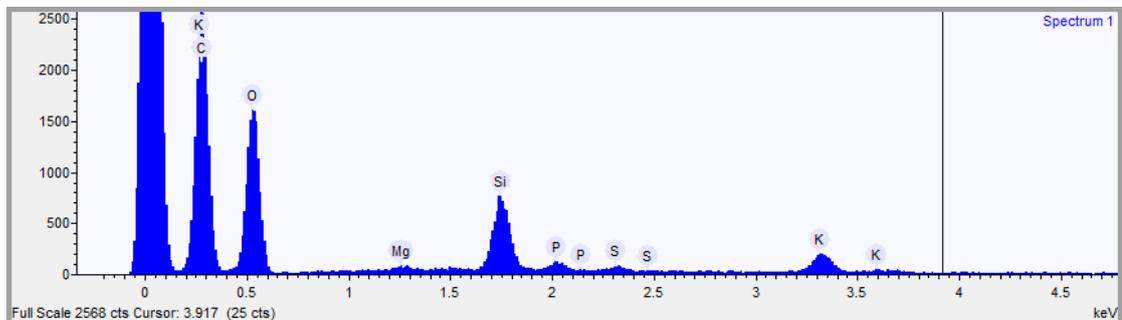


100µm Mixed
 วัสดุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในใบข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์

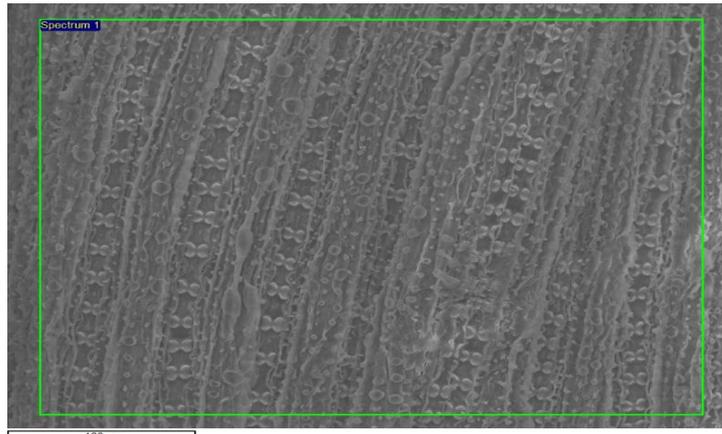


100µm Silicon Ka1
 ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในใบข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์

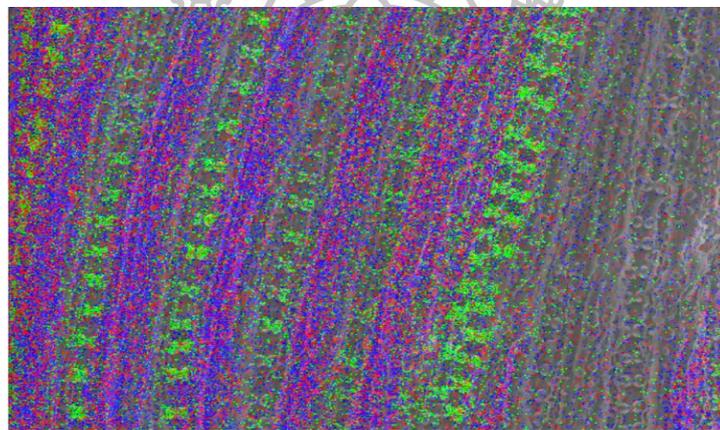
(ค) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในใบข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์



(ง) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในใบข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์

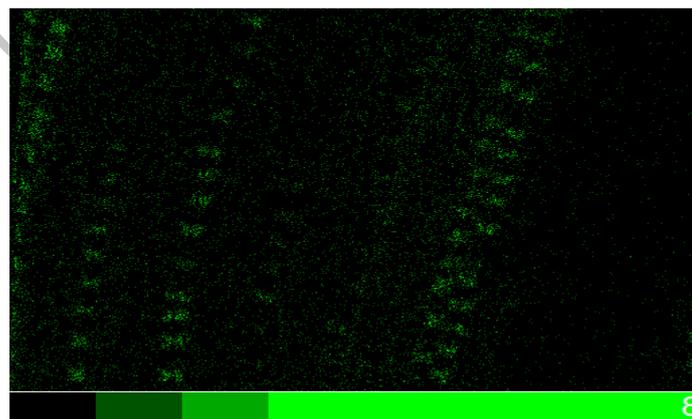


โครงสร้างเนื้อเยื่อใบข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



100µm Mixed

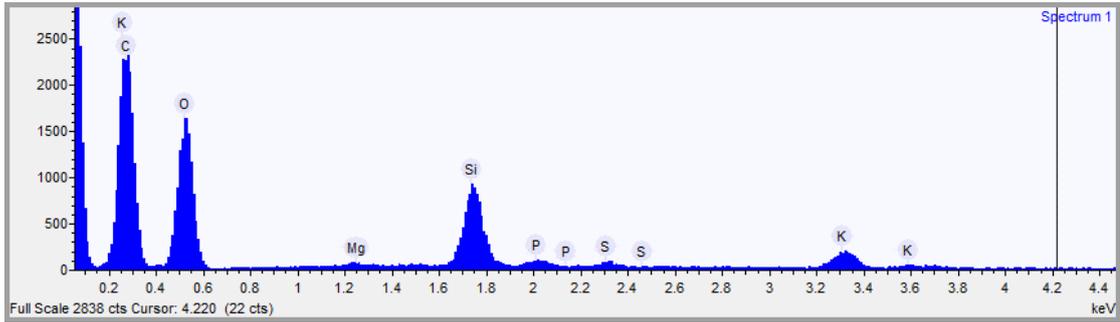
ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในใบข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



100µm Silicon Ka1

ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในใบข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

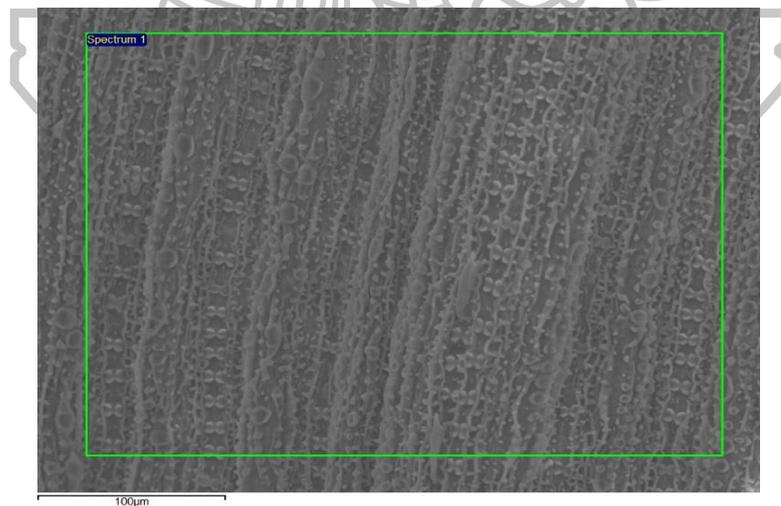
(จ) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในใบข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



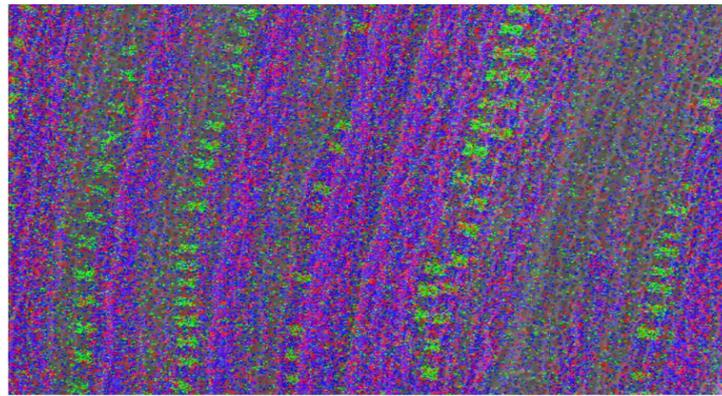
(ฉ) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในใบข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

ภาพที่ 4.2 ภาพถ่าย SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในใบข้าวกลุ่มควบคุม กลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ อายุการปลูก 16 วัน กำลังขยาย 500 เท่า

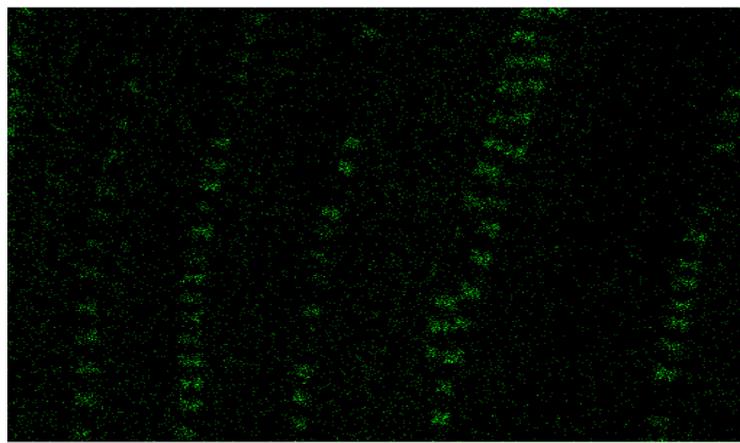
จากภาพที่ 4.2 พบว่าลักษณะซิลิกอนในกลุ่มควบคุม จะมีเม็ดขนาดใหญ่ และจัดเรียงเป็นระเบียบมากกว่ากลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ เนื้อเยื่อต่างๆ เป็นรูปแบบที่สวยงามแข็งแรงไม่ขาด และในภาพขยายที่เท่ากัน เมื่อสังเกตจะพบว่าปริมาณเม็ดซิลิกอนกลุ่มควบคุมจะมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ และลักษณะเต่งตึงกว่าอยู่ห่างกันมากกว่า ระยะห่างสม่ำเสมอ เนื้อเยื่อสมบูรณ์แข็งแรงไม่ขาดหลุด ขณะที่ซิลิกอนกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ ขนาดจะเล็กกว่า แพนฟอ อยู่ชิดกันมากกว่าระยะห่างไม่สม่ำเสมอ เนื้อเยื่อหลุดลุ่ย ไม่ต่อเนื่องกัน



โครงสร้างเนื้อเยื่อลำต้นข้าวกลุ่มควบคุม

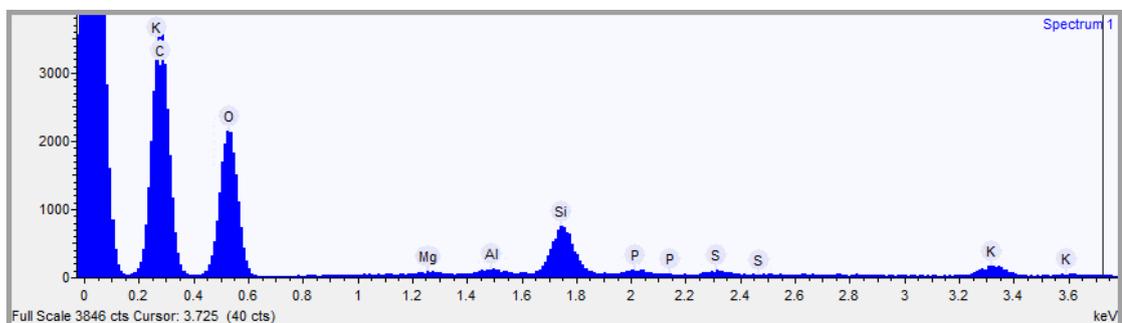


100µm Mixed
 วัสดุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในลำต้นข้าวกลุ่มควบคุม

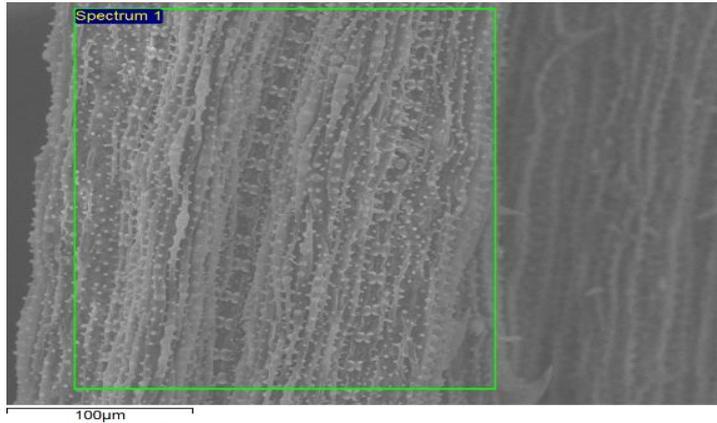


100µm Silicon Ka1
 ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในลำต้นข้าวกลุ่มควบคุม

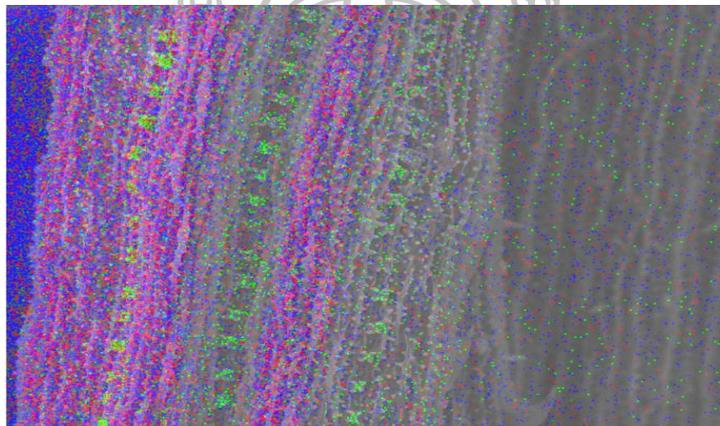
(ก) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในลำต้นข้าวกลุ่มควบคุม



(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในลำต้นข้าวกลุ่มควบคุม

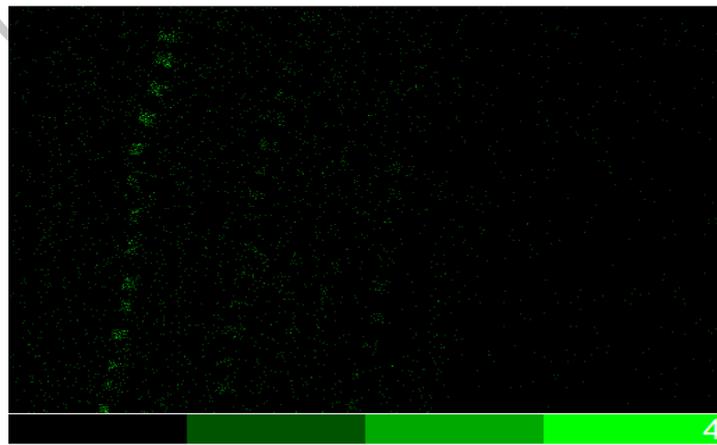


โครงสร้างเนื้อเยื่อลำต้นข้าวกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์



100μm Mixed

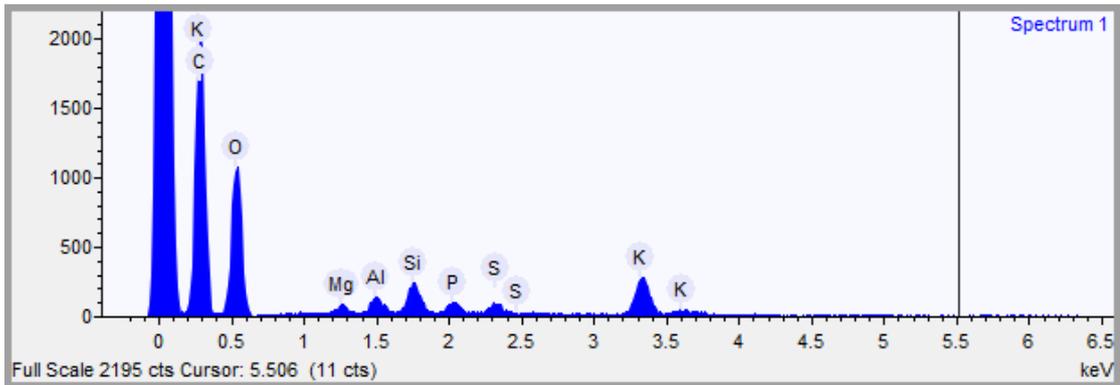
ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในลำต้นข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



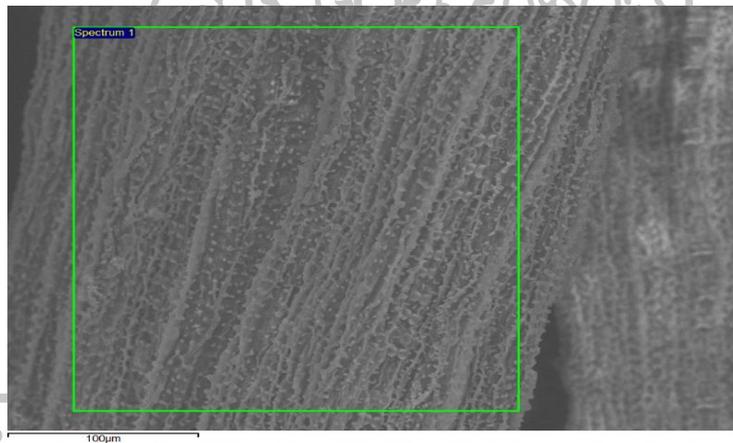
100μm Silicon Ka1

ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในลำต้นข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

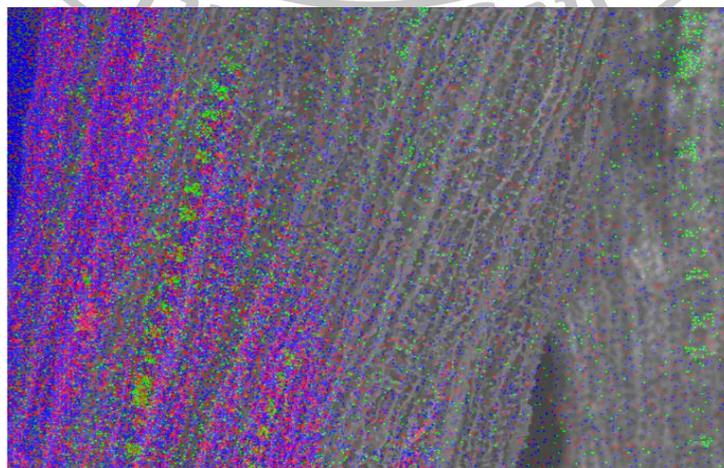
(ค) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในลำต้นข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



(ง) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในลำต้นข้าวกลุ่มแคตเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

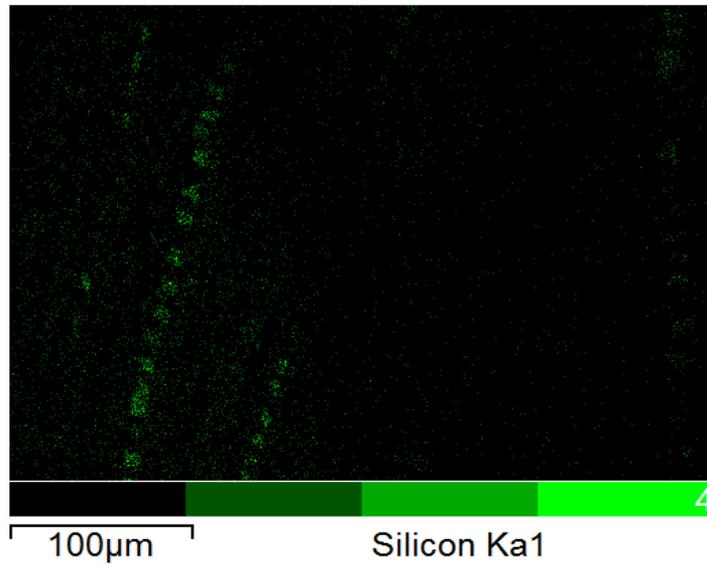


โครงสร้างเนื้อเยื่อลำต้นข้าวกลุ่มแคตเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



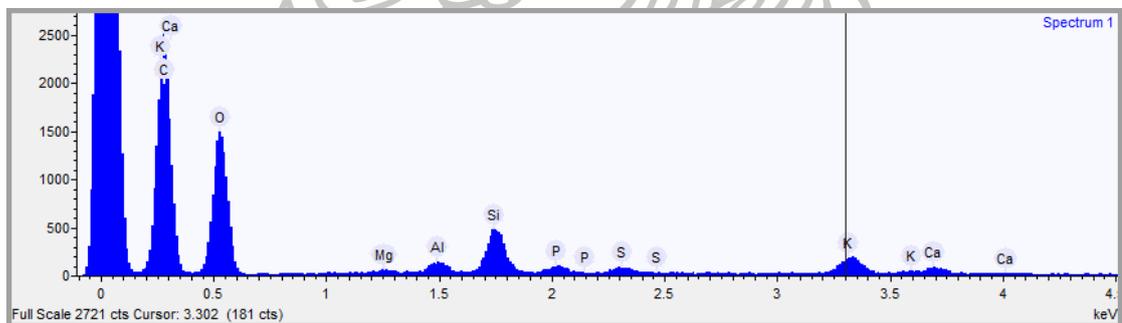
100µm Mixed

ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในลำต้นข้าวกลุ่มแคตเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในลำต้นข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

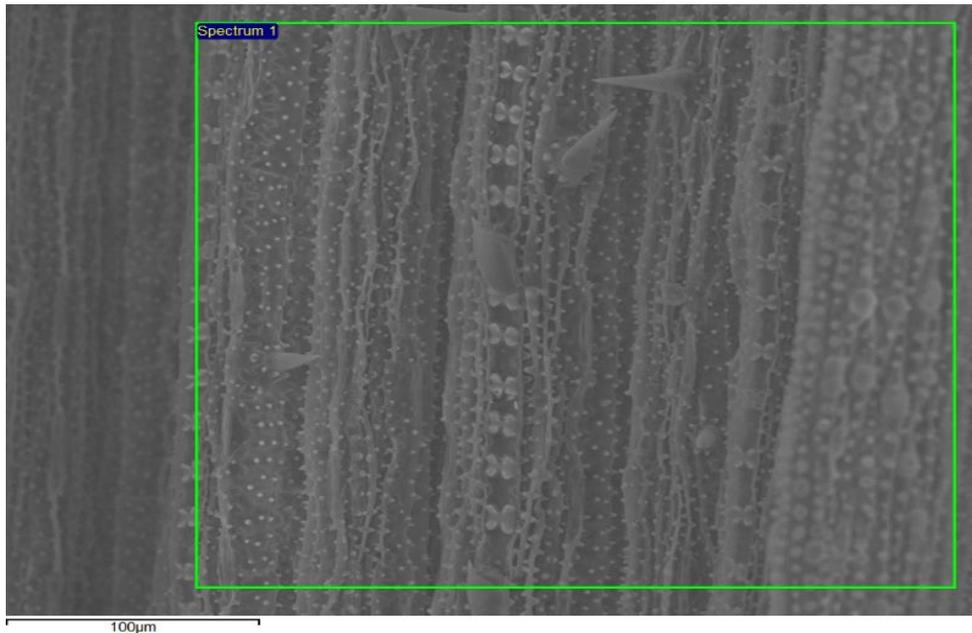
(จ) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในใบข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



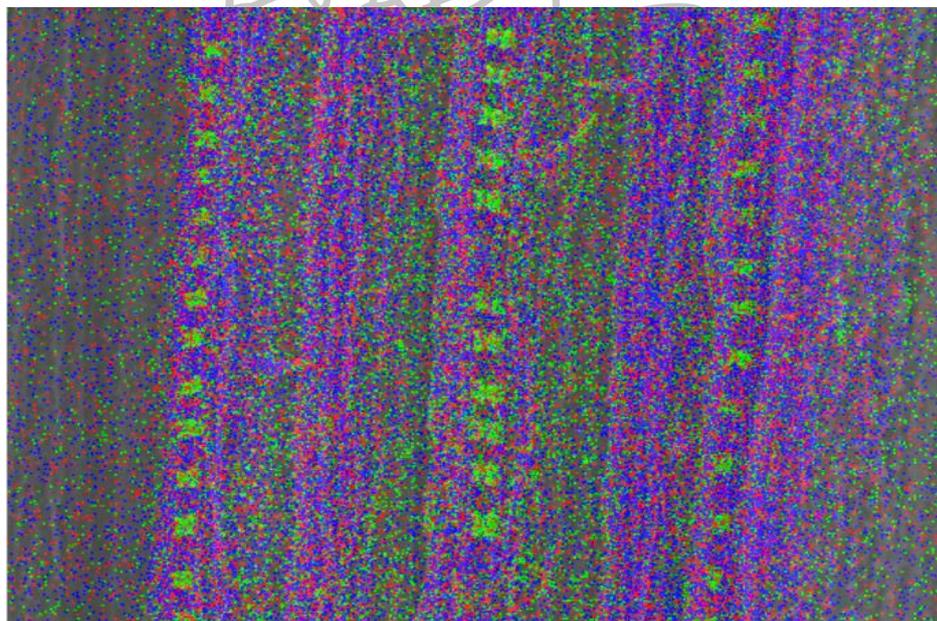
(ฉ) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในลำต้นข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

ภาพที่ 4.3 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในลำต้นข้าวกลุ่มควบคุม กลุ่มกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ อายุการปลูก 16 วัน กำลังขยาย 500 เท่า

จากภาพที่ 4.3 พบว่าลักษณะซิลิกอนในกลุ่มควบคุม จะมีเม็ดขนาดใหญ่ แฉกของซิลิกอนอยู่ใกล้กัน เนื้อเยื่อต่างๆ เป็นรูปแบบที่สวยงามแข็งแรงไม่ขาด และในภาพขยายที่เท่ากัน เมื่อสังเกตจะพบว่าปริมาณกลุ่ม Si ของข้าวกลุ่มควบคุม จะมีจำนวนแฉกมากกว่ากลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ ที่กำลังขยายเท่ากัน ระยะห่างสม่ำเสมอ ขณะที่กลุ่มที่ 3 แฉกของซิลิกอนอยู่ห่างกันมากกว่า

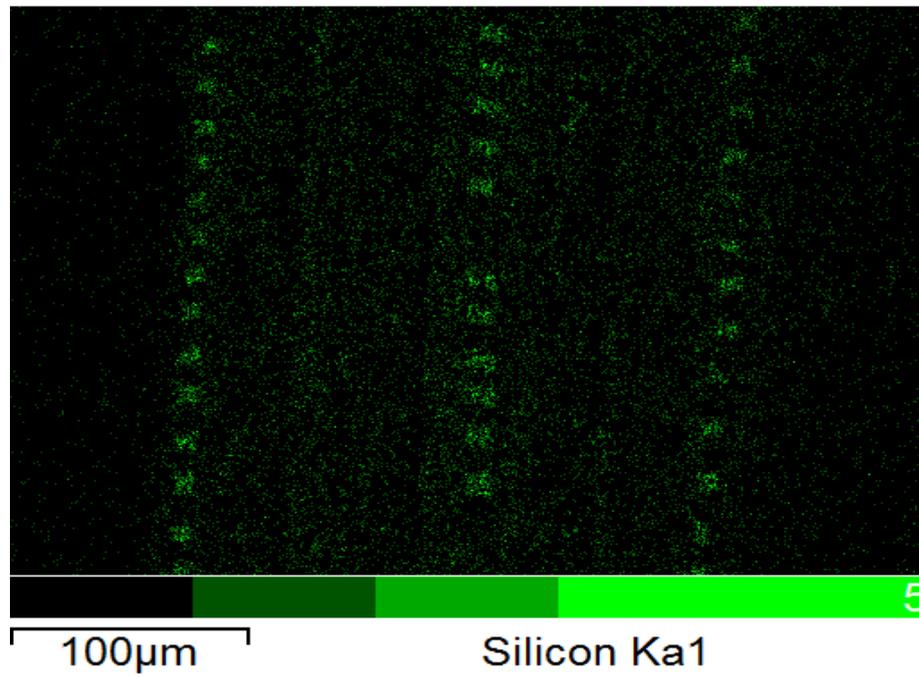


โครงสร้างเนื้อเยื่อรากข้าวกลุ่มควบคุม

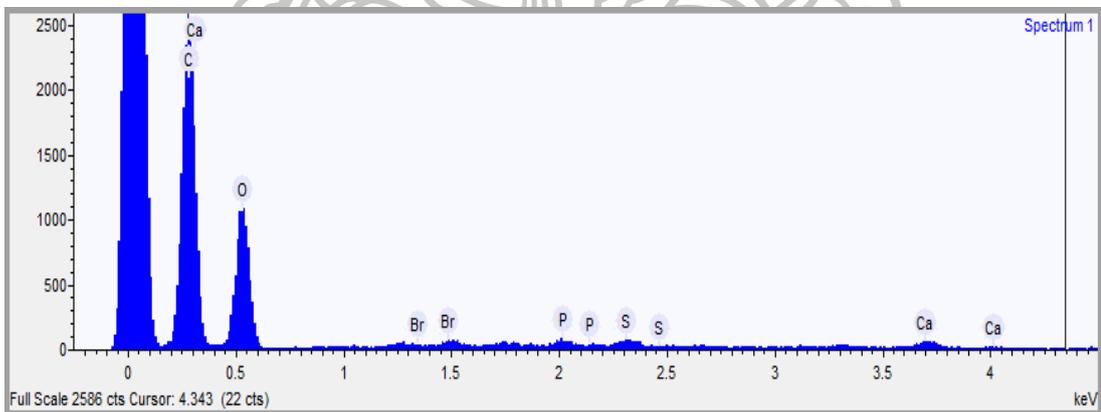


Mixed

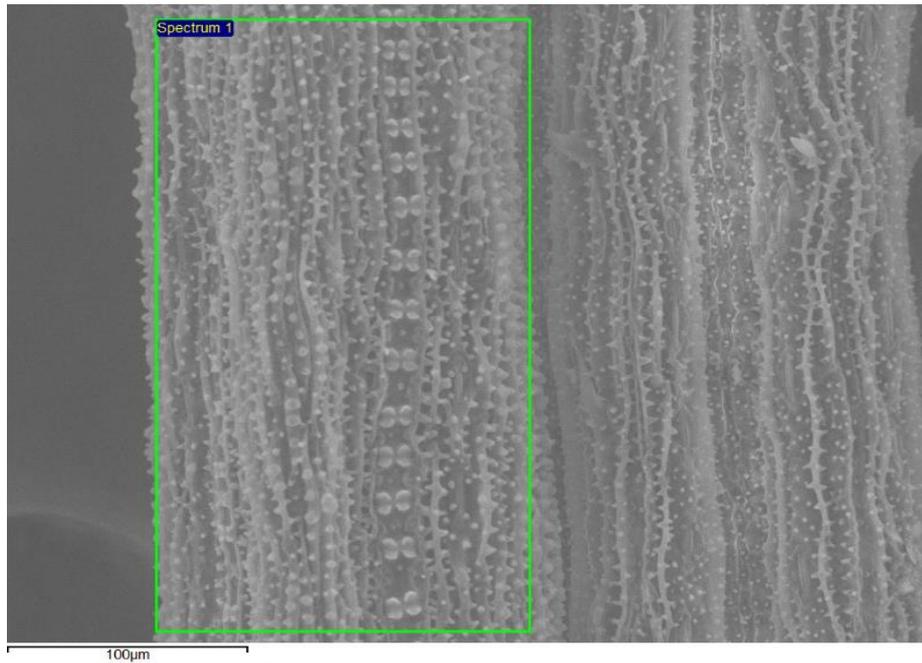
ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในรากข้าวกลุ่มควบคุม



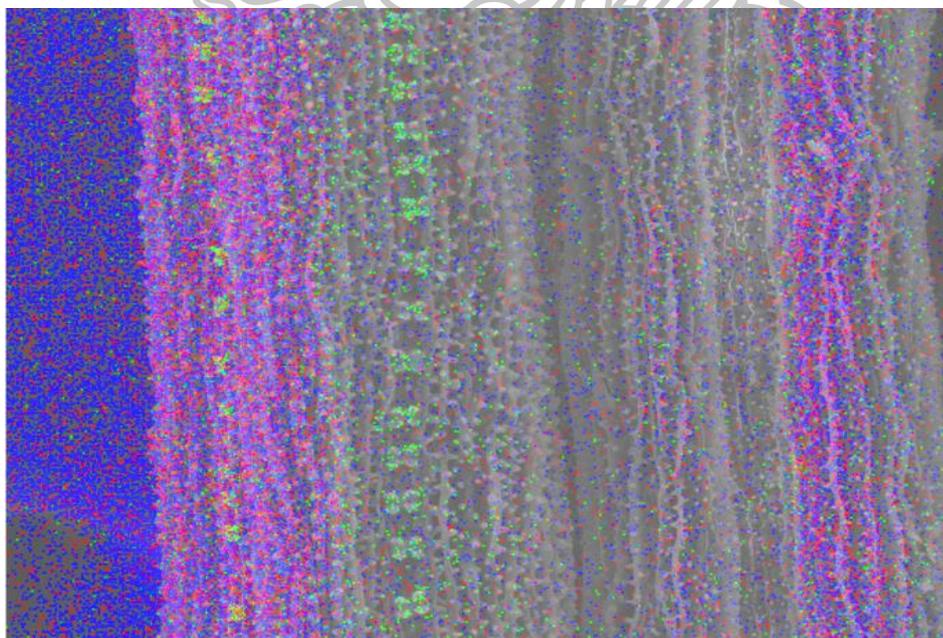
ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในรากข้าวกลุ่มควบคุม
 (ก) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในรากข้าวกลุ่มควบคุม



(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในรากข้าวกลุ่มควบคุม



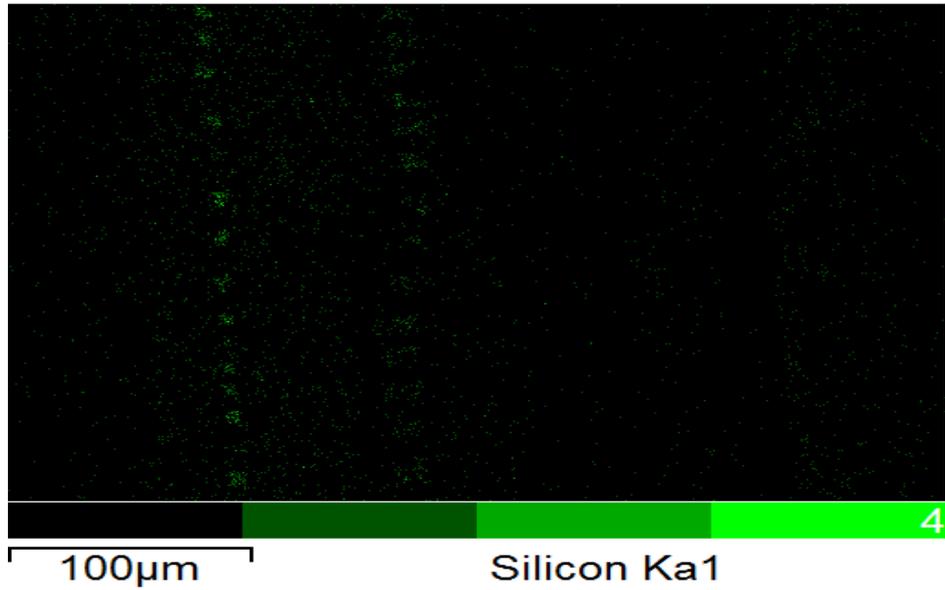
โครงสร้างเนื้อเยื่อลำต้นข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์



100μm

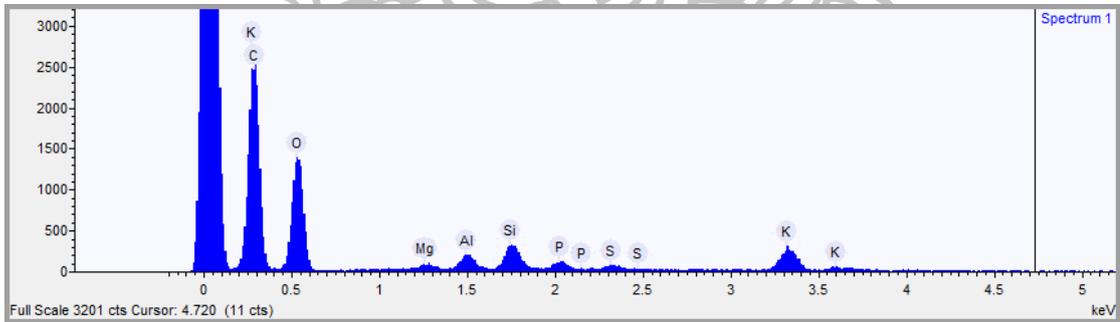
Mixed

ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในรากข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์

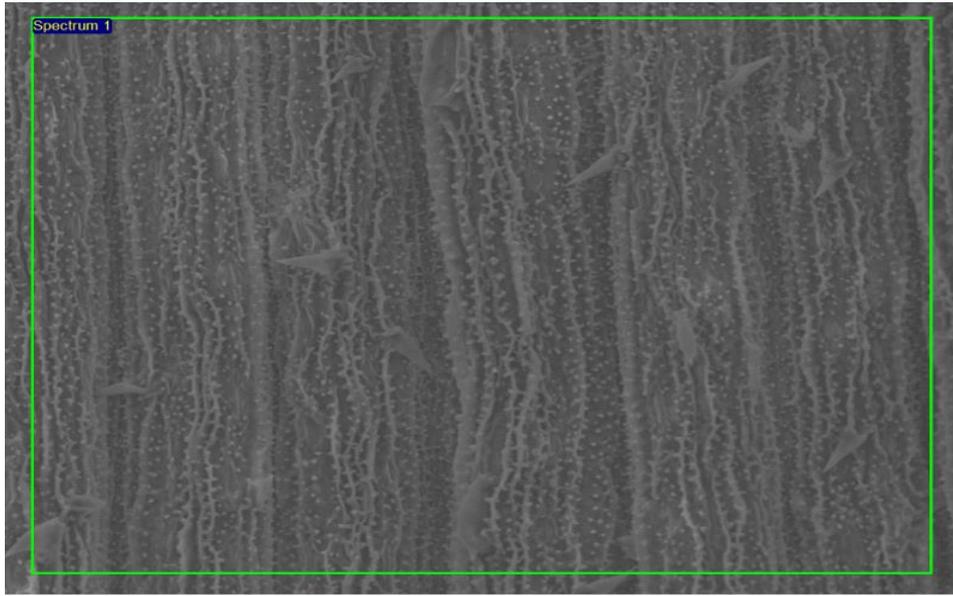


ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในรากข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์

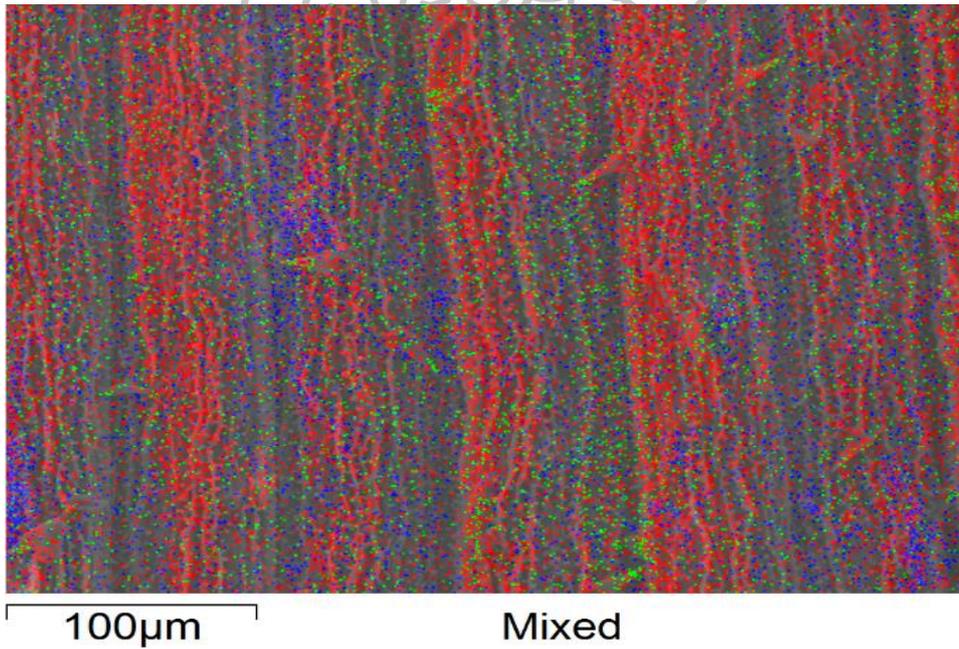
(ค) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในรากข้าวกลุ่มที่ 2



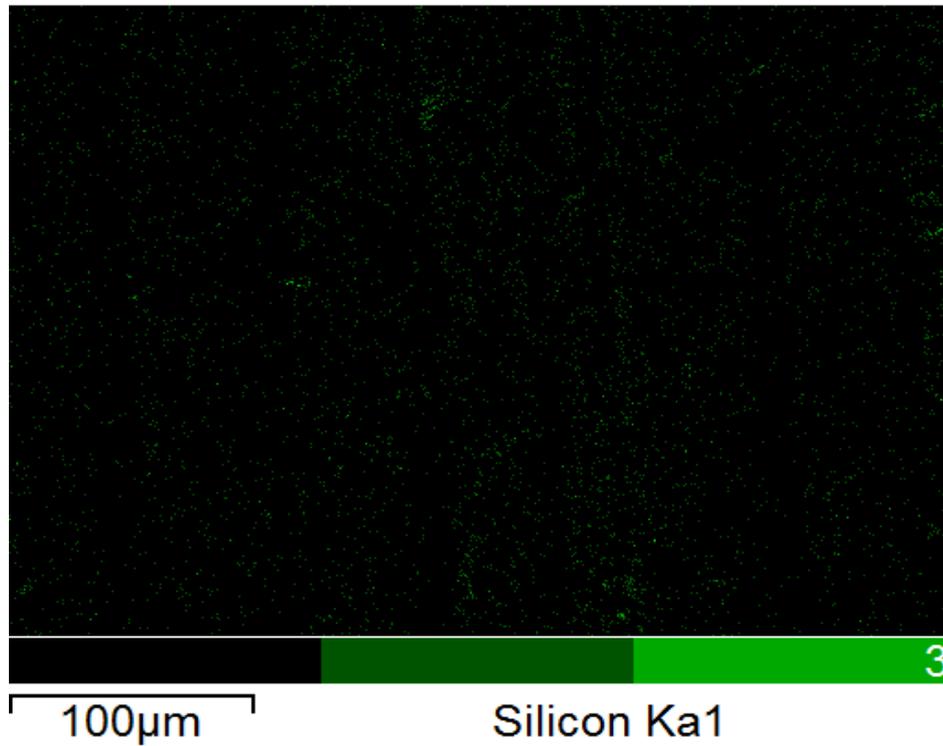
(ง) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในรากข้าวกลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์



โครงสร้างเนื้อเยื่อลำต้นข้าวกลุ่มแคตเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

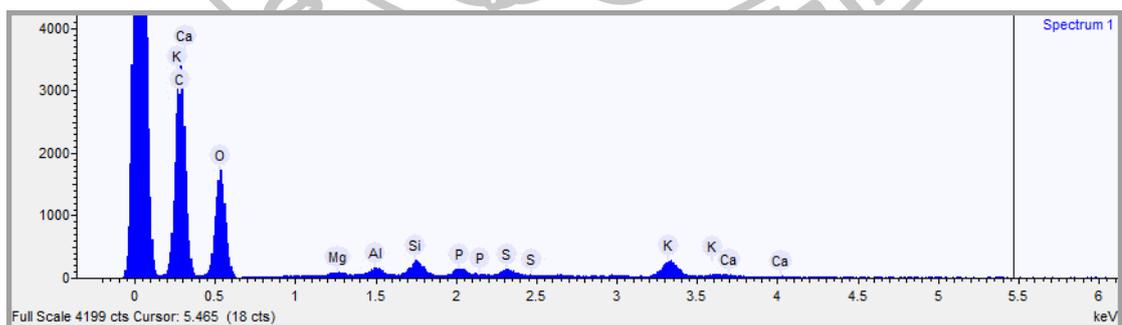


ธาตุต่างๆ ที่สะสมอยู่ในรากข้าวกลุ่มแคตเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



ตำแหน่งของธาตุซิลิกอน (silicon bodies) ในรากข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

(ง) ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า แสดงลักษณะของซิลิกอนในรากข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



(ฉ) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในรากข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

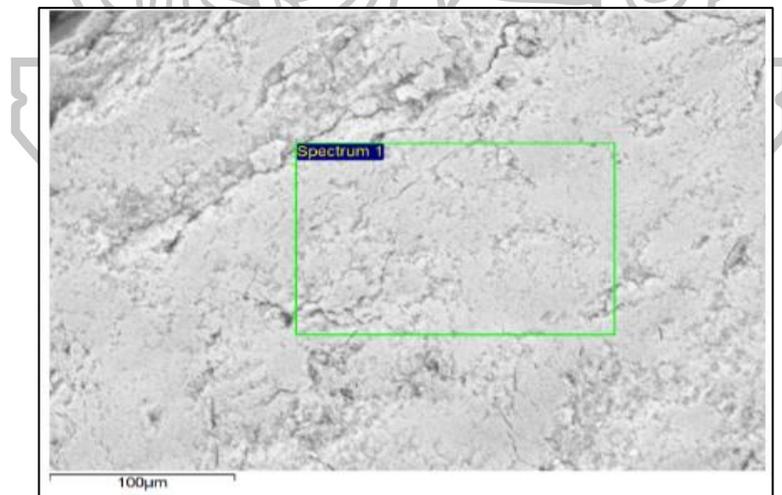
ภาพที่ 4.4 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มควบคุม กลุ่มกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ อายุการปลูก 16 วัน กำลังขยาย x500

จากภาพที่ 4.4 พบว่าซิลิกอนไม่อยู่เป็นแนวเดียวกันเหมือนที่พบในใบและลำต้น แต่จะกระจุกกระจายอยู่ทั่วไปทั้งราก ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกันทั้งกลุ่มควบคุม กลุ่มกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

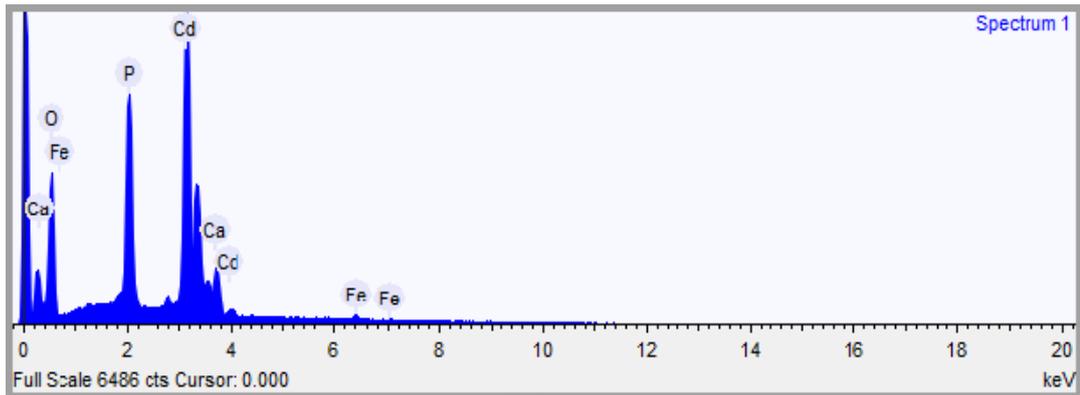
ซิลิกอนเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโลก อยู่ในรูปของ monosilicic acid ($\text{Si}(\text{OH})_4$) ที่ละลายน้ำได้ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช Si ถูกดูดซึมเข้าสู่ต้นพืชโดยกระบวนการดูดซึมแบบ active หรือ passive แล้วเกิดการทับถมบริเวณผนังเซลล์ของใบและลำต้นของพืชหรือบริเวณรอบๆ เอนโดเดอริส (Silva Lobato et al., 2013) ทำให้มองเห็นเป็นเส้นๆ จัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ Si เป็นธาตุที่ทำให้ต้นพืชแข็งแรง มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าปกติ เสริมประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง ทำให้พืชสามารถดูดซึมแร่ธาตุต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น และลดการดูดซึมโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ (Adrees et al., 2015) เมื่อมีโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ Si จะลดความเป็นพิษของแคดเมียมโดยการเพิ่มค่า pH ในกระบวนการ detoxification (Sahebi et al., 2015) ดังนั้นการที่พบว่าซิลิกอนในลำต้นและใบของกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ลดลง อาจจะเป็นผลเนื่องจากซิลิกอนส่วนหนึ่งไปเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เพื่อขัดขวางการดูดซึมโลหะหนัก จึงทำให้ลักษณะอนุภาคของ Si เปลี่ยนแปลงไป

4.4 การศึกษาลักษณะการยืดยาวของแคดเมียมโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

การศึกษาลักษณะการยืดยาวของแคดเมียม ในบริเวณรากของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่ม การทดลอง จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

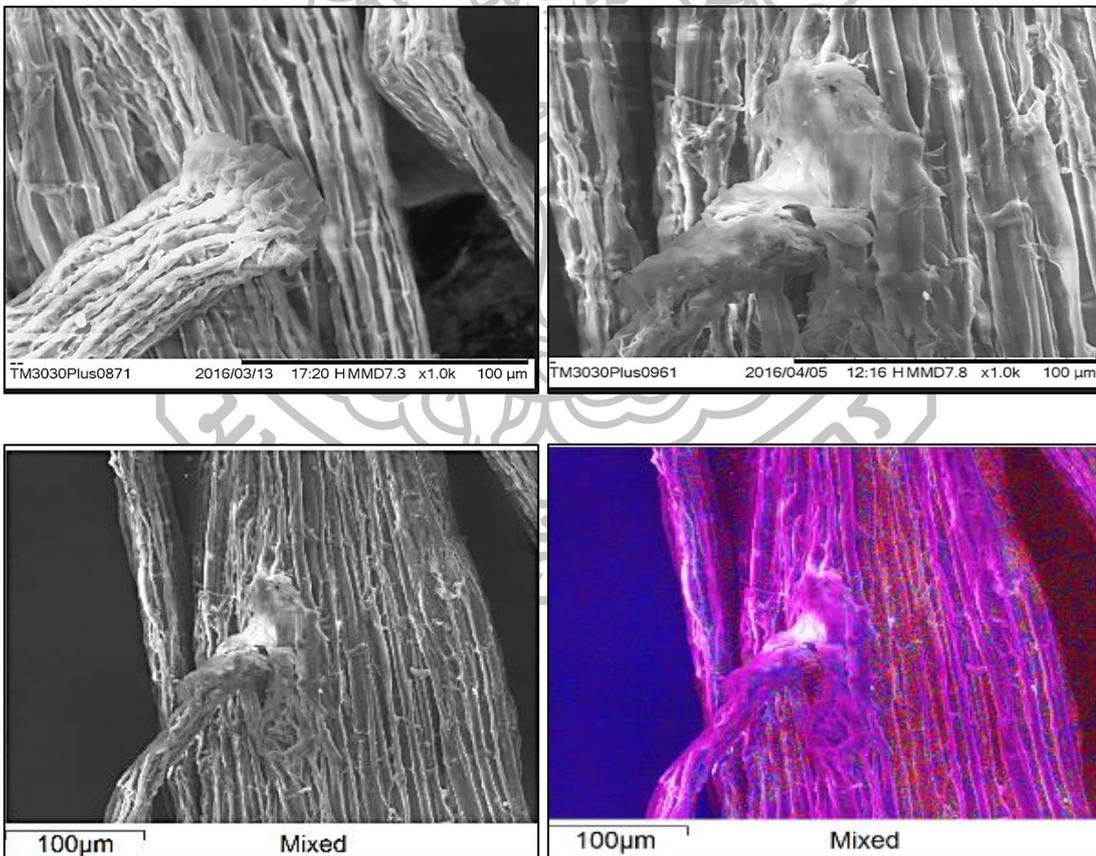


(ก) ตะกอนที่เกิดจากการผสมแคดเมียมกับสารละลาย Hydroponics

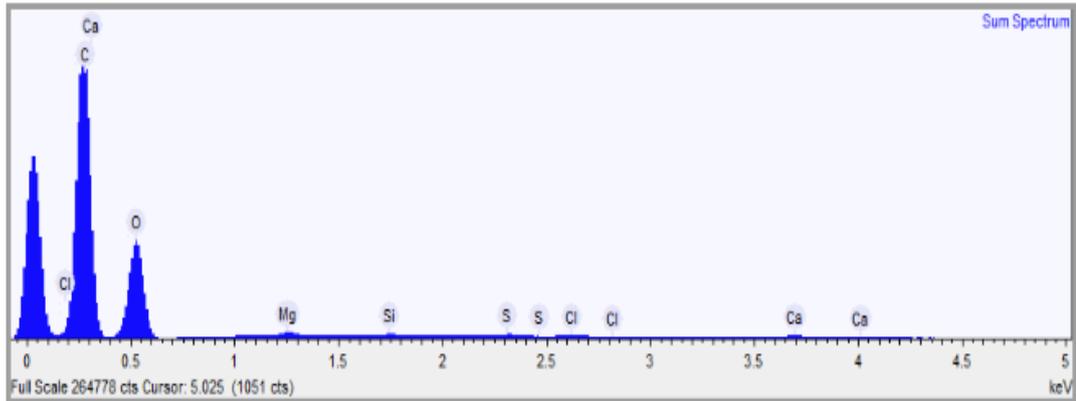


(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ของตะกอนที่เกิดจากการผสมแคดเมียมกับสารละลาย Hydroponics แคดเมียม

ภาพที่ 4.5 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของตะกอนที่เกิดจากการผสมแคดเมียมกับสารละลาย Hydroponics

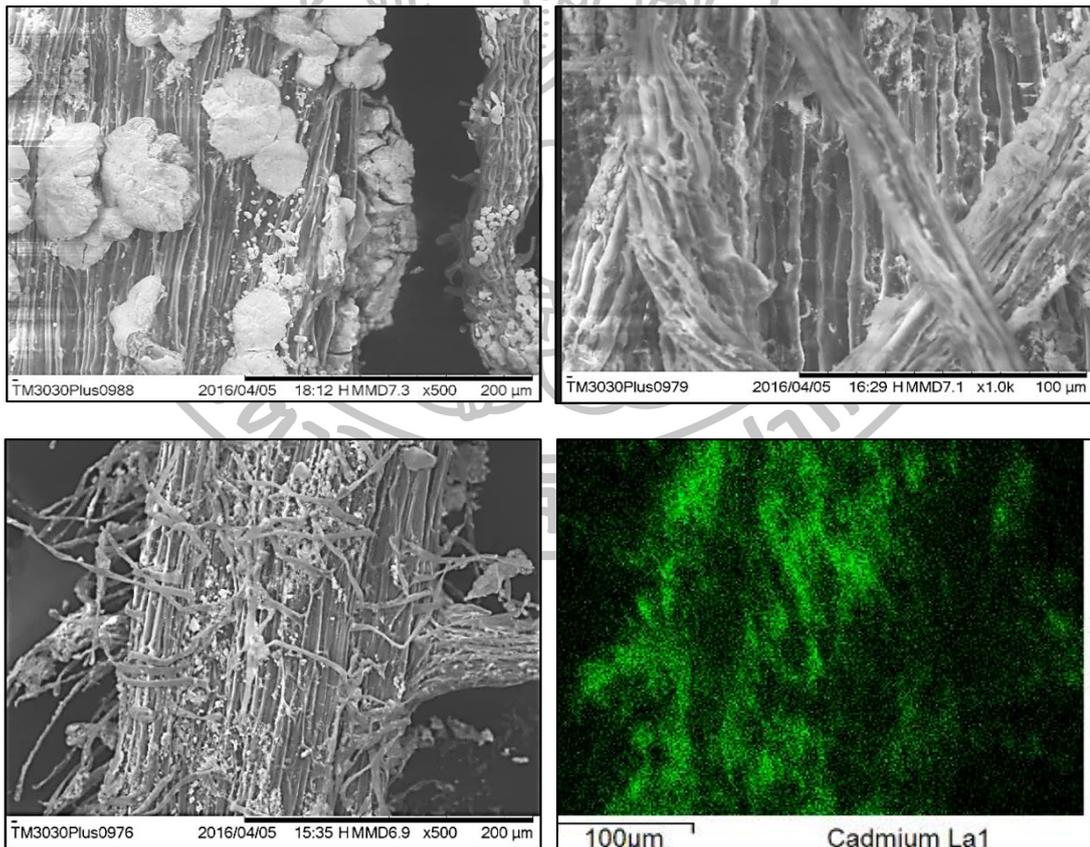


(ก) ลักษณะผิวภายนอกของรากข้าวกลุ่มควบคุม

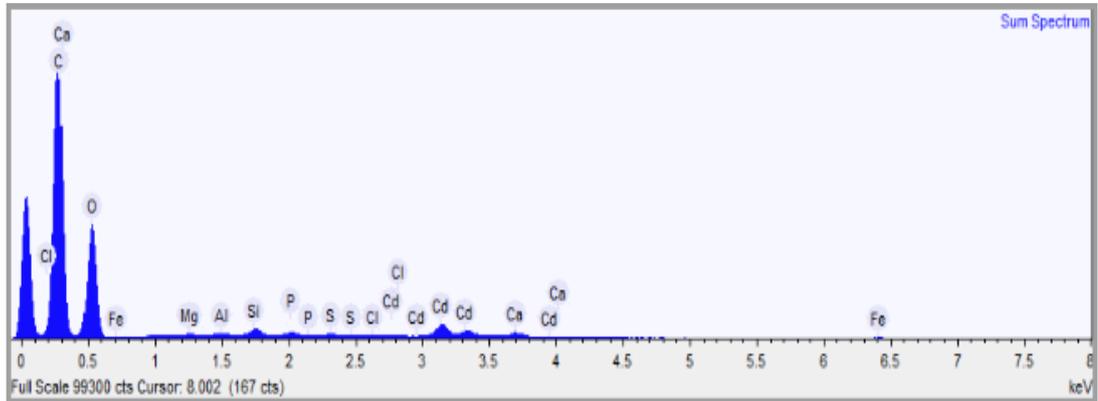


(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ผิวภายนอกของรากข้าวกลุ่มควบคุม

ภาพที่ 4.6 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มควบคุม หลังปลูกในสารละลาย Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน

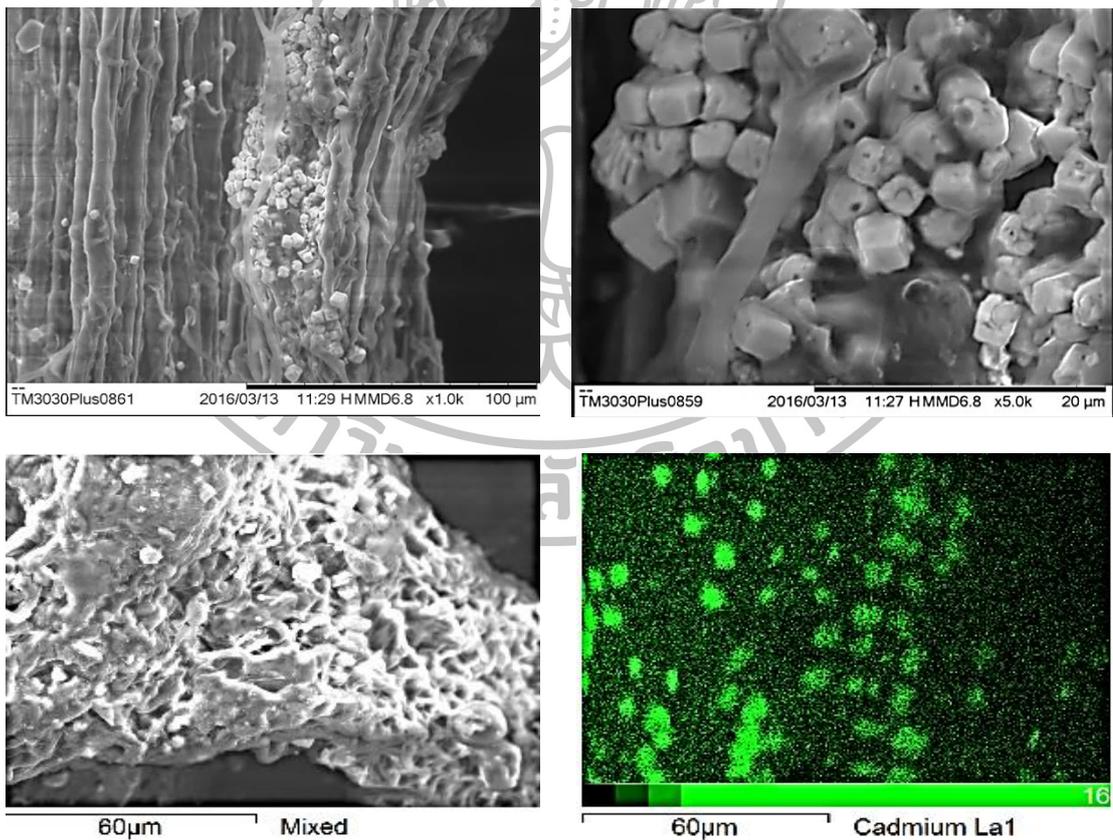


(ก) ลักษณะผิวภายนอกของรากข้าวกลุ่มควบคุม กลุ่มกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์

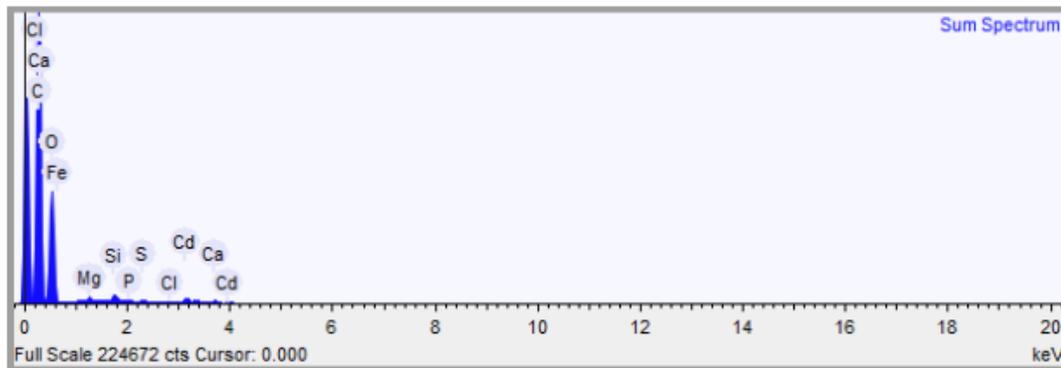


(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ผิวภายนอกของรากข้าวกลุ่มควบคุม

ภาพที่ 4.7 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มควบคุม กลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน



(ก) ลักษณะผิวภายนอกของรากข้าวกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์



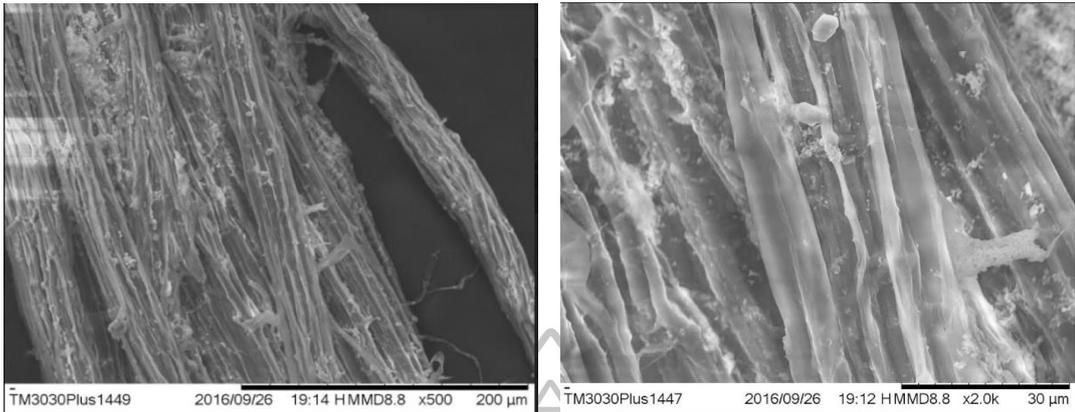
(ข) ลักษณะของรากภายใต้ Scanning electron microscope ของรากแห้งที่แช่ในสารละลายผสม แคลเดียมกับสารละลาย Hydroponics

ภาพที่ 4.8 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลุ่มที่ 3 หลังปลูกใน สารละลาย Hydroponics เป็นระยะเวลา 16 วัน

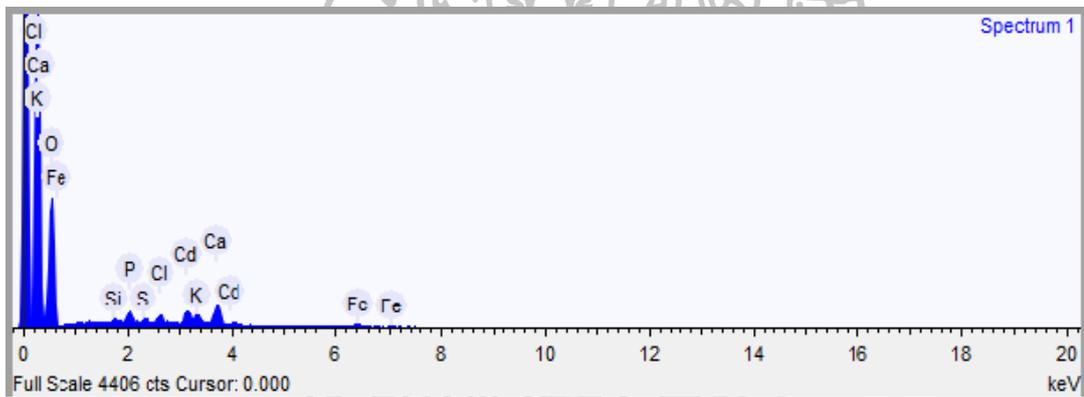
จากการศึกษาลักษณะการยึดเกาะของแคลเดียม ในบริเวณรากของข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่ม การทดลอง โดยใช้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ในภาพที่ 4.5พบว่า ลักษณะอนุภาคที่เกิดจากสารละลายแคลเดียมกับสารละลาย hydroponics จะให้ลักษณะที่เป็นผลึก สีขาวละเอียด ไม่เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน และเมื่อพิจารณาลักษณะอนุภาคที่ยึดเกาะบนรากข้าวในแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อแยกพิจารณาเป็นกลุ่ม พบว่าภาพที่ 4.6 ที่แสดงลักษณะการยึดเกาะในกลุ่มควบคุม ไม่มีอนุภาคใดๆ มายึดเกาะบนราก แสดงว่าตะกอนของ สารละลาย hydroponics ไม่มีผลทำให้ตะกอนยึดเกาะบนรากข้าว ภาพที่ 4.7 ที่แสดงลักษณะการยึด เกาะในกลุ่มที่ 2 จะพบว่ามีกลุ่มตะกอนสีขาวมาเกาะบริเวณรากเป็นกลุ่มก้อนแสดงว่าที่ความเข้มข้น ของแคลเดียมต่ำๆ มีผลทำให้เกิดตะกอนบริเวณราก และภาพที่ 4.8 ที่แสดงลักษณะการยึดเกาะใน กลุ่มแคลเดียม 2500 ไมโครโมลาร์

พบว่าตะกอนมีลักษณะเป็นอนุภาคทรงสี่เหลี่ยม (Cubic) ขนาดกึ่งสม่าเสมอ มายึดเกาะ บริเวณผิวรากข้าวเป็นจำนวนมากซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 2 อย่างเห็นได้ชัดเจน

จากภาพถ่ายของ SEM จึงมีการสันนิษฐานเบื้องต้น แบ่งออกเป็น 2 กรณี กรณีแรก คือ ตะกอนที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลของแคลเดียมที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ สารละลาย Hydroponics และกรณีที่ 2 คือ เป็นกระบวนการเก็บสะสม (accumulation) และ ปลดปล่อยโลหะหนักของพืช (phytoremediation) ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ สมมติฐานนี้ จึงได้มีการ ใช้รากแห้ง และเส้นด้ายโดยนำมาแช่ในสารละลาย hydroponics ที่ผสม Cd ความเข้มข้น 2500 μM เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยตั้งสมมติฐานว่าถ้าหากว่าเป็นเป็นผลของแคลเดียมที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารละลาย hydroponics ลักษณะผลึกที่ได้น่าจะมีลักษณะเหมือน ภาพที่ 4.5 แต่ถ้าผลึกที่ยึดเกาะบริเวณรากนั้นเป็นผลของการขับสารพิษของพืชหรือที่เรียกว่า กระบวนการ rhizofiltration ก็จ้อยู่ในรูปแบบอื่น ซึ่งผลการทดลองได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.9 และ 4.10

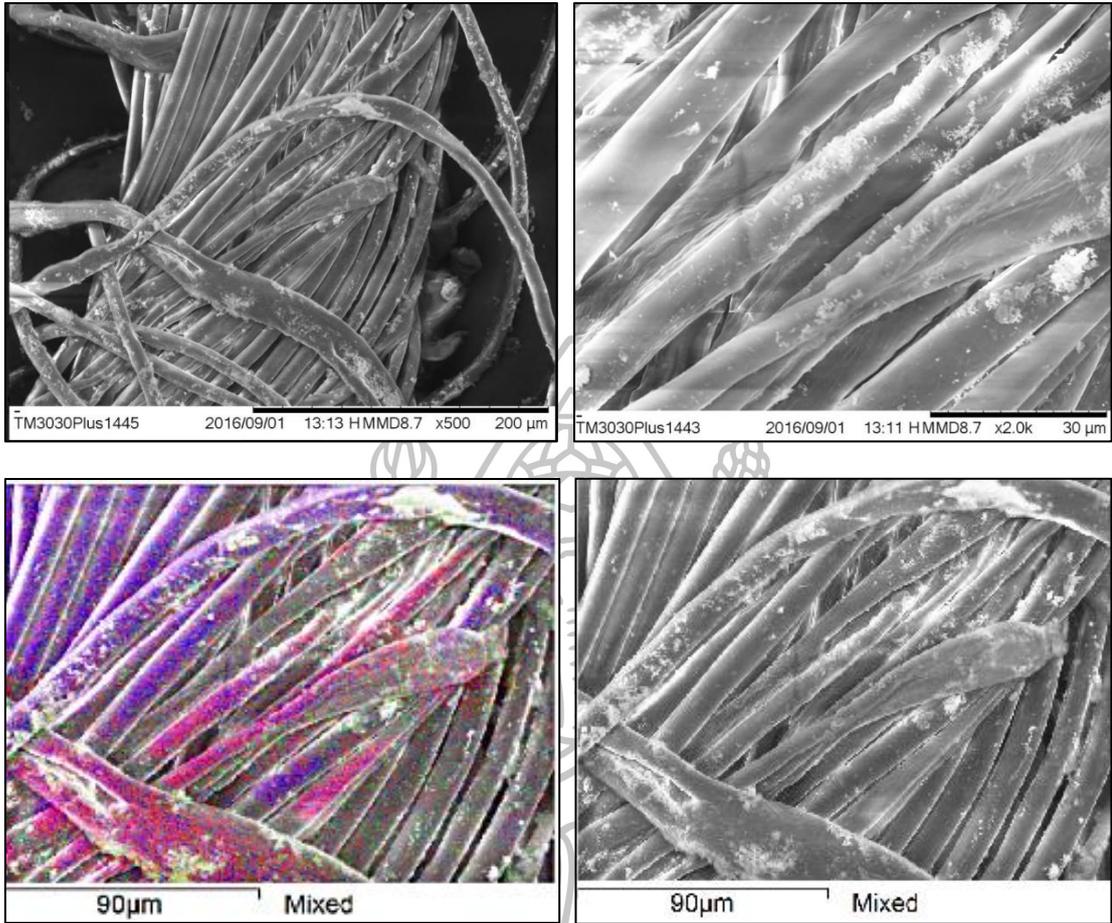


(ก) ลักษณะผิวภายนอกของรากข้าวแห้ง ที่แช่ในสารละลาย hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM

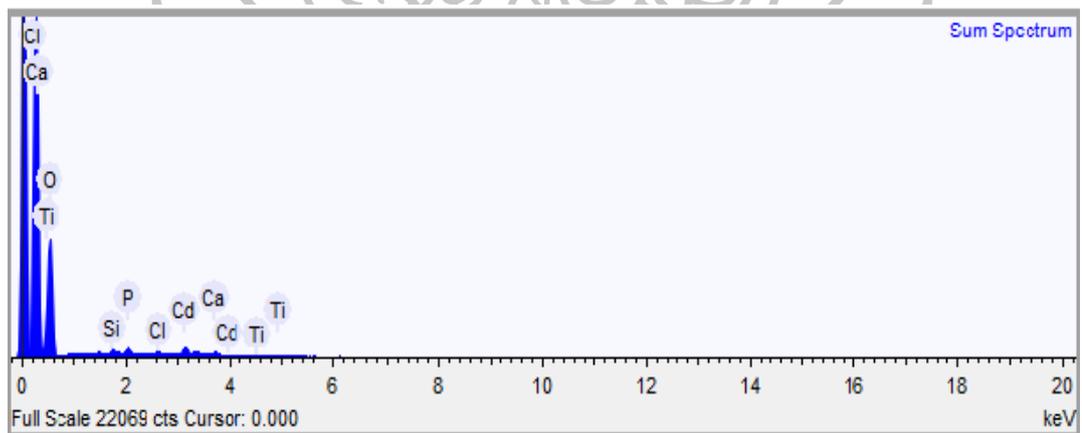


(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในรากข้าวแห้ง ที่แช่ในสารละลาย hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM

ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวแห้ง ที่แช่ในสารละลาย hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM เป็นระยะเวลา 16 วัน



(ก) ลักษณะผิวภายนอกของเส้นด้าย ที่แชในสารละลาย hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM



(ข) สเปกตรัมแสดงปริมาณของธาตุชนิดต่างๆ ที่พบในเส้นด้ายที่แชในสารละลาย hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM

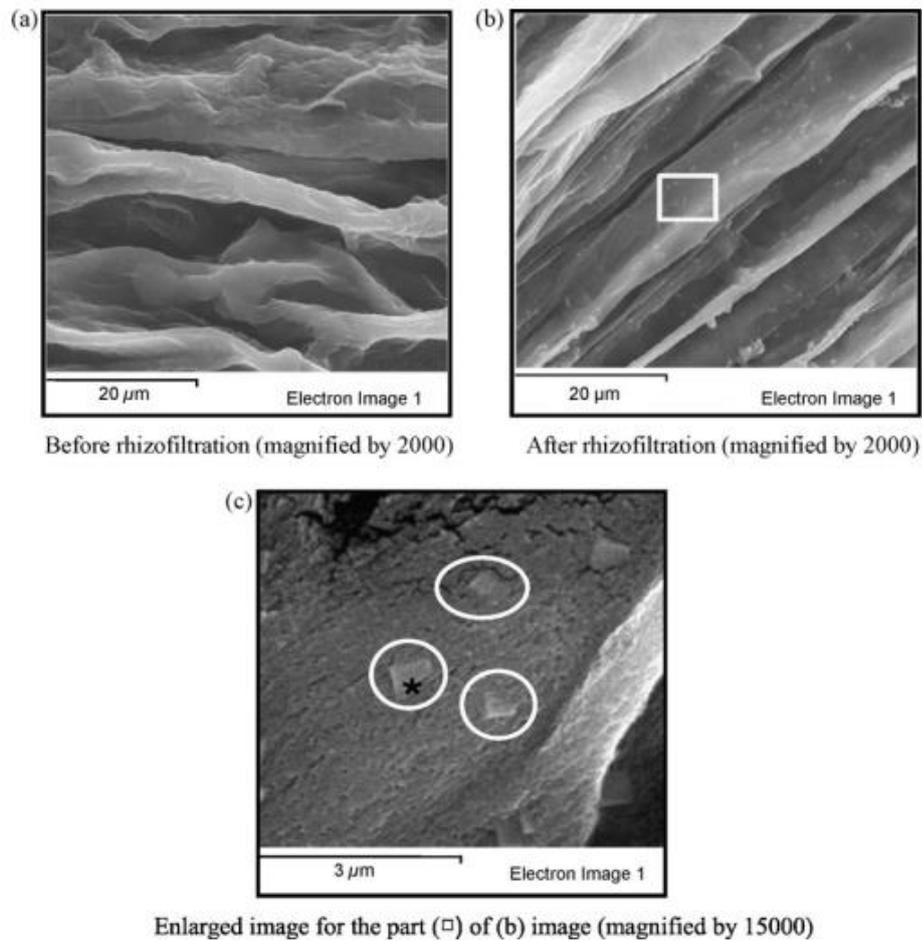
ภาพที่ 4.10 ภาพถ่ายจาก SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของรากข้าวแห้ง ที่แชในสารละลาย hydroponics ที่มีแคดเมียม 2500 μM เป็นระยะเวลา 16 วัน

จากผลการทดลองเพื่อทดสอบสมมติฐานดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าอนุภาคที่มาเกาะบนรากแห้งและบนเส้นด้ายนั้นมีลักษณะแตกต่างจากข้าวกลุ่มแคดเมียม 250 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มแคดเมียม 2500 ไมโครโมลาร์ โดยสิ้นเชิง ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตะกอนละเอียดมาเกาะบริเวณรากแห้งและเส้นด้ายแทน จากผลการทดลอง อาจสรุปได้คร่าวๆ ว่า ลักษณะอนุภาครูปลิ่มเหลี่ยมที่ยึดเกาะอยู่บริเวณรากนั้นน่าจะมีกระบวนการบางอย่างของพืชร่วมด้วย ที่ผ่านมามีการศึกษาถึงกระบวนการฟื้นฟูสภาพสิ่งแวดล้อมด้วยพืช หรือ phytoremediation คือการใช้กระบวนการทำงานของพืชเพื่อเคลื่อนย้าย เก็บ หรือทำให้สารมลพิษในสิ่งแวดล้อมเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นน้อยลง ซึ่งกลไกที่น่าสนใจ คือ rhizofiltration หรือการดูดซับทางชีวภาพ (biosorption) ซึ่งพบมากในพืชน้ำทั่วไป พืชที่เจริญเติบโตในที่น้ำขัง (Horne, 2000; Lytle et al., 1998) และพืชที่ปลูกในระบบ hydroponics (Raskin et al., 1997) โดยเป็นกระบวนการที่พืชดูดซับหรือทำให้สารพวกกลุ่มโลหะหนัก สารเคมีอินทรีย์มีความเข้มข้นสูงๆในเซลล์แล้วทำให้สารพิษเหล่านี้ไหลออกมา (Schmoger et al., 2000) ในลักษณะต่างๆ รวมถึงอาจจะตกตะกอนสารมลพิษเหล่านี้ด้วยราก

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยการปลูกข้าวไรซ์เบอร์รี่ในระบบ Hydroponics ซึ่งเปรียบเสมือนข้าวเป็นพืชน้ำ เพราะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่รากลอยอยู่ในน้ำ ดังนั้น ข้าวจึงมีโอกาสเกิดกระบวนการ rhizofiltration เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโลหะหนักได้ (Hooda, 2007) โดยจากผลการทดลองในข้าวกลุ่มที่ 1 แสดงในภาพที่ 4.6 และรากแห้งแสดงในภาพที่ 4.9 และในเส้นด้ายแสดงในภาพที่ 4.10 ไม่มีลักษณะกลุ่มตะกอนมาเกาะซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 อย่างเห็นได้ชัดเจน อธิบายได้เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Fahr ที่ศึกษาผลของ Lead ต่อการเจริญเติบโตของราก (Fahr et al., 2013) ซึ่งพบว่ารากมีกระบวนการ rhizofiltration เพื่อขับ lead ออกจากเซลล์

การฟื้นฟูสภาพสิ่งแวดล้อมด้วยพืช (Phytoremediation) คือการใช้กระบวนการทำงานของพืชเพื่อเคลื่อนย้าย เก็บ หรือทำให้สารมลพิษในสิ่งแวดล้อมเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นน้อยลง กลไกของการฟื้นฟูที่เกิดขึ้นกับข้าวไรซ์เบอร์รี่อาจจะเป็นกระบวนการกรองด้วยรากพืช หรือที่เรียกว่า (rhizofiltration) หรือการดูดซับทางชีวภาพ (Biosorption) โดยพืชจะดูดซับหรือตกตะกอนสารมลพิษหรือโลหะหนักต่างๆด้วยราก หรือดูดซับไว้ในเซลล์ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yadav ที่ได้ศึกษาค่า biomass ของพืชและปริมาณโลหะหนักในน้ำเสียตัวอย่างด้วยกระบวนการ rhizofiltration ของ Lead ในน้ำเสียโดยทดลองในพืช *Carex pendula* พบว่า ค่า biomass หรือมวลของพืชเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อตรวจวัดปริมาณ Lead ในน้ำเสียหลังปลูกพืชพบว่ามีปริมาณลดลง (Yadav et al., 2011) หรืองานวิจัยของ Duresova ที่ศึกษาใน *Arundo donax* ในการกำจัด cadmium และ zinc ในน้ำทิ้ง โดยการ spiked ^{109}Cd and ^{65}Zn ลงไปในการละลายที่ใช้ปลูกพืชพบว่าน้ำหนักแห้งของ *Arundo donax* เพิ่มขึ้น และปริมาณ ^{109}Cd and ^{65}Zn ในสารละลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเขาได้สรุปว่าเป็นกระบวนการ rhizofiltration ของพืช (Duresova et al., 2014) และงานวิจัยของ Minhee Lee และ Minjune Yang ที่ได้ศึกษากระบวนการ Rhizofiltration ของต้นทานตะวันและถั่วในน้ำที่ปนเปื้อนโลหะยูเรเนียมโดยใช้เทคนิค SEM และ EDS พบว่า uranium มีการสะสมในรากมากกว่าลำต้นถึง 90% และมีค่า uranium removal

capability ที่เกิดผ่านกระบวนการ rhizofiltration ประมาณ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ของน้ำหนักรากพืช ขณะที่ส่วนรากมีมากกว่า 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ภาพจาก SEM แสดงผิวหน้าของรากที่ถูกปกคลุมด้วยกลุ่มของ uranium crystal ดังแสดงในภาพที่ 4.11 โดย uranium มีประมาณ 0.5% ของน้ำหนักทั้งหมด ดังนั้นเขาได้สรุปว่าการดูดซับหรือการตกตะกอนบนผิวรากนี้ อาจจะเป็นกลไกหลักในการจับ uranium ด้วยกระบวนการ rhizofiltration ของพืช (Minhee Lee and Minjune Yang., 2010)



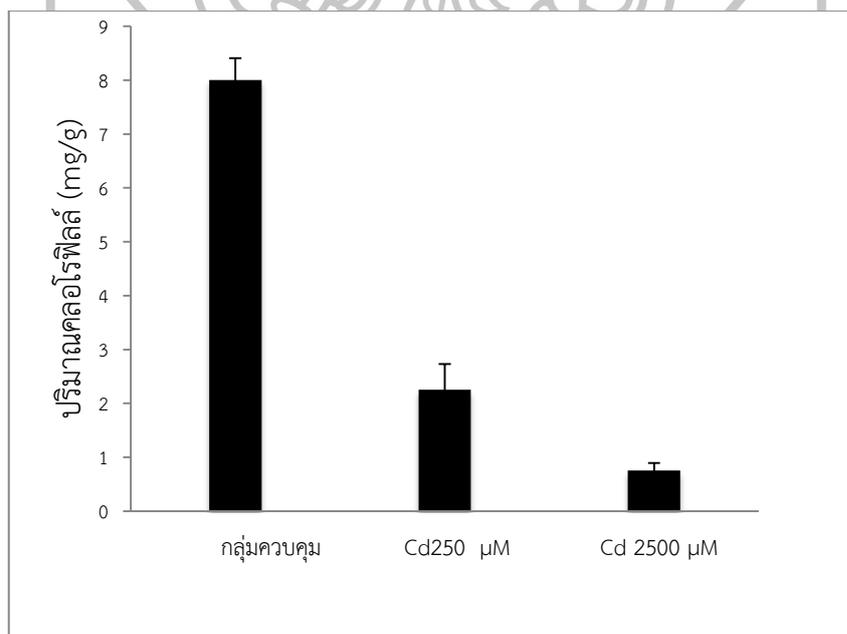
ภาพที่ 4.11 ภาพจาก SEM แสดงภาพก่อนและหลังเกิดกระบวนการ Rhizofiltration ของต้นทานตะวัน และวงกลมสีขาวคือตำแหน่งตะกอนที่วิเคราะห์ด้วย EDS

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณรังควัตถุคลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ โดยใช้เทคนิค UV-vis spectrophotometry

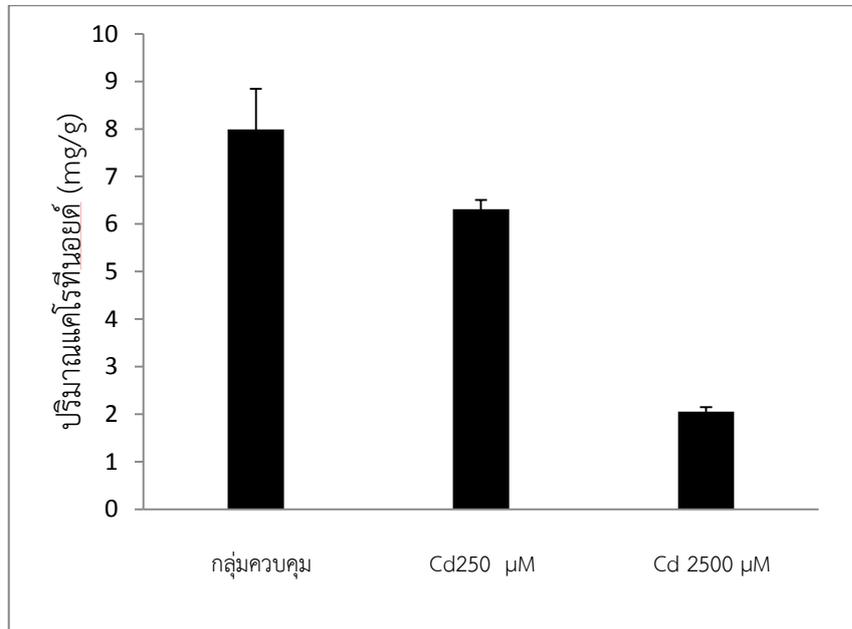


รูปที่ 4.12 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง อายุ 16 วัน ซ้ายมือคือกลุ่มที่ 1 ถัดมาคือกลุ่มที่ 2 และขวามือ คือกลุ่มที่ 3

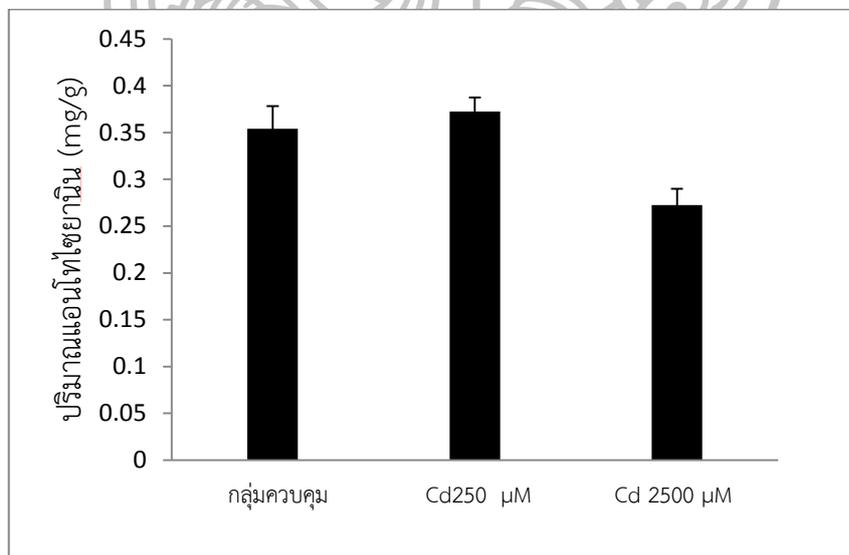
ข้าวที่ปลูกทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 4.12 โดยแสดงลักษณะทางกายภาพให้เห็นแตกต่างกันอย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเป็นความสูงของลำต้น หรือสีของใบ การสังเกตเห็นสีของใบที่แตกต่างกันทำให้สันนิษฐานเบื้องต้นได้ว่าโลหะแคดเมียม อาจมีผลทำให้ปริมาณรงควัตถุในใบข้าวมีความแตกต่างกัน ดังนั้น จึงได้ศึกษาระดับรงควัตถุ 3 ประเภท ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และ แคโรทีนอยด์ ซึ่งให้ผลการทดลอง ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.13 ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในข้าวไรซ์เบอร์รี่



ภาพที่ 4.14 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในข้าวไรซ์เบอร์รี่

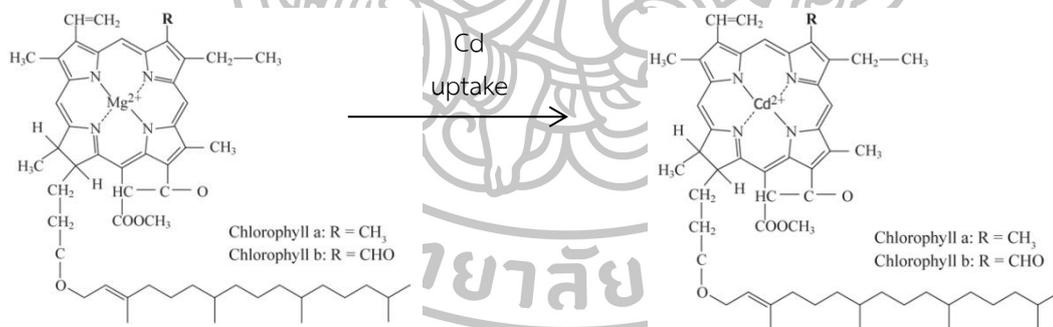


ภาพที่ 4.15 ปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวไรซ์เบอร์รี่

จากการศึกษาผลของ Cd ต่อปริมาณรงควัตถุในใบข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของแคดเมียมมีผลทำให้ปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิด ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ลดลง โดยจากภาพที่ 4.13 กลุ่มการทดลองที่ 2 และ 3 พบปริมาณคลอโรฟิลล์รวมเท่ากับ 8 ± 0.81 , 2.25 ± 0.95 และ 0.75 ± 0.25 ไมโครกรัม/กรัม หรือลดลง 71.86 % และ 90.63 % ตามลำดับ พบ

ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 8 ± 1.7 , 6.31 ± 0.39 และ 2.05 ± 0.19 ไมโครกรัม/กรัม หรือลดลง 21.13 % และ 74.38 % ตามลำดับ แสดงในภาพที่ 4.14 และพบปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 0.37 ± 0.04 , 0.35 ± 0.03 และ 0.27 ± 0.04 ไมโครกรัม/กรัม หรือเพิ่มขึ้น 5.41 % ในกลุ่มที่ 2 และลดลง 27.03 % ในกลุ่มที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 4.15 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 โดยปริมาณการลดลงของรงควัตถุชนิดแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์รวมของกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 นั้น มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ ส่วนปริมาณการลดลงของรงควัตถุแอนโทไซยานินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

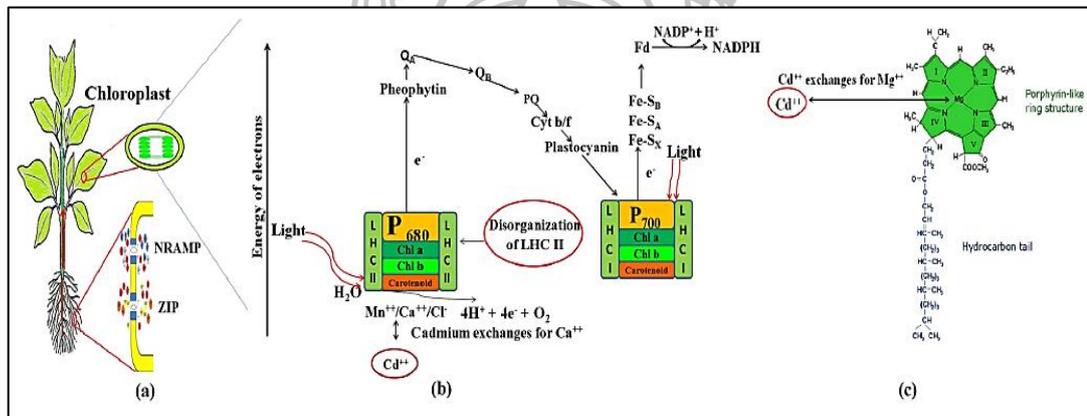
ซึ่งความรุนแรงต่อรงควัตถุ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคดเมียมที่พืชได้รับ ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องมาจากความเสียหายของระบบสังเคราะห์แสงในพืช กล่าวคือ มีการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ อาจมาจากการลดแอกติวิตีของ chlorophylldegrading enzyme chlorophyllase หรือ diminished activity ของ 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ คลอโรฟิลล์ หรือนอกจากนี้อาจเป็นผลของประจุบวก (cation) ที่เป็นตัวสำคัญในหลายๆ กลไกของการสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะการลดลงของ proton gradient ทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลงได้ หรือการลดลงของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase เนื่องจากแคดเมียมไปจับหมู่ SH ของเอนไซม์ Oliveira และนอกจากนี้ยังพบว่าแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งเป็นอะตอมกลางของโครงสร้างคลอโรฟิลล์ มีขนาดใกล้เคียงและมีประจุเท่ากับกับแคดเมียม แคดเมียมจึงสามารถไปแทนที่ Mg ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.16 ทำให้โครงสร้างของคลอโรฟิลล์เปลี่ยนแปลงไปและไม่สามารถทำงานได้



รูปที่ 4.16 ข้อสันนิษฐานโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ a และ b ที่ถูกแทนที่ด้วย Cd^{2+} ตรงตำแหน่งอะตอมของแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งเป็นอะตอมกลางที่มีประจุเป็นบวกสอง และมีความใกล้เคียงกับโลหะแคดเมียม จึงสันนิษฐานว่าเมื่อพืชได้รับแคดเมียมเข้าไปและเก็บสะสมในใบ แคดเมียมอาจจะไปแทนที่แมกนีเซียมในโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ได้ (Parmar et al., 2013)

และอาจจะเป็นผลมาจากที่พืชดูดซึมแคดเมียมเข้าสู่เซลล์แล้ว แคดเมียมจะไปยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ photochlorophyllide reductase (Santos et al., 2012) ทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง สอดคล้องกับงานวิจัย ของ Haouari (Haouari et al, 2012) ที่ได้ศึกษาในตัวอย่างต้นมะเขือเทศก็พบว่าแคดเมียมมีผลทำให้รงควัตถุในต้นมะเขือเทศลดลงเช่นกัน และงานวิจัยของ Tantrey and Agnihotri (Tantrey and Agnihotri, 2010) ในต้นมันฝรั่ง

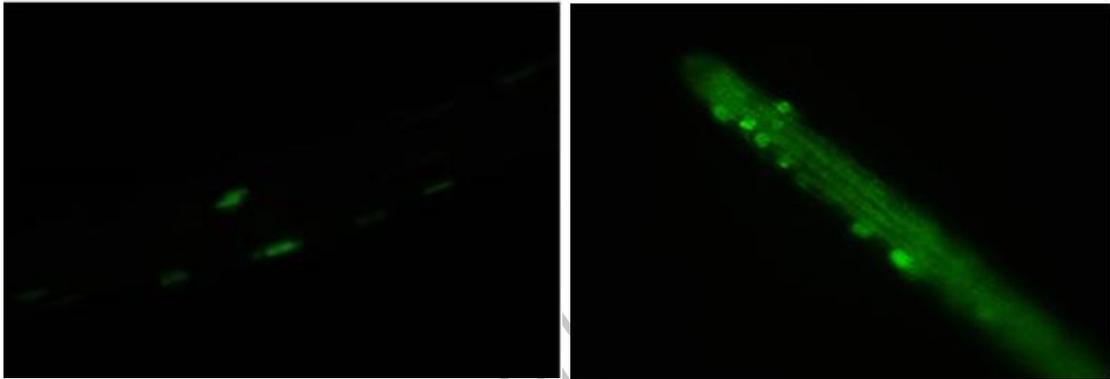
แคดเมียมเป็นโลหะที่เป็นพิษ เมื่อสะสมในพืชจะขัดขวางกระบวนการทางสรีรวิทยา ของพืช ที่สำคัญคือขัดขวางการสังเคราะห์แสง ลดการดูดซึมน้ำไอออนและแร่ธาตุ โดยแคดเมียมจะไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืช ได้แก่ รังควัตถุ ระบบสังเคราะห์แสง I, II ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนและการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อพิจารณาถึงรังควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงที่สำคัญคือ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานิน สาร Aminolevulinate (ALA) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญใน chlorophyll ที่ควบคุม rate-limiting และ regulatory step. แคดเมียมจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ ALA โดยไปแข่งแย่งกระทำระหว่าง SH group ของเอนไซม์ δ -aminolevulinic acid dehydratase และ porphobilinogen deaminase ทำให้เกิดการสะสมในคลอโรฟิลล์ทำให้ระบบการสังเคราะห์แสงเสียหาย ดังแสดงในภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.17 แสดงผลของแคดเมียมในระบบ photosynthetic machinery (a) Cd ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์ผ่าน plasma membrane transporter (b) การเปลี่ยนแปลงระบบของ oxygen evolving และ light harvesting complexes, Cd จะสร้างพันธะกับ QB pocket ดังนั้นจึงทำให้อิเล็กตรอนไหลจากตำแหน่ง QA ไปยัง QB ได้ช้าลง (c) เกิดการรวมตัวของ Cd ใน chlorophyll molecule. (Parmar et al., 2013)

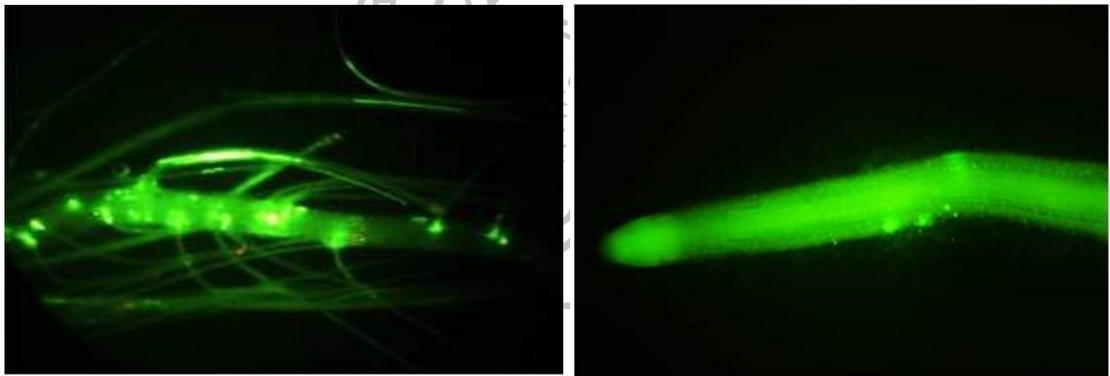
4.6 การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DCFH-DA staining

พืชที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะ ความเครียดจากโลหะหนักจะส่งผลให้พืชมีการผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระออกมาเพื่อช่วยในการปรับเซลล์ให้สู่สมดุล การผลิต ROS (reactive oxygen species) ซึ่งโดยทั่วไปตัวหลักๆประกอบด้วย Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase และ Catalase แต่กระบวนการหรือขั้นตอนการสกัดและแยกวัดเอนไซม์แต่ละประเภทเป็นเรื่องที่ค่อนข้างยากและมีความเฉพาะเจาะจงสูง จึงได้ทำการวัดระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระรวมโดยวิธี DCFH-DA staining ผลการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุม มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม Cd 250 μ M และกลุ่ม Cd 2500 μ M ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.18



กลุ่มควบคุม

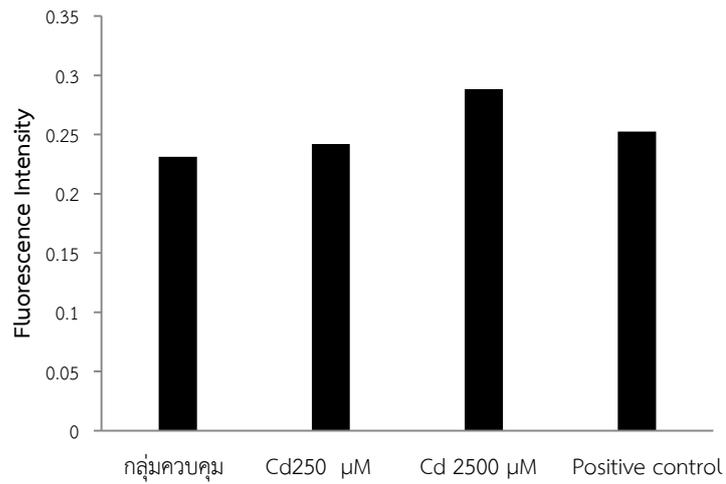
กลุ่มแคดเมียม 250 µM



กลุ่มแคดเมียม 2500 µM

Positive control

ภาพที่ 4.18 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แสดงผลของ DCFH-DA staining ในราก



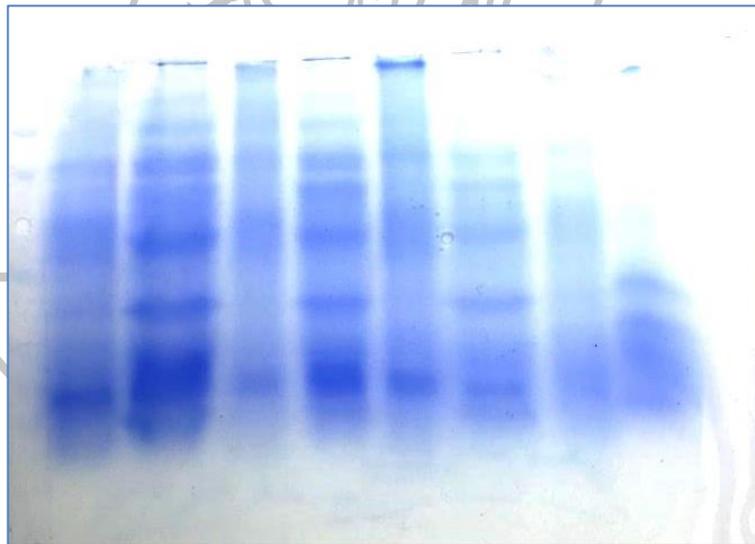
ภาพที่ 4.19 Fluorescence intensity DCFH-DA staining ในราก

ความยาวคลื่น 517-527 นาโนเมตร

จากหลักการการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์พบว่า ข้าวในกลุ่มควบคุม ไม่มีโลหะแคดเมียม จะมีความเครียดน้อยที่สุด ค่า Fluorescence Intensity ต่ำที่สุด กลุ่ม Cd 250 μM มีค่าสูงขึ้นมา และกลุ่ม Cd 2500 μM มีค่าสูงที่สุด ซึ่งในการทดลองนี้ก็ได้ทำเทียบกับกลุ่ม Positive control จากผลการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 4.18 พบว่ากลุ่ม Positive control มีค่า Fluorescence Intensity เท่ากับ 0.27 และ 0.24, 0.25 และ 0.30 ในกลุ่มควบคุม กลุ่ม Cd 250 μM และกลุ่ม Cd 2500 μM ตามลำดับ หรือกลุ่ม Cd 250 μM มีค่าเพิ่มขึ้น 8.69% และกลุ่ม Cd 2500 μM มีค่าเพิ่มขึ้น 30.43% ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่าข้าวที่ปลูกในสถานะที่ปนเปื้อนโลหะหนักนั้นจะทำให้เอนไซม์ superoxide dismutase และ peroxidase มีค่าสูงขึ้น เพื่อต่อสู้กับสถานะ oxidative ของแคดเมียมในเซลล์ (Bian et al., 2016)

4.7 การศึกษาการเหนี่ยวนำโปรตีนในข้าว

ในการศึกษาผลของแคดเมียมต่อการเหนี่ยวนำให้ข้าวไรซ์เบอร์รี่สร้าง (Phytochelatin) ขึ้นมา ทำได้โดยการสกัดโปรตีนออกจากพืช แล้วนำมาแยกแอมป์โปรตีนด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ผู้วิจัยได้พยายามทำหลายวิธี ซึ่งจะวิเคราะห์ปัญหาที่พบ ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.20 แอมป์โปรตีนที่แยกด้วย Gel electrophoresis



ภาพที่ 4.21 แลกโปรตีนที่แยกด้วย Gel electrophoresis และทำ Derivatizations ด้วยสารละลาย bromobimane

จากผลการศึกษาพบว่า การแยกแถบโปรตีนไฟโตคีเรตินนั้นไม่ให้เกิดการทดลองเป็นตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ ซึ่งในทางทฤษฎีพืชควรจะมีการสร้างโปรตีน Phytochelatin ขึ้นมา เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่มีโลหะแคดเมียม ปัจจัยที่ทำให้ผลการทดลองไม่ประสบผลสำเร็จอาจจะมีสาเหตุ ดังต่อไปนี้

1) วิธีการสกัดและระบบบัฟเฟอร์ยังไม่มีความเหมาะสม เนื่องจากการสกัดโปรตีนและแยกแถบด้วยเทคนิคนี้ไม่ได้เป็นที่นิยม ส่วนใหญ่วิธีที่น่าอ้างอิงนั้นเป็นการเตรียมโปรตีนสำหรับแยกด้วยเทคนิค Blotting ซึ่งจะมีโปรตีนความเข้มข้นมากกว่าการทำแบบ gel electrophoresis

2) ปริมาณโปรตีนชนิดนี้ในข้าวไรซ์เบอร์รี่อาจจะมีน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีนตัวอื่น เมื่อนำมาแยกจึงไม่ปรากฏแถบโปรตีนชนิดดังกล่าวขึ้นมาแต่จะปรากฏแถบโปรตีนอื่นๆ ขึ้นมาแทน เพราะโปรตีน phytochelatin นั้นจะมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 3-9 kDa

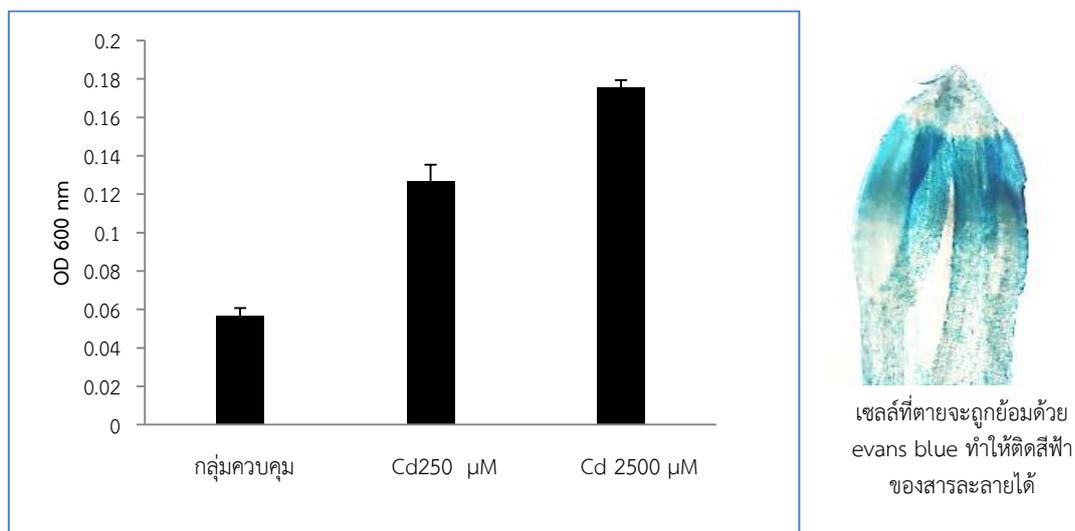
3) การรักษาอุณหภูมิขณะทำการทดลองไม่ได้ตามที่วางแผนไว้ (ปกติต้องทำในที่เย็นตลอดเวลา) เช่น กระบวนการ Hydrophilization ที่ทำให้โปรตีนบางส่วนเสื่อมสภาพได้

4) การแยกแถบโปรตีนโดยใช้ Standard cut off ที่ 15 kDa ในขณะที่โปรตีนที่สนใจมีค่า 3-9 kDa ซึ่งต่ำกว่าคัทออฟที่ควรจะเป็น

อย่างไรก็ตามที่ผ่านมามีไม่ปรากฏรายงานที่พืชชั้นสูงไม่มีการสร้างโปรตีนไฟโตคีเรตินส์ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและพัฒนาต่อไปในอนาคต

4.8 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้สารละลาย Evans blue

การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยการย้อมด้วยสารละลาย Evans blue ให้ผลการทดลอง ดังต่อไปนี้

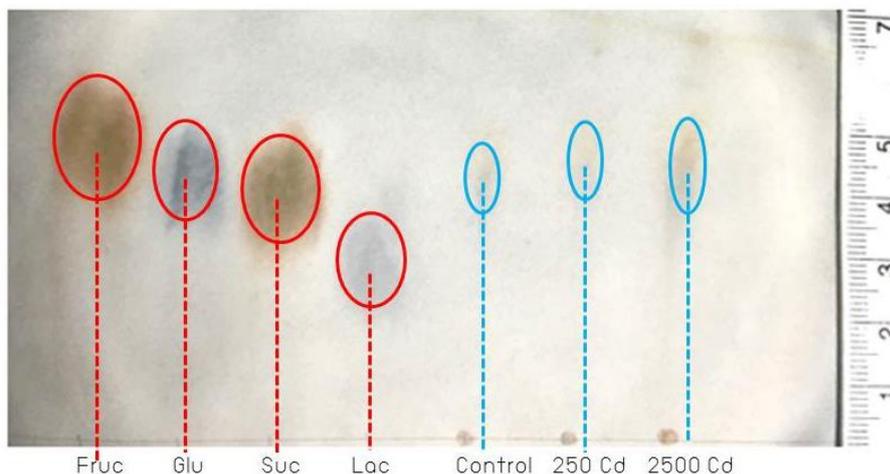


ภาพที่ 4.22 ความเป็นพิษของเซลล์ที่ย้อมด้วยสารละลาย Evans blue

จากการศึกษาการตายของเซลล์รากข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยการย้อมสารละลาย Evans blue ซึ่งเป็นสารย้อม marker of membrane integrity พบว่า แคดเมียมมีผลต่อการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น เมื่อทำปริมาณวิเคราะห์หาค่าเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำเงิน พบว่าข้าวที่ปลูกใน Cd 250 μM และ 2500 μM เซลล์รากเสียหาย 131.58% และ 215.79% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 μM Cd) นั้นแสดงว่าเซลล์รากพืชที่ได้รับความเสียหายจะย้อมติดสีย้อม Evans blue ได้มากกว่า อธิบายได้ว่า เยื่อหุ้มเซลล์ของพืชทุกชนิดจะมีความเฉพาะเจาะจงสูง ในการคัดเลือกสารผ่านเข้าออกเซลล์อย่างเป็นระบบ และเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถกั้นสีย้อมไม่ให้ผ่านไป plasma membrane เซลล์จึงไม่ถูกย้อม ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วคุณสมบัติในส่วนนี้จะเสียหายไป ทำให้ไม่สามารถกั้นสีย้อม Evans blue ได้ เซลล์จึงถูกย้อมจึงส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงด้วย โดยรากข้าวที่ปลูกในสภาวะที่มีแคดเมียมความเข้มข้นสูง แคดเมียมจะไปทำให้เซลล์เสียหายได้มากกว่าข้าวที่ปลูกในสภาวะที่ความเข้มข้นของแคดเมียมต่ำ และค่าที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

4.9 การทดสอบชนิดของน้ำตาลในข้าวไรซ์เบอร์รี่

การวิเคราะห์ประเภทน้ำตาลในข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลองด้วยเทคนิค Thin layer chromatography ให้ผลการทดลอง ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.23 การระสมน้ำตาลในรากข้าวไรซ์เบอร์รี่
ตารางที่ 4.3 ค่า Rf แสดงชนิดของน้ำตาลในข้าวไรซ์เบอร์รี่

สารมาตรฐาน สารตัวอย่าง	ค่า Rf
ฟรุคโตส	0.52
กลูโคส	0.50
ซูโครส	0.46
แลคโตส	0.35
กลุ่มควบคุม	0.46
กลุ่ม Cd 250 μ M	0.48
กลุ่ม Cd 2500 μ M	0.48

จากภาพที่ 4.22 และ 4.23 ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันในด้านการระสมประเภทของน้ำตาล เมื่อวัดจากค่า Rf พบว่าในกลุ่มควบคุม กลุ่ม Cd 250 μ M และกลุ่ม Cd 2500 μ M มีค่า Rf เฉลี่ย 0.46, 0.48 และ 0.48 ตามลำดับ เป็นค่าที่ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเทียบกับประเภทของน้ำตาลที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่า ฟรุคโตสมีค่า Rf 0.52 กลูโคส มีค่า Rf 0.50 ซูโครสมีค่า Rf 0.46 และแลคโตสมีค่า Rf 0.35 ดังนั้น ข้าวที่ปลูกในสภาวะควบคุมและสภาวะที่มีแคดเมียม จึงมีการระสมน้ำตาลไม่แตกต่างกัน โดยมีการระสมน้ำตาลทั้ง 4 ประเภท ตามน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ทดสอบได้แก่ กลูโคส แลคโตส ซูโครส ฟรุคโตส

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยเรื่อง การศึกษาผลของ ผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิลิกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่ ได้สรุปผลการดำเนินงานวิจัย ดังต่อไปนี้

5.1.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าว พบว่าข้าวกลุ่มควบคุม มีอัตราการเจริญเติบโตตามปกติ และข้าวกลุ่ม Cd 250 μM และกลุ่ม Cd 2500 μM มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงตามลำดับ

5.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ แคดเมียม (Cd) และซิลิกอน (Si) โดยเทคนิค inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) พบว่าในกลุ่มควบคุม ไม่มีการสะสมแคดเมียม ในกลุ่ม Cd 250 μM และกลุ่ม Cd 2500 μM มีการสะสมแคดเมียมมากขึ้นตามลำดับ

5.1.3 การศึกษาลักษณะของธาตุซิลิกอนโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM) พบว่าข้าวกลุ่มควบคุมมีซิลิกอนที่สมบูรณ์มากกว่ากลุ่ม Cd 250 μM และกลุ่ม Cd 2500 μM

5.1.4 การศึกษาลักษณะการยืดยาวของแคดเมียมโดยใช้เทคนิค Scanning electron microscope (SEM) พบว่า ในข้าวกลุ่มควบคุมไม่มีการยืดยาวของแคดเมียม ในขณะที่กลุ่ม Cd 250 μM และกลุ่ม Cd 2500 μM มีการยืดยาวของแคดเมียมอย่างเห็นได้ชัดเจน

5.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ โดยใช้เทคนิค UV-vis spectrophotometry พบว่า กลุ่ม Cd 250 μM และ กลุ่ม Cd 2500 μM มีปริมาณรงควัตถุลดลงทั้ง 2 ประเภท ยกเว้นแอนโทไซยานิน

5.1.6 การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DCFH-DA staining พบว่า กลุ่ม Cd 250 μM และ Cd 2500 μM มีระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบในกลุ่ม Cd 2500 μM มากกว่ากลุ่ม Cd 250 μM

5.1.7 การแยกโปรตีน Phytochelatins โดยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าการทดลองล้มเหลวเพราะไม่สามารถแยกโปรตีนดังกล่าวออกมาได้

5.1.8 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยย้อมด้วยสารละลาย Evans blue พบว่า ทุกกลุ่มมีความเป็นพิษของเซลล์ราก โดยเรียงลำดับ กลุ่มควบคุม < กลุ่ม Cd 250 μM < กลุ่ม Cd 2500 μM

5.1.9 การทดสอบน้ำตาลในต้นอ่อนข้าวไรซ์เบอร์รี่ พบว่า ข้าวทั้ง 3 กลุ่มการทดลองมีการสะสมน้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส และไม่มีการสะสมแลคโตส

5.2 ปัญหาและแนวทางแก้ไข

ปัญหาที่พบในการวิจัยคือการสกัดและการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis นั้นเกิดความล้มเหลว ควรค้นหาเทคนิคใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ เช่น Mass spectrophotometry หรือ HPLC ในการตรวจวิเคราะห์

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยพบว่ายังมีข้อบกพร่องบางส่วนที่จะต้องปรับปรุงรวมทั้งต่อยอดในการศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

5.3.1 ต่อยอดการศึกษาการสร้างโปรตีนไฟโตเคโรติน การสกัด การแยก การเก็บรักษา ให้โปรตีนยังคงสภาพด้วยเทคนิคที่หลากหลายต่อไป

5.3.2 ศึกษากระบวนการ Rhizofiltration ให้เป็นรูปธรรมมากขึ้นกว่านี้เพราะเมื่อพิจารณาผลจากภาพ SEM เบื้องต้น พบว่าเป็นที่น่าสนใจ

5.3.3 ศึกษาเปรียบเทียบข้าวหลายๆ สายพันธุ์ ไปพร้อมๆ กัน



รายการอ้างอิง

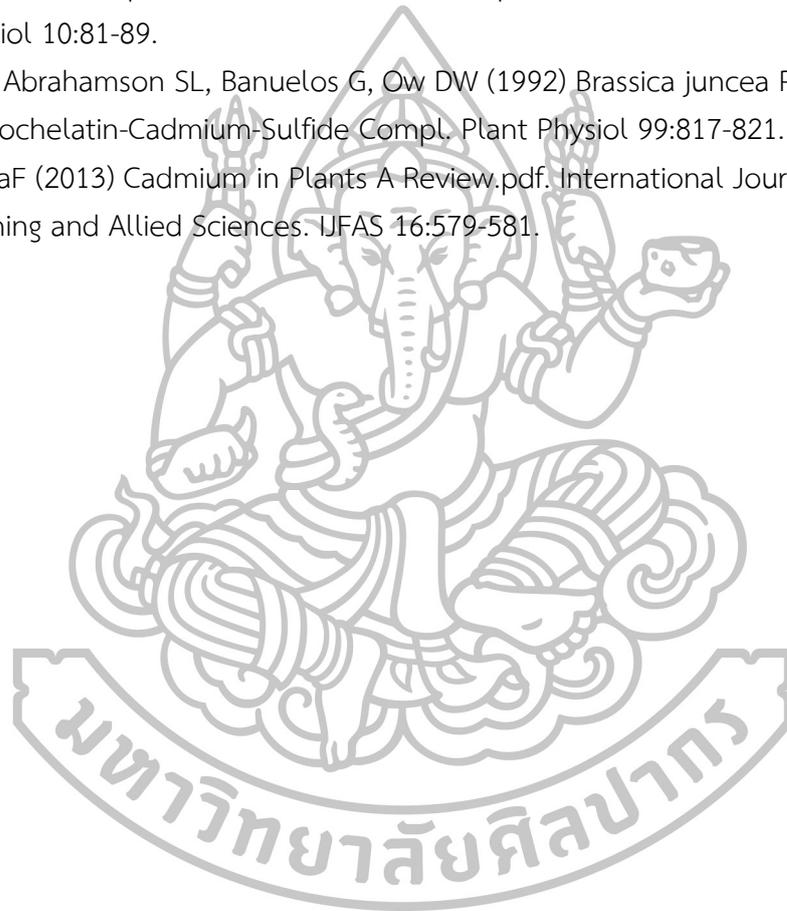
- ประภาส วีระแพทย์. (2555). “คลังข้อมูลสารสนเทศข้าวเชิงลึก”. เข้าถึงเมื่อ 20 กันยายน 2559
เข้าถึงได้จาก <http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice-histories.html>
- ปลื้มพวง และคณะ (2557) ปริมาณแคดเมียมในข้าวที่ปลูกในดินนาปนเปื้อนแคดเมียมในพื้นที่ ลุ่ม
น้ำแม่ตาบ. *Journal of Science and Technology* 3.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และ นิธิ รัตนานนท์. (2557). เข้าถึงเมื่อ 20 กันยายน 2559 เข้าถึงได้จาก
<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1657/rice-ข้าว>
- มนตรี บุญจรัส. (2557). “ชมรมเกษตรปลอดสารพิษ” เข้าถึงเมื่อ 12 กันยายน 2559
เข้าถึงได้จาก <http://www.thaigreenagro.com>
- สุหรัย สายครและวินนา เจริญสุวรรณ. (2537). ปรอท ตะกั่ว แคดเมียม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:
โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abrahamson SL, Speiser DM, ow DW (1992) A Gel Electrophoresis Assay for
Phytochelatin. *Analytical biochemistry* 200:239-243.
- Adrees M, Ali S, Rizwan M, Zia-Ur-Rehman M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Qayyum
MF, Irshad MK (2015) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy
metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 119:186-197.
- Akhter F, McGarvey B, Macfie SM (2012) Reduced translocation of cadmium from
roots is associated with increased production of phytochelatin and their
precursors. *J Plant Physiol* 169:1821-1829.
- Bian R, Li L, Bao D, Zheng J, Zhang X, Zheng J, Liu X, Cheng K, Pan G (2016) Cd
immobilization in a contaminated rice paddy by inorganic stabilizers of
calcium hydroxide and silicon slag and by organic stabilizer of biochar.
Environ Sci Pollut Res Int 23:10028-10036.
- Chen YA, Chi WC, Huang TL, Lin CY, Quynh Nguyeh TT, Hsiung YC, Chia LC, Huang HJ
(2012) Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots.
Plant Physiol Biochem 55:23-32.
- Duresova Z, Sunovska A, Hornik M (2014) Rhizofiltration potential of *Arundo donax* for
cadmium and zinc removal from contaminated wastewater. *Chemical
Papers* 68:1452–1462.
- Fahr M, Laplaze L, Bendaou N, Hocher V, Mzibri ME, Bogusz D, Smouni A (2013) Effect
of lead on root growth. *Front Plant Sci* 4:175-188.
- Fan TW-M, Lane AN, Higashi RM (2004) An Electrophoretic Profiling Method for
Thiol-rich Phytochelatin and Metallothioneins. *Phytochem Anal* 15:175-
183.

- Herath, D. C. Bandara, Weerasinghe PA, Iqbal MCM, Wijayawardhana HCD (2014) Effect of Cadmium on Growth Parameters and Plant Accumulation in Different Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research* 25:532–542.
- Hooda V (2007) Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology* 28:367-376.
- Inouhe M (2005) Phytochelatin. toxic metals in plant 17:65-78.
- Kawakami SK, Gledhill M, Achterberg EP (2006) Effects of metal combinations on the production of phytochelatin and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biometals* 19:51-60.
- Kibria MG, Osman KT, Ahmed MJ (2006) Cadmium and lead uptake by rice (*Oryza sativa* L.) grown in three different textured soils. *Soil & Environ* 25:70-77.
- Liu P, Cai W-J, Yu L, Yuan B-F, Feng Y-Q (2015) Determination of Phytochelatin in Rice by Stable Isotope Labeling 63:5935–5942
Coupled with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 63:5935–5942.
- Minhee Lee, Minjune Yang (2010) Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 173:589–596
- Najmanova J, Neumannova E, Leonhardt T, Zitka O, Kizek R, Macek T, Mackova M, Kotrba P (2012) Cadmium-induced production of phytochelatin and speciation of intracellular cadmium in organs of *Linum usitatissimum* seedlings. *Industrial Crops and Products* 36:536-542.
- Pandey KB, Rizvi SI (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3:2-12.
- Parmar P, Kumari N, Sharma V (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies* 54:865-878
- Racchi ML (2013) Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants* 2:340-369.
- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Rizvi H, Zia-Ur-Rehman M, Hannan F, Qayyum MF, Hafeez F, Ok YS (2016) Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:17859-17879.

- Sahebi M, Hanafi MM, Siti Nor Akmar A, Rafii MY, Azizi P, Tengoua FF, Nurul Mayzaitul Azwa J, Shabanimofrad M (2015) Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *Biomed Res Int* 6:513-521
- Santos RWd, Schmidt ÉC, Martins RdP, Latini A, Maraschin M, Horta PA, Bouzon ZL (2012) Effects of Cadmium on Growth, Photosynthetic Pigments, Photosynthetic Performance, Biochemical Parameters and Structure of Chloroplasts in the Agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *American Journal of Plant Sciences* 03:1077-1084.
- Silva Lobato AKd, Silva Guedes EM, Jose D, Oliveira Neto CFd (2013) Silicon: A Benefic Element to Improve Tolerance in Plants Exposed to Water Deficiency.
- Speiser DM, Abrahamson SL, Banuelos G, Ow DW (1992) Brassica juncea Produces a Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Compl. *Plant Physiol* 99:817-821.
- Yadav K. Brijesh, Siebel A. Maarten, Bruggen A. J. Johan (2011) Rhizofiltration of a Heavy Metal (Lead) Containing Wastewater Using the Wetland Plant *Carex pendula*. *Clean soi air water* 39:467-474
- Abrahamson SL, Speiser DM, ow DW (1992) A Gel Electrophoresis Assay for Phytochelatins. *Analytical biochemistry* 200:239-243.
- Adrees M, Ali S, Rizwan M, Zia-Ur-Rehman M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Qayyum MF, Irshad MK (2015) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 119:186-197.
- Akhter F, McGarvey B, Macfie SM (2012) Reduced translocation of cadmium from roots is associated with increased production of phytochelatins and their precursors. *J Plant Physiol* 169:1821-1829.
- Bian R, Li L, Bao D, Zheng J, Zhang X, Zheng J, Liu X, Cheng K, Pan G (2016) Cd immobilization in a contaminated rice paddy by inorganic stabilizers of calcium hydroxide and silicon slag and by organic stabilizer of biochar. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:10028-10036.
- Chen YA, Chi WC, Huang TL, Lin CY, Quynh Nguyeh TT, Hsiung YC, Chia LC, Huang HJ (2012) Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiol Biochem* 55:23-32.
- Duresova Z, Sunovska A, Hornik M (2014) Rhizofiltration potential of *Arundo donax* for cadmium and zinc removal from contaminated wastewater. *Chemical Papers* 68:1452-1462.
- Fahr M, Laplaze L, Bendaou N, Hocher V, Mzibri ME, Bogusz D, Smouni A (2013) Effect of lead on root growth. *Front Plant Sci* 4:175.

- Fan TW-M, Lane AN, Higashi RM (2004) An Electrophoretic Profiling Method for Thiol-rich Phytochelatins and Metallothioneins. *Phytochem Anal* 15:175-183.
- Herath, D. C. Bandara, Weerasinghe PA, Iqbal MCM, Wijayawardhana HCD (2014) Effect of Cadmium on Growth Parameters and Plant Accumulation in Different Rice Varieties in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research* 25:532 – 542.
- Hooda V (2007) Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology* 28:367-376.
- Inouhe M (2005) Phytochelatins. *toxic metals in plant* 17:65-78.
- Kawakami SK, Gledhill M, Achterberg EP (2006) Effects of metal combinations on the production of phytochelatins and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biometals* 19:51-60.
- Kibria MG, Osman KT, Ahmed MJ (2006) Cadmium and lead uptake by rice (*Oryza sativa* L.) grown in three different textured soils. *Soil & Environ* 25:70-77.
- Liu P, Cai W-J, Yu L, Yuan B-F, Feng Y-Q (2015) Determination of Phytochelatins in Rice by Stable Isotope Labeling. *Agricultural and food chemistry* 63 : 5935-5942.
- Coupled with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 63:5935–5942.
- Najmanova J, Neumannova E, Leonhardt T, Zitka O, Kizek R, Macek T, Mackova M, Kotrba P (2012) Cadmium-induced production of phytochelatins and speciation of intracellular cadmium in organs of *Linum usitatissimum* seedlings. *Industrial Crops and Products* 36:536-542.
- Pandey KB, Rizvi SI (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3:2-12.
- Parmar P, Kumari N, Sharma V (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies* 54: 1096-1104
- Racchi ML (2013) Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants* 2:340-369.
- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Rizvi H, Zia-Ur-Rehman M, Hannan F, Qayyum MF, Hafeez F, Ok YS (2016) Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:17859-17879.
- Sahebi M, Hanafi MM, Siti Nor Akmar A, Rafii MY, Azizi P, Tengoua FF, Nurul Mayzaitul Azwa J, Shabanimofrad M (2015) Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *Biomed Res Int* 13:39-46.

- Santos RWd, Schmidt ÉC, Martins RdP, Latini A, Maraschin M, Horta PA, Bouzon ZL (2012) Effects of Cadmium on Growth, Photosynthetic Pigments, Photosynthetic Performance, Biochemical Parameters and Structure of Chloroplasts in the Agarophyte Plant *Physiol* 65:650-661. (Rhodophyta, Gracilariales). *American Journal of Plant Sciences* 03:1077-1084.
- Silva Lobato AKd, Silva Guedes EM, Jose D, Oliveira Neto CFd (2013) Silicon: A Benefic Element to Improve Tolerance in Plants Exposed to Water Deficiency. *Plant Physiol* 10:81-89.
- Speiser DM, Abrahamson SL, Banuelos G, Ow DW (1992) Brassica juncea Produces a Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Compl. *Plant Physiol* 99:817-821.
- Zargari SMHaF (2013) Cadmium in Plants A Review.pdf. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. *IJFAS* 16:579-581.





ภาคผนวก



การวิเคราะห์อัตราความยาวของราก

ภาคผนวก ก. 1 Descriptives ของอัตราความยาวของราก

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	7.3042	0.75973	0.43863	5.4169	9.1914	6.53	8.05
2.00	3	3.2708	0.86251	0.49797	1.1282	5.4134	2.60	4.24
3.00	3	2.4042	0.41839	0.24156	1.3648	3.4435	2.08	2.88
Total	9	4.3264	2.34577	0.78192	2.5233	6.1295	2.08	8.05

ภาคผนวก ก. 2 Anova ของอัตราความยาวของราก

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41.029	2	20.514	41.134	0.000
Within Groups	2.992	6	0.499		
Total	44.021	8			

การวิเคราะห์อัตราความสูงของลำต้น

ภาคผนวก ก. 3 Descriptives ของอัตราความสูงของลำต้น

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	9.7083	0.70357	0.40621	7.9606	11.4561	9.21	10.51
2.00	3	5.7479	0.54059	0.31211	4.4050	7.0908	5.24	6.32
3.00	3	3.5875	0.60198	0.34755	2.0921	5.0829	3.11	4.26
Total	9	6.3479	2.74126	0.91375	4.2408	8.4550	3.11	10.51

ภาคผนวก ก. 4 Anova ของอัตราความสูงของลำต้น

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	57.817	2	28.908	75.437	0.000
Within Groups	2.299	6	0.383		
Total	60.116	8			

การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในราก

ภาคผนวก ก. 5 Descriptives ปริมาณแคดเมียมในราก

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
2.00	3	11.9967	1.87713	1.08376	7.3336	16.6597	10.07	13.82
3.00	3	52.3467	10.52576	6.07705	26.1992	78.4941	40.87	61.55
Total	9	21.4478	24.34350	8.11450	2.7357	40.1598	0.00	61.55

ภาคผนวก ก. 6 Anova ปริมาณแคดเมียมในราก

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4512.216	2	2256.108	59.208	0.000
Within Groups	228.631	6	38.105		
Total	4740.847	8			

ปริมาณแคดเมียมในลำต้น

ภาคผนวก ก. 7 Descriptives ปริมาณแคดเมียมในลำต้น

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
2.00	3	1.2833	0.38553	0.22259	0.3256	2.2410	0.91	1.68
3.00	3	1.0833	0.83578	0.48254	0.9929	3.1595	0.31	1.97
Total	9	0.7889	0.75456	0.25152	0.2089	1.3689	0.00	1.97

ภาคผนวก ก. 8 Anova ปริมาณแคดเมียมในลำต้น

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.861	2	1.430	5.065	0.051
Within Groups	1.694	6	0.282		
Total	4.555	8			

ปริมาณแคดเมียมในใบ

ภาคผนวก ก. 9 Descriptives ปริมาณแคดเมียมในใบ

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
2.00	3	0.3700	0.14422	0.08327	0.0117	0.7283	0.25	0.53
3.00	3	0.8067	0.10970	0.06333	0.5342	1.0792	0.72	0.93
Total	9	0.3922	0.36124	0.12041	0.1145	0.6699	0.00	0.93

ภาคผนวก ก. 10 Anova ปริมาณแคดเมียมในใบ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.978	2	0.489	44.693	0.000
Within Groups	0.066	6	0.011		
Total	1.044	8			

ปริมาณซิลิกอนในราก

ภาคผนวก ก.11 Descriptives ปริมาณซิลิกอนในราก

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	2.8200	0.51971	0.30006	1.5290	4.1110	2.51	3.42
2.00	3	4.4500	2.08094	1.20143	0.7193	9.6193	3.04	6.84
3.00	3	5.0033	0.23029	0.13296	4.4313	5.5754	4.78	5.24
Total	9	4.0911	1.45932	0.48644	2.9694	5.2128	2.51	6.84

ภาคผนวก ก. 12 Anova ปริมาณซิลิกอนในราก

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.730	2	3.865	2.492	0.163
Within Groups	9.307	6	1.551		
Total	17.037	8			

ภาคผนวก ก. 13 Descriptives ปริมาณชิลิกอนในลำต้น

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	87.1600	7.44393	4.29776	68.6683	105.6517	78.61	92.20
2.00	3	82.6667	3.98569	2.30114	72.7657	92.5677	79.12	86.98
3.00	3	59.3167	7.21889	4.16783	41.3839	77.2494	52.66	66.99
Total	9	76.3811	14.08671	4.69557	65.5531	87.2091	52.66	92.20

ภาคผนวก ก. 14 Anova ปริมาณชิลิกอนในลำต้น

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1340.664	2	670.332	16.295	0.004
Within Groups	246.821	6	41.137		
Total	1587.484	8			

ปริมาณชิลิกอนในใบ

ภาคผนวก ก. 15 Descriptives ปริมาณชิลิกอนในใบ

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	75.8000	5.50281	3.17705	62.1303	89.4697	71.40	81.97
2.00	3	78.3533	6.05509	3.49591	63.3117	93.3950	71.38	82.28
3.00	3	55.7733	6.20440	3.58211	40.3608	71.1859	48.90	60.96
Total	9	69.9756	11.87604	3.95868	60.8468	79.1043	48.90	82.28

ภาคผนวก ก. 16 Anova ปริมาณชิลิกอนในใบ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	917.443	2	458.722	13.052	0.007
Within Groups	210.879	6	35.147		
Total	1128.322	8			

ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ

ภาคผนวก ก. 17 Descriptives ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	4	8.0000	0.81650	0.40825	6.7008	9.2992	7.00	9.00
2.00	4	2.2500	0.95743	0.47871	0.7265	3.7735	1.00	3.00
3.00	4	0.7500	0.28868	0.14434	0.2907	1.2093	0.50	1.00
Total	12	3.6667	3.33258	0.96203	1.5492	5.7841	0.50	9.00

ภาคผนวก ก. 18 Anova ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	117.167	2	58.583	105.450	0.000
	Linear Contrast	105.125	1	105.125	189.225	0.000
	Term Deviation	12.042	1	12.042	21.675	0.001
Within Groups		5.000	9	0.556		
Total		122.167	11			

ปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบ

ภาคผนวก ก. 19 Descriptives ปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบ

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	4	7.9919	1.70468	0.85234	5.2794	10.7045	5.95	9.53
2.00	4	6.3100	0.39763	0.19881	5.6773	6.9427	5.91	6.75
3.00	4	2.0555	0.19154	0.09577	1.7507	2.3603	1.79	2.22
Total	12	5.4525	2.76663	0.79866	3.6947	7.2103	1.79	9.53

ภาคผนวก ก. 20 Anova แคลโรทีนอยด์ในใบ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	74.894	2	37.447	36.231	0.000
	Linear Contrast	70.482	1	70.482	68.193	0.000
	Term Deviation	4.412	1	4.412	4.269	0.069
Within Groups		9.302	9	1.034		
Total		84.196	11			

ปริมาณแอนโทไซยานินในใบ

ภาคผนวก ก. 21 Descriptives ปริมาณแอนโทไซยานินในใบ

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	4	0.3541	0.04800	.02400	0.2777	0.4304	0.30	0.40
2.00	4	0.3725	0.02986	.01493	0.3250	0.4200	0.33	0.40
3.00	4	0.2725	0.03500	.01750	0.2168	0.3282	0.23	0.31
Total	12	0.3330	0.05714	.01650	0.2967	0.3693	0.23	0.40

ภาคผนวก ก. 22 Anova ปริมาณแอนโทไซยานินในใบ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.023	2	0.011	7.688	0.011
Within Groups	0.013	9	0.001		
Total	0.036	11			



ภาคผนวก ข. 1 ลักษณะการเจริญเติบโตของข้าวไรซ์เบอร์รี่



กลุ่มควบคุม

กลุ่มแคดเมียม 250 μ M

กลุ่มแคดเมียม 2500 μ M

ภาคผนวก ข. 2 ลักษณะใบของข้าวไรซ์เบอร์รี่



กลุ่มควบคุม



กลุ่มแคตเมียม 250 ไมโครโมลาร์



กลุ่มแคตเมียม 2500 ไมโครโมลาร์

ภาคผนวก ข. 3 การวัดการเจริญเติบโตข้าวไรซ์เบอร์รี่



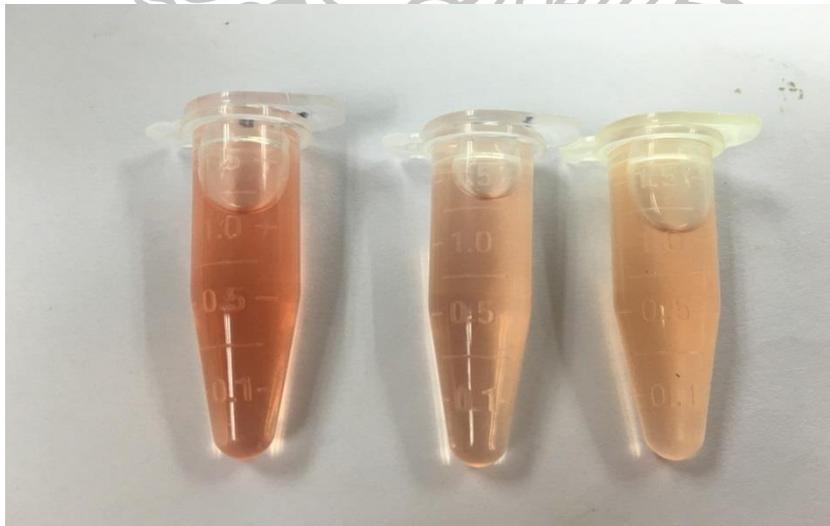
ภาคผนวก ข. 4 สารสกัดรงควัตถุคลอโรฟิลล์



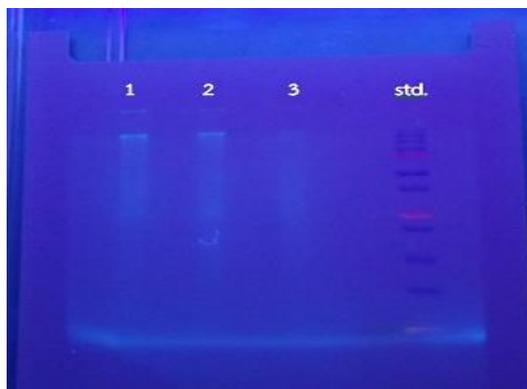
ภาคผนวก ข. 5 สารสกัดตรงควัฒุแคะโรทีนอยด์



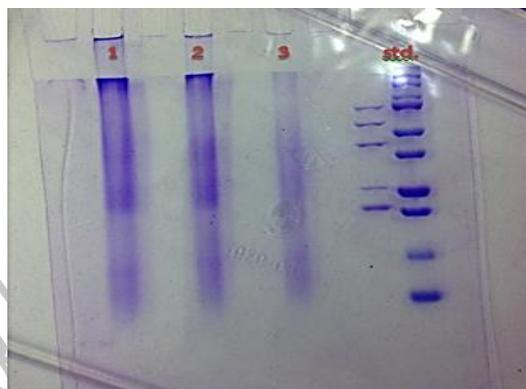
ภาคผนวก ข. 6 สารสกัดตรงควัฒุแอนโทไซยานิน



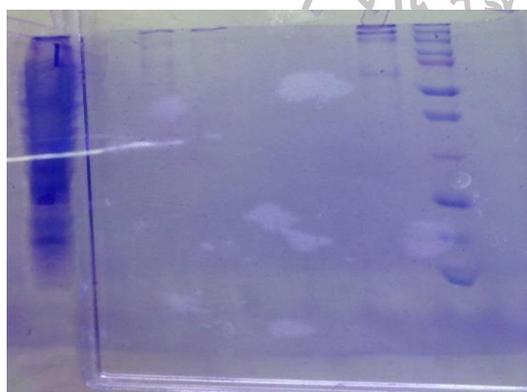
ภาคผนวก ข. 7 การทดลองแยกแอมป์โปรตีนโดยใช้เทคนิค Electrophoresis



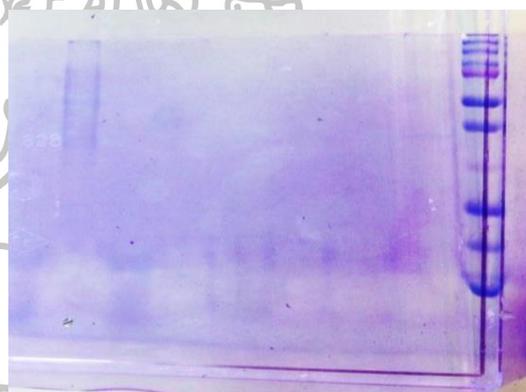
ครั้งที่ 1



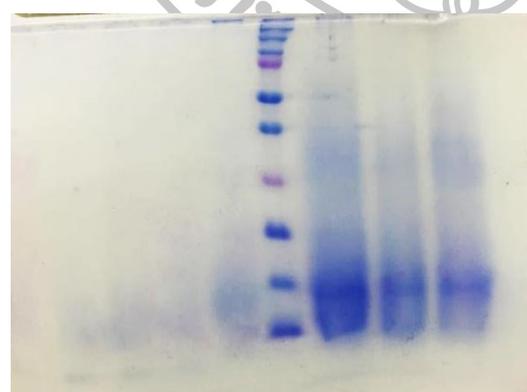
ครั้งที่ 1



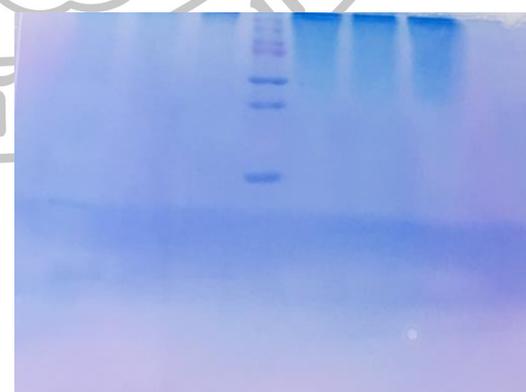
ครั้งที่ 2



ครั้งที่ 3

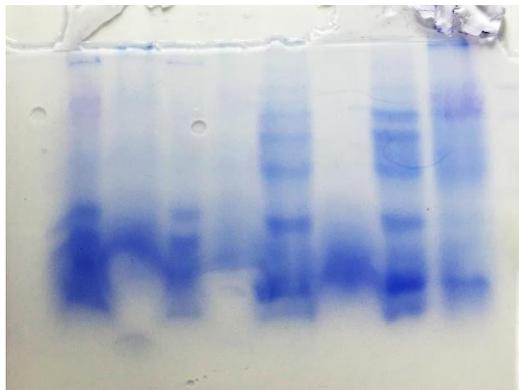


ครั้งที่ 4

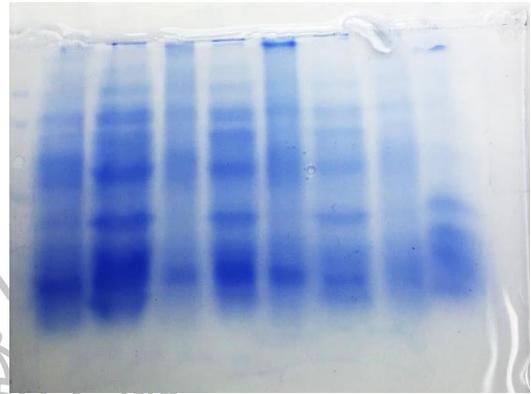


ครั้งที่ 5

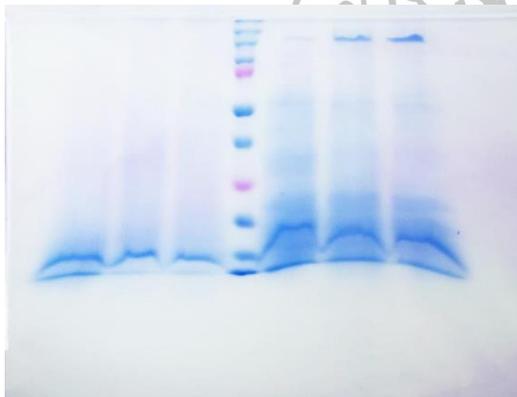
การทดลองแยกแถบโปรตีนโดยใช้เทคนิค Electrophoresis (ต่อ)



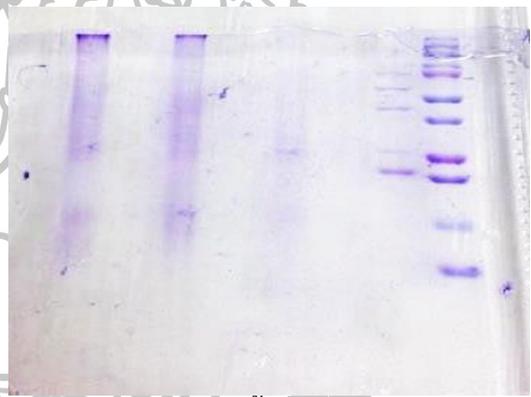
ครั้งที่ 6



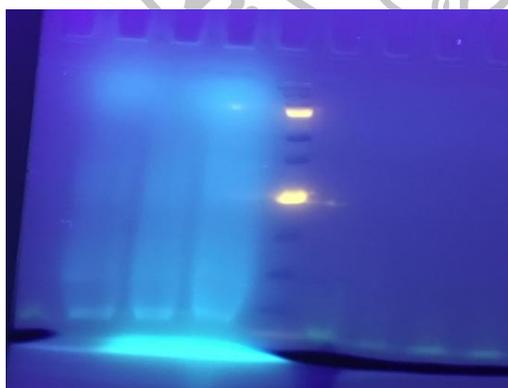
ครั้งที่ 7



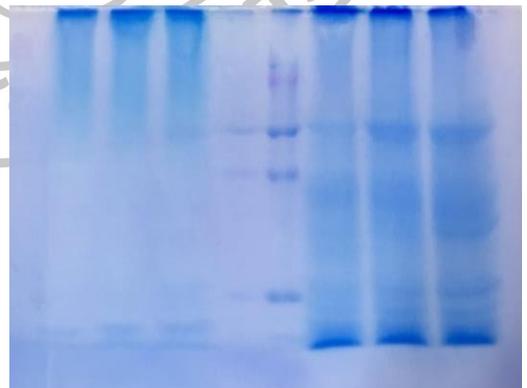
ครั้งที่ 8



ครั้งที่ 9

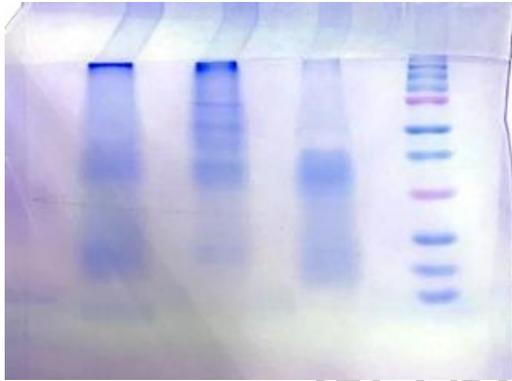


ครั้งที่ 10

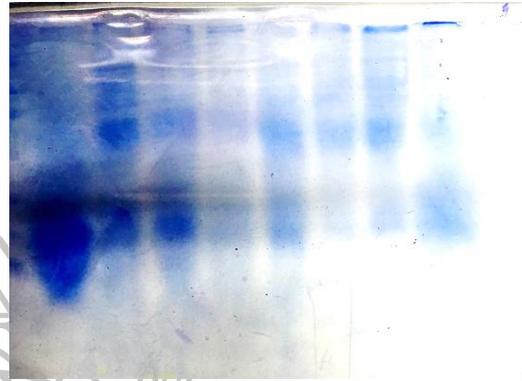


ครั้งที่ 11

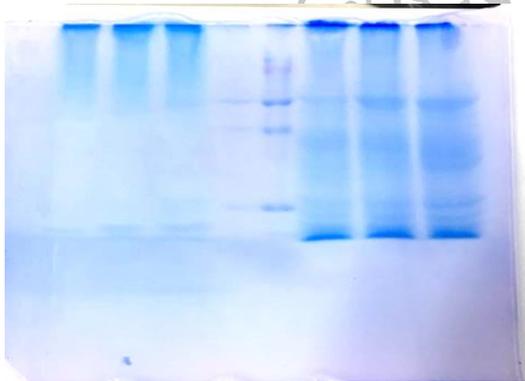
การทดลองแยกแอมป์โปรตีนโดยใช้เทคนิค Electrophoresis (ต่อ)



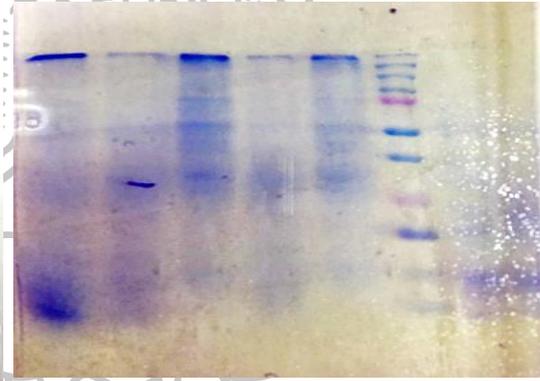
ครั้งที่ 12



ครั้งที่ 13



ครั้งที่ 14



ครั้งที่ 15



ภาคผนวก ข. 8 การย้อมดีเอ็นเอ (DNA staining)

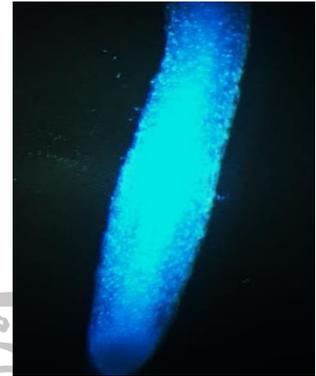
การย้อมดีเอ็นเอ เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ตรวจสอบตำแหน่งเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการยืนยันบริเวณเซลล์ในการทดสอบการย้อมด้วยสีต่างๆ การย้อม DNA เซลล์รากข้าวด้วย ให้ผลการทดลอง ดังต่อไปนี้



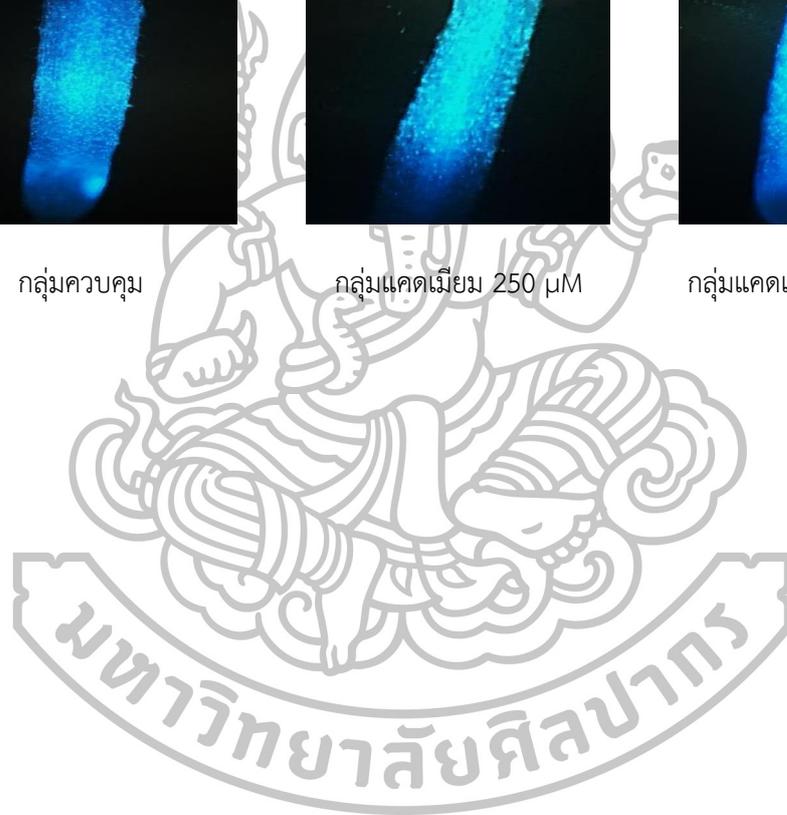
กลุ่มควบคุม



กลุ่มแคดเมียม 250 μM

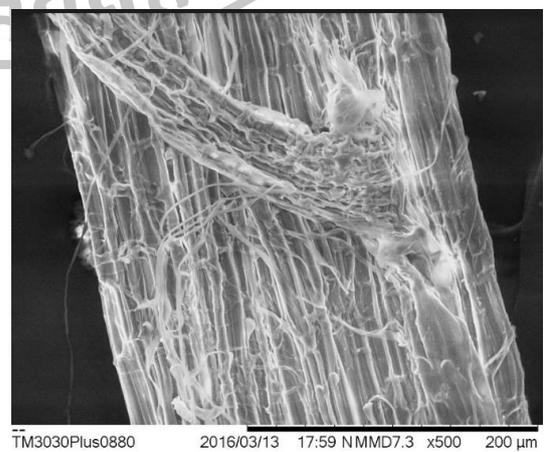
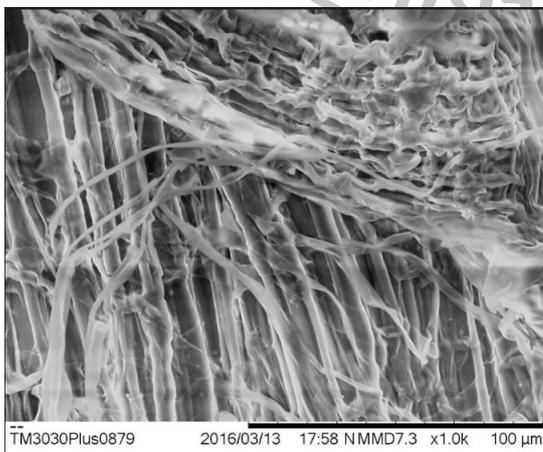
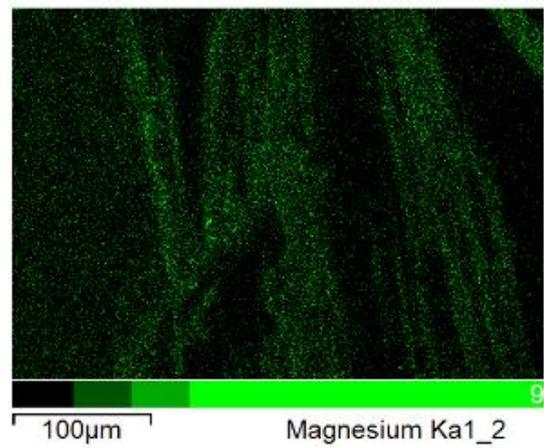
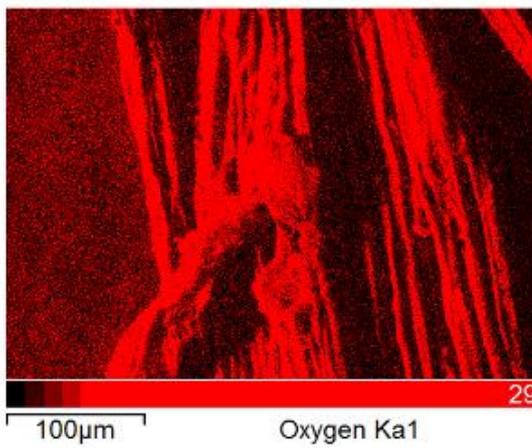
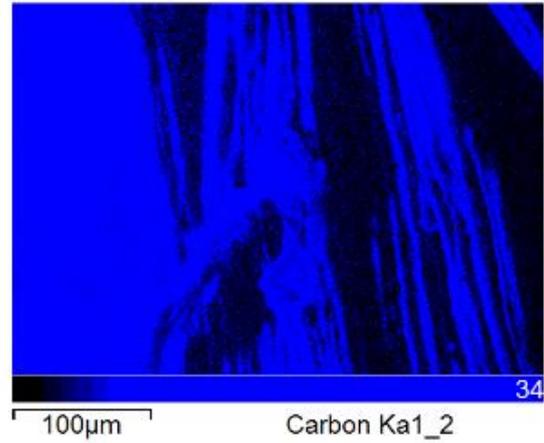
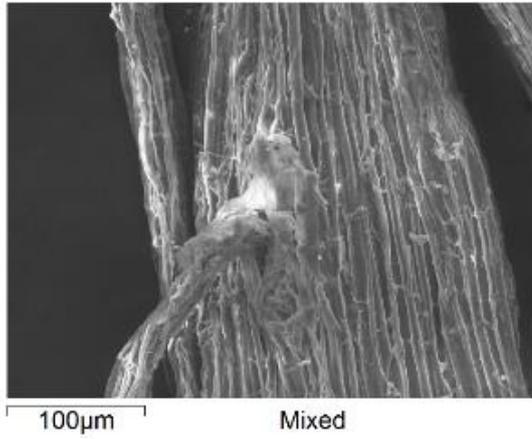


กลุ่มแคดเมียม 2500 μM

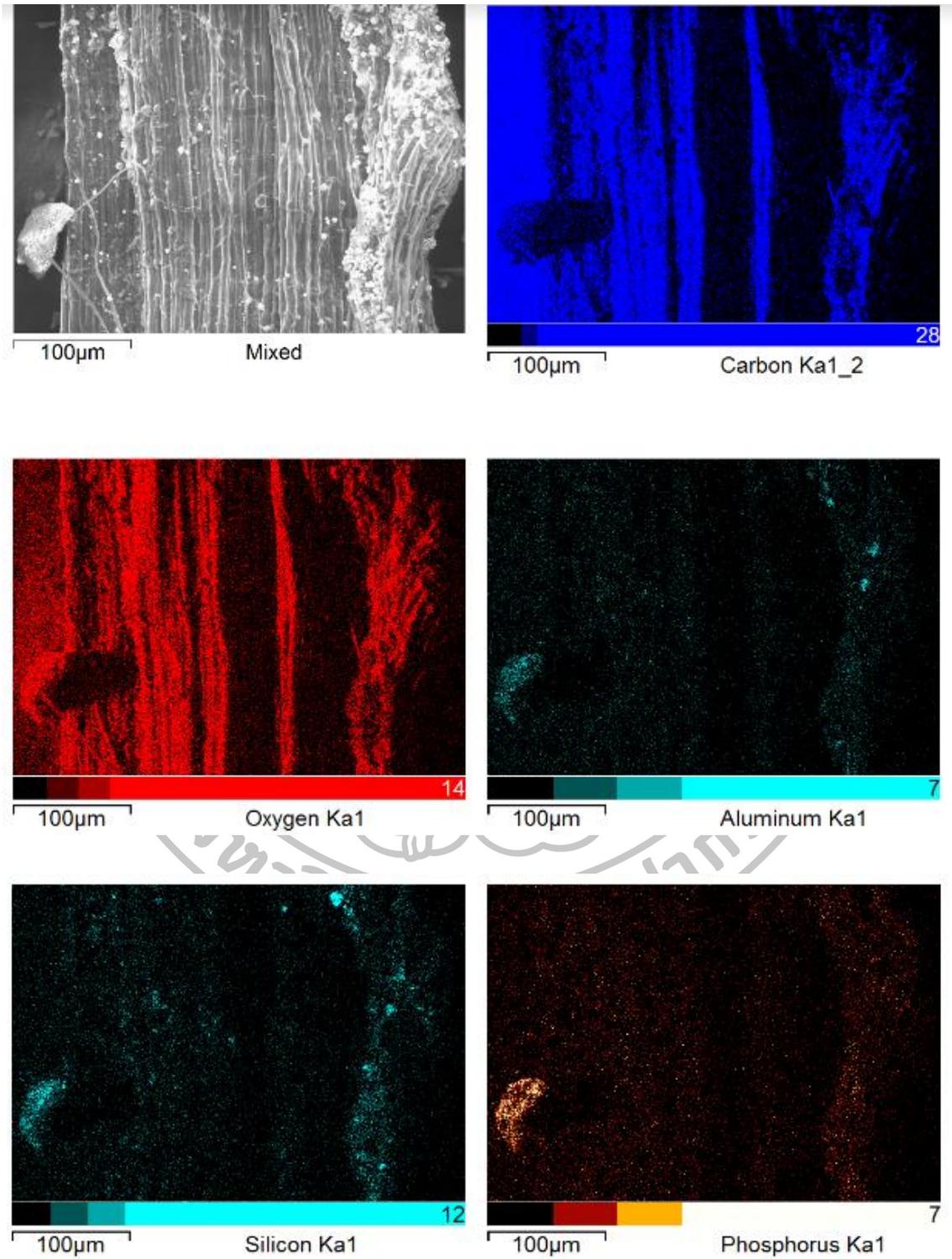


ภาคผนวก ข. 9 ลักษณะของแคดเมียมในรากข้าว

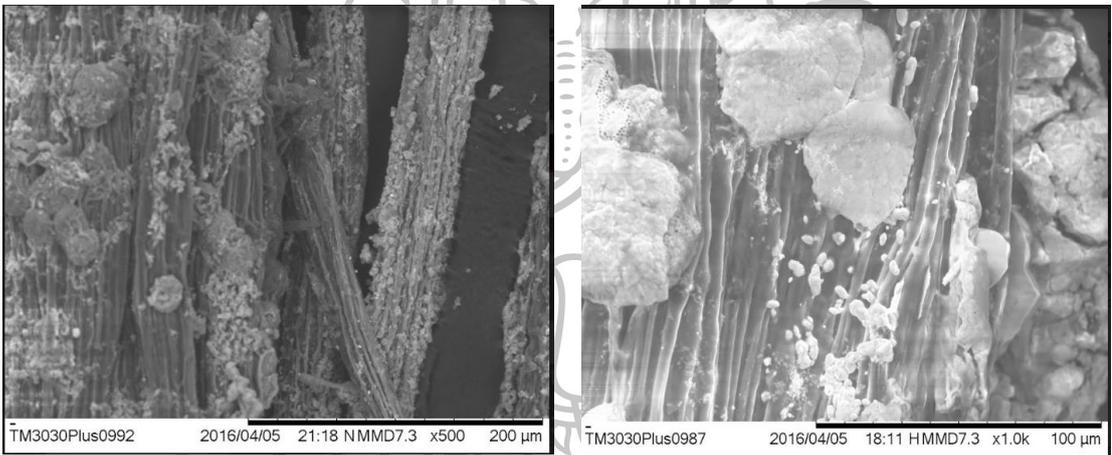
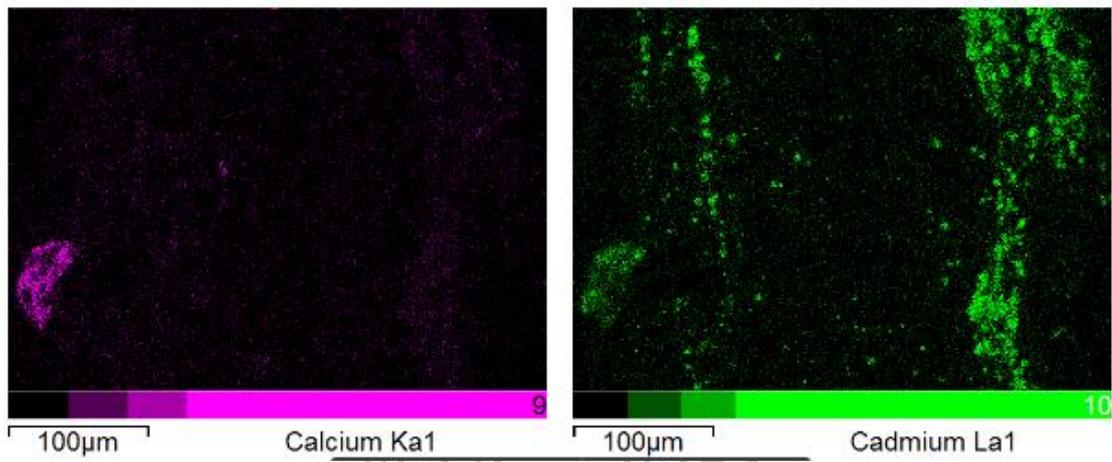
Element map กลุ่มควบคุม



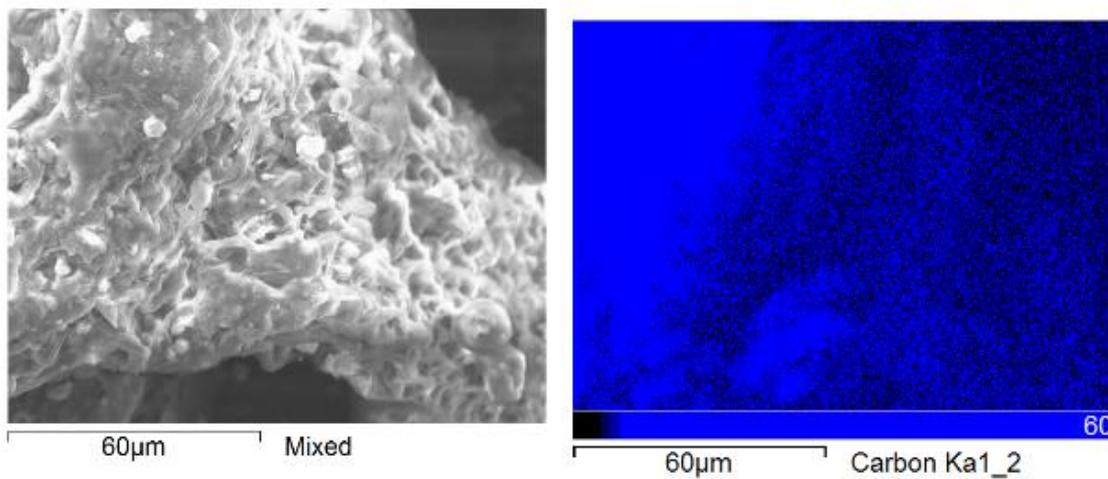
Element map กลุ่มแคดเมียม 250 μ M



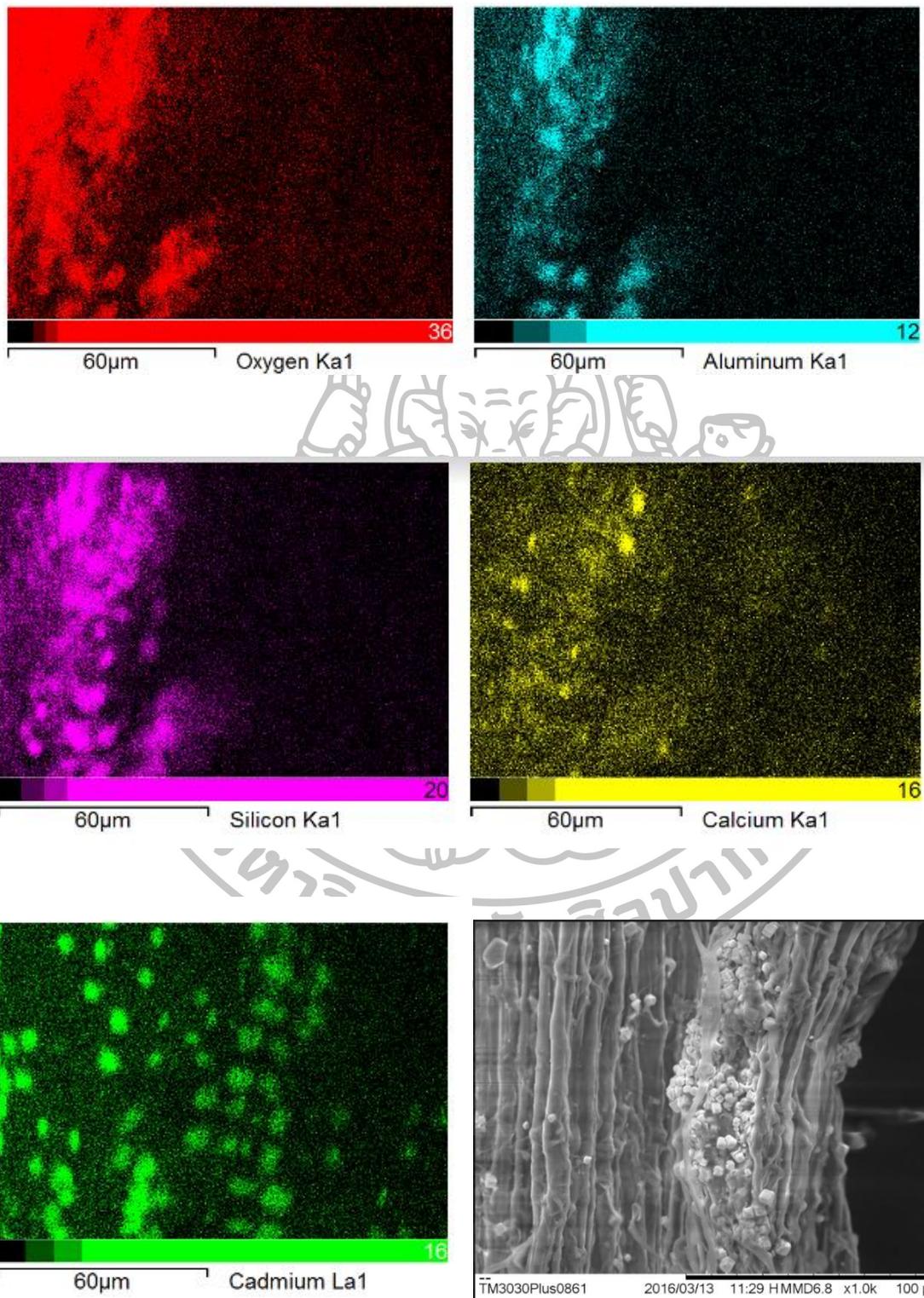
Element map กลุ่มแคดเมียม 250 μM (ต่อ)




Element map กลุ่มแคดเมียม 2500 μM




Element map กลุ่มแคดเมียม 2500 μM (ต่อ)



Element map กลุ่มแคดเมียม 2500 μM (ต่อ)



Element map กลุ่มเส้นด้ายในสารละลายแคดเมียม 2500 μM



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล ที่อยู่	นางสาวปณณิธีรา แท่งหิน เลขที่ 97 ม.3 ตำบลหนามแท่ง อำเภอศรีเมืองใหม่ จังหวัด อุบลราชธานี รหัสไปรษณีย์ 34250
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2553	สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี
พ.ศ. 2555	สำเร็จการศึกษาระดับประกาศนียบัตรวิชาชีพครู มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2557	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2555 – ปัจจุบัน	รับราชการ สังกัดโรงเรียนมัธยมด่านขุนทด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา

