



บทที่ 1

บทนำ

ความสนใจเกี่ยวกับสารมลพิษ โดยเฉพาะธาตุโลหะหนักที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของระบบนิเวศนี้ได้เริ่มมานานแล้ว สำหรับประเทศไทยนับแต่ปี พ.ศ. 2523 ประชาชนเริ่มตระหนักในความสัมพันธ์ความรับผิดชอบต่อปัญหาภาวะมลพิษดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเริ่มมีการพัฒนาอุตสาหกรรมและ เกษตรกรรมตามแผนพัฒนา เศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 5 (2525 - 2529) ซึ่งจะต้องนำโลหะหนักหลายชนิดมาใช้ในการผลิตวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีทางการเกษตร อันจะทำให้มีการปะปนเข้าสู่สภาพแวดล้อมในรูปของ ของเสีย คาร์บอน หรือ ไอพิษ เช่น สังกะสี ตะกั่ว จากอุตสาหกรรมผลิตสังกะสี ภาชนะบรรจุ ประอบจากอุตสาหกรรมผลิตพลาสติก แคลเซียม จากอุตสาหกรรมผลิตปุ๋ยฟอสเฟต เป็นต้น ในขณะที่เดียวกันจากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับอาหารในปี พ.ศ. 2525 พบว่ามีการสะสมของธาตุโลหะหนักในพืชผักและธัญพืชหลายหลากชนิด ในผลไม้บรรจุกระป๋อง ในอาหารสำเร็จรูปที่บรรจุด้วยภาชนะชนิดต่าง ๆ รวมทั้งในสัตว์ทะเลอื่น ๆ อีกหลากชนิด (วิไลลักษณ์ อิ่มอุดม, 2525) การปะปนของธาตุโลหะหนักเหล่านี้ บางชนิดพบว่าเกินกว่าระดับมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก เป็นสาเหตุให้หน่วยงานหลายฝ่ายพยายามที่จะให้มีการลดการสะสมความเป็นพิษลง และยังเป็น การกระตุ้นให้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง โลหะหนักกับสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะพืชมากยิ่งขึ้น เพื่อหวังว่าอาจจะนำมาเป็นเครื่องบ่งชี้สถานะความเป็นพิษ เช่น การศึกษาอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับพืช การศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่าง ๆ ซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่าปรากฏการณ์ที่เห็นเด่นชัดเมื่อพืชได้รับโลหะหนักคือ อาการซีดเหลืองคล้ายกับการขาดเหล็ก สภาวะดังกล่าวนี้จะสัมพันธ์กับความผิดปกติด้านอื่นของพืชอีกด้วย จากปัจจัยจำกัดหลาย ๆ ด้านในการศึกษา ทำให้เกิดแนวความคิดต่าง ๆ ต่อการอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของธาตุเหล็กในพืชที่ได้รับโลหะหนัก และยังไม่เป็นที่ยุติ

วิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกศึกษาผลของธาตุโลหะหนักบางชนิด ได้แก่ สังกะสี แคดเมียม และนิเกิลต่อพืชสองชนิด ได้แก่ ผักกาดเขียววางตุ้งและข้าว ซึ่งเป็นพืชผักและธัญพืช เศรษฐกิจที่สำคัญต่อทางโภชนาการ

#### วัตถุประสงค์ของการศึกษามีดังนี้

เพื่อศึกษาผลของแคดเมียม นิเกิลและสังกะสีในระดับความเข้มข้นน้อย ปานกลาง และมากต่อปรากฏการณ์การขาดเหล็ก และปริมาณธาตุเหล็กรูปต่าง ๆ ที่มีอยู่ในผักกาดเขียววางตุ้งและข้าว ซึ่งเป็นทางหนึ่งสำหรับการศึกษาหากลไกความเป็นพิษของโลหะหนักต่อพืช

#### การตรวจเอกสาร

แคดเมียม นิเกิล และสังกะสีเป็นธาตุโลหะหนักสามชนิดในจำนวนโลหะหนักไม่กี่ชนิด ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างรุนแรงและเกิดได้บ่อยต่อสิ่งมีชีวิตทั้งมนุษย์ สัตว์ และพืช (Foy et al, 1978)

#### บทบาทของโลหะหนักต่อพืช

##### ก. การสะสมและความทนทานของพืชต่อธาตุโลหะหนัก

พืชมีโอกาสดูดซับโลหะหนักทั้งจากดิน น้ำ และอากาศ เพราะโลหะหนักสามารถเข้าสู่พืชได้ทั้งทางราก ลำต้น และใบ (Lagerwerff & Specht, 1970; Lagerwerff, 1971; Haghiri, 1973; Iwai et al, 1975; Root et al, 1975; Lepp, 1975; Minami & Araki, 1975; Lee et al, 1976) Tuominen (1976) ศึกษากระบวนการดูดและสะสมโลหะหนักของพืชพบว่ากระบวนการที่ใช้ อาจเป็น active ion absorption หรือ passive ion absorption (Cutler & Rains, 1974; Ito & Iimura, 1976; Foy et al, 1978) กลไกการดูดแบบ passive ion diffusion อาจดูดโดยวิธี ion exchange ซึ่งเป็นแบบที่พบมากที่สุด (Brown & Slingsby, 1972; Puckett et al, 1973; Cutler & Rains, 1974; Jarvis et al, 1976; Burton et al, 1981) หรือเป็นแบบ convection หรือ mass flow (Foy et al, 1978) โดย

กลไกเกิดจากในขณะที่พืชดูดน้ำเพื่อทดแทนการคายน้ำ เมื่ออัตราการดูดออสเร็วเกินกว่าอัตรา  
 ของ convection ก็จะทำให้เกิดช่วงขาดตอนขึ้นที่บริเวณรากเกิดภาวะของ concentration  
 gradient อย่างกระชั้นชิด ทำให้โลหะหนักสามารถเคลื่อนเข้าสู่พืชได้โดยวิธีแพร่จากดินเข้าสู่  
 ราก (Barber, 1974; Cutler & Rains, 1974) ส่วนการเคลื่อนที่ของโลหะหนักจากราก  
 ไปสู่ยอดยังสรุปแน่นอนไม่ได้ แม้แต่มีรายงานเกี่ยวกับการปล่อยออสจากเซลล์รากไปสู่ไซเลม  
 (Xylem) ในระบบ symplast ก็ตาม (Cutler & Rains, 1974) Tiffin (1972,  
 1977) และ Haghiri (1973) แนะนำกระบวนการลำเลียงเป็นไปตาม chelate  
 model ซึ่งเกิดขึ้นระหว่าง chelator ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น กรดอินทรีย์หรือกรด  
 อะมิโนในน้ำเลี้ยงในไซเลม (xylem sap) ซึ่งมีมากพอในการจับกับโลหะหนัก เช่นการจับ  
 ระหว่างเหล็กกับซิเตรท (citrate) โลหะหนักบางตัวมีค่า stability constant ต่ำเมื่อจับกับ  
 chelator ใน xylem sap ทำให้เป็นปัญหาต่อการศึกษาอีก สำหรับในนิเกิลพบว่ามี  
 chelator ที่จำเพาะเจาะจงโดยเป็นสารประเภท nonaromatic polyaminopoly-  
 carboxylic acid ที่ยังไม่ได้พิสูจน์แน่นอนว่าเป็นสารอะไร (Tiffin, 1971; 1972; 1977)  
 Jarvis และคณะ (1976) พบว่ารากของพืชผักเช่น ผักกาดหอมสามารถปลดปล่อยแคดเมียมที่  
 รากดูดไว้ แล้วลำเลียงไปสู่ส่วนยอดได้ในปริมาณมาก

การสะสมโลหะหนักพบว่ามักสะสมไว้ในบริเวณรากมากที่สุด (Jones et al, 1973;  
 Iwai et al, 1975; Root et al, 1975; Ito & Iimura, 1976; Jarvis et al,  
 1976; Wallace et al, 1977; Agarwala et al, 1977; Jarvis & Jone, 1978)  
 ยกเว้นในพืชบางชนิดที่พบว่าสะสมในส่วนอื่นมากกว่า (Page et al, 1972; Bingham et al,  
 1975)

พืชบางชนิดพัฒนาความทนทานเมื่อได้รับโลหะหนัก และพืชต่างชนิดกันมีประสิทธิภาพ  
 ในการทนทานต่างกัน (Page et al, 1972; John, 1973; Bingham et al, 1975;  
 John & van Laerhoven, 1976) จากการศึกษาความทนทานของพืชต่อธาตุสังกะสีและ  
 นิเกิลพบว่าพืชพัฒนาความทนทานแบบ individual tolerance (Gregory & Bradshaw,  
 1965; Shuman & Anderson, 1976; Wainwright & Woolhouse, 1976) ส่วนใน  
 ธาตุแคดเมียมเป็นแบบ ecotypic tolerance (Simon, 1977) พูและ Bradshaw (1972)

พบว่า ecotypic tolerance เกิดขึ้นได้เร็วมาก เช่น การทนทานต่อธาตุตะกั่วของพืชที่ยืน  
 อยู่ริมถนนเป็นต้น สำหรับกลไกความทนทานนั้นอาจจะเกิดจากการที่พืชสะสมโลหะหนักจาก  
 ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ไปยังส่วนอื่นเช่น จากการศึกษาในต้น new caledonian  
 พบว่าสามารถสะสมธาตุนิเกิลไปสะสมในส่วนของ latex เพื่อป้องกันอันตรายต่อส่วนสำคัญ  
 ของพืช (Jaffre et al, 1976) Ernst (1977) และ Mathys (1973) สนับสนุนทฤษฎี  
 การรวมกลุ่มกันของสารพวกโลหะหนักหรือสารอื่น ๆ เพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายต่อระบบเรียกว่า  
 compartmentalization hypothesis โดยอธิบายว่า malate จะจับกับสังกะสี, นิเกิล  
 หรือทองแดง แล้วเก็บไว้ในส่วนของ vacuole (Szent-Gyorgyi, 1939; Brooke et al,  
 1981) ในพืชทนทานพบว่าสามารถรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ให้คงอยู่โดยไม่เป็นอันตราย  
 ทั้งนี้เพื่อรักษาไว้ซึ่งเมตาบอลิซึม (metabolism) ในจุลินทรีย์พวกรา พบว่ามีการทำให้ทอง-  
 แแดงตกตะกอนอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) แล้วปลดปล่อยซัลไฟด์ (sulphide) ออก  
 มาและเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวกนี้ยังสามารถผลิต copper binding protein ซึ่งคล้ายกับ  
 metallothioneine ในสัตว์ (Ashida, 1965; Kikuchi, 1965; Ross, 1975;  
 Naiki & Yamagata, 1976) ส่วนในแบคทีเรียพบว่าจะสามารถต่อต้านนิเกิลและทองแดงโดยการ  
 ลด activity ของ magnesium carrier ซึ่งอาจเป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่า โลหะหนัก  
 อาจจะเข้าสู่พืชโดย magnesium carrier แต่ไม่พบการจับซัลไฟด์อย่างในรา (Webb, 1970;  
 Nelson & Kennedy, 1971) ในขณะเดียวกันความสนใจเกี่ยวกับโลหะหนักกับความทนทานของ  
 จุลินทรีย์อยู่ที่บทบาทของ intranuclear metal binding protein ที่ช่วยป้องกันการรบกวน  
 ต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์เชื่อว่าเป็นกลไกทางพันธุกรรม (Silverberg et al, 1976) ส่วน  
 ในพืชยืนสูงยังเชื่อใน compartmentalization hypothesis ดังที่กล่าวข้างต้น (Foy  
et al, 1978)

#### ข. ความเป็นพิษ

Brenchley (1914) พบว่าเมื่อให้โลหะหนักแก่พืชในปริมาณมากเกินไปจะทำให้  
 เกิดความเป็นพิษต่อพืชหลายด้าน ปรากฏการณ์ที่เห็นเด่นชัดและบ่อยคือ การชะงักการเจริญ  
 เติบโตและอาการซีดเหลืองคล้ายกับการขาดเหล็ก (chlorosis) ซึ่งมีรายงานหลายฉบับต่อมา

ที่ได้ออกมาในพืชชนิดต่าง ๆ และให้ผลคล้ายคลึงกัน (Hewitt, 1948; Smith & Specht, 1953; Crooke, 1955; DeKock, 1956; Agarwala & Kumar, 1962; Foy et al, 1978) อาการขีดเหลืองที่เกิดขึ้นนี้อาจจะเป็นผลจากการลด activity ของ iron porphyrin enzyme (Weinstein & Robbins, 1955; Wallace & Clark, 1956; DeKock et al, 1960; Agarwala & Kumar, 1962; Agarwala et al, 1977; Brooks et al, 1981) อาการขีดเหลืองที่เกิดจากอิทธิพลของโลหะหนักอาจเป็นไปได้อีกกรณี คือ เกิดจากพิษของโลหะหนักยับยั้งการดูดและการลำเลียงธาตุเหล็กทำให้เกิดสภาวะการขาดเหล็กโดยตรง ซึ่งเป็นผลทางอ้อมทำให้ลดปริมาณของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll a, b) แคโรทีน (carotene) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) การลดการสร้าง non-cyclic ATP หรือลด photosynthetic electron transport capacity ใน isolated คลอโรพลาสต์ ลดสัดส่วนของปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อคลอโรพลาสต์ รวมทั้งลดสัดส่วนของโปรตีนไนโตรเจนต่อคลอโรพลาสต์และลด activity ของ RuBP carboxylase เมื่อความเข้มข้นของรงควัตถุต่าง ๆ ลดลงเป็นผลทำให้การดูดแสงลดลงตามไปด้วย และอัตราของ photosynthetic carbondioxide fixation ก็ลดลงสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อหน่วยพื้นที่ (Terry, 1980; Spiller & Terry, 1980) อิทธิพลหนึ่งอาจเกิดจากความสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างพิษของโลหะหนักกับปริมาณธาตุเหล็กในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น กับปริมาณธาตุเหล็กที่ไต่ยอดซึ่งสามารถช่วยให้พืชฟื้นตัวด้วยการเพิ่มเฟอร์รัส ซัลเฟต ( $FeSO_4$ ) เข้าทางใบ (Guest & Chapman, 1944; Hewitt, 1948; Hewitt, 1953; Chapman, 1966) เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กที่ไต่ยอดของพืชที่ได้รับโลหะหนักเกินพอ จะมีปริมาณต่ำมาก เช่น ผลที่เกิดจากราตุนิเกิล (Nicholas et al, 1957; Roth et al, 1971) หรือแคดเมียม (Haghiri, 1973) ส่วนการแคระแกร็นของต้นเป็นผลจากพิษของโลหะหนักแข่งขันกับธาตุอาหารอื่นหรือเกิดจากการยับยั้งการเจริญของราก (Bram & Fiskell, 1971; Daniel et al, 1972; Lagerwerff & Bierdsdorf, 1972; Tuner, 1973; Malone et al, 1977) สาเหตุที่ธาตุโลหะหนักเข้าแข่งขันกับธาตุอื่นก็เนื่องจากราตุอาหารอื่นเข้าสู่พืชด้วยวิธีการแพร่ (diffusion) มากกว่า convection (Barber, 1974) แต่ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมอื่น เช่น อุณหภูมิหรือความชื้นในดินอีกด้วย (Lucas & Knezek, 1972) เราพอที่จะจำแนกความเป็นพิษเฉพาะของแต่ละธาตุโลหะหนักได้ดังนี้

แคดเมียม

อาการผิดปกติเนื่องจากธาตุแคดเมียมที่สังเกตเห็นคือ เนื้อเยื่อระหว่างเส้นใบขีด เหลืองคล้ายอาการขาดเหล็ก ที่ขบบางชนิดใบบางลง ขอบใบขีดขาว ปลายใบม้วน ใบแก่ ล้าง ๆ อาจพบจุดสีน้ำตาลระหว่างเส้นใบ บางชนิดเส้นใบเป็นสีน้ำตาลแดงตลอดทั้งเส้น ทำให้เห็นแครงแครงจนบางครั้งเห็นเป็นกระจุก การเจริญของรากลดลง บางชนิดรากเน่า เปื่อย (Iwai et al, 1975; Ito & Iimura, 1976; Lee et al, 1976; Miller et al, 1976; Malone et al, 1978; Rauser, 1979) Rauser (1978) ศึกษาต้นกล้า ของ white bean พบว่าแคดเมียมทำให้สีของเส้นใบ (vein) ขีดจางลงก่อนแล้วจึงมี ผลต่อก้านใบ (petiole) จนถึงส่วนของลำต้นตามลำดับ นอกจากนี้แคดเมียมที่ทำให้ เกิดอาการขีดเหลืองนั้นพบว่าอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของธาตุเหล็กและธาตุ สังกะสีทำให้อัตราส่วนเพิ่มสูงขึ้นดัง เช่นที่พบในข้าวโพด (Root et al, 1975) ซึ่งสาเหตุ ดังกล่าวอาจเกิดจากแคดเมียมเป็นตัวขัดขวางการดูดและการลำเลียงสังกะสี ทำให้ธาตุสังกะสี ขาดแคลนแล้วรบกวนต่อกลไกการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Hawf & Schmid, 1967; Vesik et al, 1966) นอกจากนี้แคดเมียมยังชักนำให้เกิดรงควัตถุสีม่วงของแอนโทไซยานิน (antho- cyanin pigment) ขึ้นที่บริเวณของ pulvinus ของใบตัวเหลือง (Chaney et al, 1976) และยังทำให้ลำต้นบัว red kidney bean เกิดการม้วนงอ (Imai & Siegel, 1973) แคดเมียมมีผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงบางขั้นตอน (Hamp et al, 1976; Bazzaz et al, 1974 a, b) ยับยั้งเอนไซม์ในระบบต่าง ๆ มากมาย (Vallee & Ulmer, 1972; Page et al, 1972) การยับยั้งการสังเคราะห์แสงอาจจะเป็นผลทางอ้อมที่แคดเมียมทำให้ ใบเกิด diffusive resistance ต่อการเคลื่อนย้ายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเพิ่มขึ้น หรือลดการคายน้ำโดยทำให้ปากใบปิด (Bazzaz, 1974; Lamoroux & Chaney, 1978) แคดเมียมทำให้เพิ่มการละลายแมงในคลอโรพลาสต์และเซลล์คลอโรพลาสต์ จะมีผนังเซลล์หนา- ขึ้น (Simola, 1977) นอกจากนี้ยังยับยั้งโดยตรงต่อตำแหน่งที่ให้ออกซิเจนใน photosys- tem II (Bazzaz & Govindjee, 1974) ลด non-cyclic photophosphorylation, ลดปริมาณคลอโรฟิลล์, carotenoid ทำให้โครงสร้างของคลอโรพลาสต์ผิดปกติ (Baszynki, 1980)

ผลของแคดเมียมยังกระทบกระเทือนต่อเมตาโบลิซึมของพืช เช่น กระบวนการหายใจ (Fluharty & Samadi, 1962; Lamorea & Chaney, 1978) โดยไปมีผลต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนตรงตำแหน่ง cytochrome b complex, ยังยับยั้งออกซิเดชันของ succinate หรือ malate และ pyruvate ในไมโทคอนเดรีย (Koeppel & Miller, 1970; Miller et al, 1970; Miller et al, 1973) ยับยั้งการหายใจของเรณูของสน (Pinus resinosa) โดยไปมีผลต่อการแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange) ทำให้การปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลดลงน้อยกว่าการรับก๊าซออกซิเจน เป็นผลให้ RQ ลดลง (Strickland & Chaney, 1979) ซึ่ง Hellmers และ Machlis (1956) พบว่า RQ ที่ลดต่ำลงนี้สัมพันธ์กับปฏิกิริยา carboxylation มากกว่าการ oxidation ในไขมัน (lipid) และยังมีผลยับยั้ง nitrogen fixation (Huang et al, 1974) โดยยับยั้ง nitrogenase activity และ nitrate reductase activity (Wichliff et al, 1980) ในระบบเอนไซม์, แคดเมียมมี affinity ต่อสารพวก Thiol group (-SH) ซึ่งเป็น active site ของเอนไซม์และโปรตีนหลายชนิด ทำให้เอนไซม์สูญเสีย activity หรือเสียดสภาพโปรตีน (Schroeder et al, 1967) การที่แคดเมียมไปมีผลต่อสรีรวิทยาที่จัดเป็นกระบวนการวิกฤติต่อภาวะการเจริญปกติของพืชเป็นผลทำให้การเจริญและการพัฒนาหยุดชะงัก

### นิเกิล

นิเกิลทำให้พืชเกิดอาการซีดเหลือง (chlorosis) และการตายของเนื้อเยื่อ (necrosis) ได้เช่นเดียวกันโดยอาจจะเป็นแบบการซีดเหลืองระหว่างเส้นใบ (interveinal chlorosis) หรือทั้งแผ่นใบอย่างสม่ำเสมอ (diffuse chlorosis) (Hunter & Vernano, 1953; Anderson et al, 1972) พืชบางชนิดเช่นข้าวโอ๊ตนิเกิลทำให้เนื้อเยื่อระหว่างเส้นใบมีสีซีดขาว ส่วนบริเวณใกล้เส้นใบมีสีเขียวเข้มซึ่งทำให้เห็นเป็นแถบเขียว - ขาว สลับกันไปแบบ banding symptom (Crooke et al, 1954; Anderson et al, 1973; Iizuka, 1975; Hara et al, 1976) ในบริเวณของใบที่มีแถบซีดเหลืองพบว่าปริมาณธาตุเหล็กต่ำกว่าบริเวณสีเขียว (Hunter & Vernano, 1953) chlorosis ที่เกิดเนื่องจากนิเกิลอาจจะไม่สัมพันธ์กับปริมาณธาตุเหล็กหรือนิเกิลในพืช แต่ไปมีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนระหว่างนิเกิลและเหล็ก

ในพืชมากกว่า (Crooke, 1955) นิเกิลยังมีผลยับยั้งการลำเลียงเหล็กจากรากไปสู่ยอด (Lingle et al, 1963; Wallace & DeKock, 1966; Chaney, 1970)

Anderson และคณะ (1979) ศึกษาในข้าวโอ๊ต (Avena byzantina) พบว่าเมื่อพืชสะสมธาตุนิเกิลมากจะมีปริมาณ protochlorophyll สูง ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำรวมทั้งปริมาณโปรตีนก็ลดต่ำลง (Agarwala et al, 1977) นิเกิลมีผลรบกวนเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ทำให้เกิดการสะสมน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) และแป้งในส่วนของใบที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสังเคราะห์ (source), ทำให้อาหารสังเคราะห์ (photoassimilate) ที่ส่งไปยังส่วนอื่นของต้น (sink) ลดลง ซึ่งเท่ากับเป็นการยับยั้งการลำเลียงของสารอาหารที่สังเคราะห์ขึ้นไปในเวลาเดียวกันและการสะสมของสารอาหารดังกล่าวทำให้เกิดผลยับยั้งย้อนกลับ (feedback inhibition) ต่อการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$  - fixation) ของกลไกการแลกเปลี่ยนก๊าซ เป็นผลให้การเจริญเติบโตถูกยับยั้งในเวลาต่อมา (Nafziger & Koller, 1976; Samarakoon & Rauser, 1979) และยังทำให้เพิ่มการสะสมสาร callose ที่ sieve plate ของ phloem แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่ม callose ในก้านใบ (petiole) กับการยับยั้งการลำเลียงสารอาหารผ่านเนื้อเยื่อ phloem ของก้านใบดังกล่าว (Rauser & Samarakoon, 1980)

ในระบบเอนไซม์, นิเกิลยับยั้ง activity ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น isocitrate-dehydrogenase, malate dehydrogenase, nitrate reductase, glucose-6-P dehydrogenase, peptidase เป็นต้น และช่วยกระตุ้น activity ของ peroxidase, aldolase, 1, 3-glycerophosphatase และ ribonuclease (DeKock et al, 1960; Agarwala et al, 1977) Agarwala และคณะ (1977) ศึกษาในข้าวบาร์เลย์พบว่าปริมาณธาตุเหล็กในใบที่เกิด chlorosis อย่างรุนแรงไม่แตกต่างจากต้นปกติ (control) ในขณะที่บางรายงานพบว่าปริมาณธาตุเหล็กลดต่ำลงมาก (Roth et al, 1971) นิเกิลยังมีผลต่อการยับยั้งระบบการหายใจ โดยยับยั้งการ coupling  $\text{ADP}:\text{O}_2$  หรือเรียกได้ว่านิเกิลทำหน้าที่เป็น uncoupling agent ต่อ oxidative phosphorylation นิเกิลยังมีผลยับยั้ง activity ของเอนไซม์ ascorbic acid oxidase, polyphenol oxidase,  $\beta$  amylase ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบการหายใจแต่ความรุนแรงยังน้อยกว่าอิทธิพล



ของแคดเมียมและสังกะสี (Bittell et al, 1974; Kastori et al, 1978) รวมทั้งการยับยั้งการสังเคราะห์แสง, การคายน้ำโดยไปมีผลต่อการทำงานของปากใบเช่นเดียวกับธาตุแคดเมียม (Bazzaz et al, 1974 a) การยับยั้งเอนไซม์ใน citric acid cycle (Brooke, 1981) ถึงแม้พืชจะมีกลไกจับนิเกิลให้อยู่ใน vacuole ช่วยป้องกันไม่ให้เข้าไปสู่ระบบเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย ก็ยังอาจจะเข้าไปได้เมื่อเกิดการแตกของ vacuole ออกจากเซลล์เพราะยากที่จะขับออกได้หมด

Polacco (1977) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแก้วเหลืองเมื่อให้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (N-source) กลับพบว่านิเกิลซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำ ( $5 \times 10^{-5} M$ ) ส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อของพืช เขาเชื่อว่านิเกิลเป็นธาตุจำเป็นต่อการเปลี่ยนยูเรียเป็นหมู่ธาตุแอมโมเนียม ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและมีรายงานสนับสนุนที่ศึกษาในแทน (Lemna paucicostata strain 6746) โดยเปรียบเทียบระหว่างการให้ยูเรียหรือยูเรียร่วมกับนิเกิลหรือไนเตรต หรือแอมโมเนียม อย่างใดอย่างหนึ่งในตัวกลางสารอาหาร ZES แล้ววัด curve การปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใน 24 ชั่วโมงสัมพันธ์กับการให้แสง 15 นาที เป็นช่วง ๆ พบว่าเมื่อให้ยูเรียร่วมกับนิเกิลจะมี peak ของ curve เป็น 2 peak เช่นเดียวกับเมื่อให้ไนเตรตหรือแอมโมเนียมซึ่งต่างกับ ถ้าให้เฉพาะยูเรียพบว่าปรากฏเพียง peak เดียว และมีค่าต่ำมาก แต่ผลการทดลองนี้ก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกของนิเกิลที่มีต่อเมตาโบลิซึมของยูเรียให้ชัดเจนไปกว่าที่ Polacco ได้เสนอไว้ในตอนต้น และยังอยู่ในระหว่างการศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ ต่อไปอีก (Gordon et al, 1978)

### สังกะสี

โดยเหตุที่สังกะสีเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต มีบทบาทสำคัญต่อการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ เช่น carbonic anhydase เป็นต้น และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ในระบบเอนไซม์หลายชนิด (Clarkson & Hanson, 1980) ฉะนั้นเมื่อเกิดการขาดธาตุสังกะสีไม่ว่าจะด้วยสาเหตุโดยตรงหรือทางอ้อมย่อมส่งผลกระทบต่อ activity ของเอนไซม์ที่มีสังกะสีเป็นส่วนประกอบ ยับยั้งการพัฒนาคลอโรพลาสต์, nucleic acid และลดปริมาณโปรตีน

ในทางกลับกันถ้าสังกะสีมีปริมาณเกินความต้องการมีผลทำให้พืชไม่สามารถสะสมธาตุเหล็กจากรากไปสู่ต้นได้ ซึ่ง Ambler และคณะ (1970) ได้ศึกษามลของสังกะสีต่อการสะสมธาตุเหล็กในแก้วเหลือง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสังกะสีในสารละลายธาตุอาหาร ทำให้ลดความเข้มข้นของธาตุเหล็กในส่วนของน้ำเลี้ยงของต้น (stem exudate) นอกจากนี้จำนวนสารรีดิวส์ (reductant) ภายในรากและที่ปลดปล่อยสู่สารละลายธาตุอาหารลดลง เช่นเดียวกับในน้ำเลี้ยงของต้น การลดลงของ reductant ในส่วนของราก พบว่าระหว่างบริเวณของการยืดตัว (elongation) และบริเวณที่เจริญเต็มที่ (maturation) ของรากปริมาณธาตุเหล็กลดลงอย่างชัดเจนซึ่งตำแหน่งนี้มีกลุ่มเซลล์ที่มีประสิทธิภาพต่อการดูดธาตุเหล็กมาก เขาสรุปว่าสังกะสีเข้าไปยับยั้งการสร้าง reductant ที่เซลล์ราก แล้วมีผลต่อการดูดและต่อปัสย์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมธาตุเหล็กภายในต้น นอกจากนี้ผลต่อกลไกดังกล่าวแล้ว สังกะสียังส่งเสริมการสะสมของธาตุแมงกานีสไปสู่ส่วนของยอดมากขึ้น แล้วธาตุทั้งสองจึงเข้าไปรบกวนต่อการนำธาตุเหล็กไปใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ยิ่งกว่านั้นสังกะสียังเป็นธาตุที่ยกนมาให้พืชเกิดอาการผิดปกติจากราตุแมงกานีสที่มากเกินไปกดติดตามไปด้วย โดยทำให้ใบมีลักษณะหงิกงอ ม้วน (crinkle leaf) ส่วนผลของสังกะสีเองโดยตรงทำให้เกิดอาการชดเหลืองจนกระทั่งเกิดการตายของเนื้อเยื่อ (necrosis) (Adam & Wear, 1957; White et al., 1974; Krause & Kaiser, 1977)

Rosen และคณะ (1977) ได้รายงานการศึกษาในข้าวโพดพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของธาตุเหล็กให้สูงกว่าปกติ (1.4 ppm. เป็น 100 - 150 ppm.) ในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของสังกะสีในระดับสูงจากปกติ (0.01 ppm. เป็น 10 - 100 ppm.) สามารถลดความรุนแรงของธาตุสังกะสีได้บ้างแต่ไม่หมด เพราะพบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น (shoot) ยังลดลงแตกต่างจากต้นปกติ (Pinkerton & Simpson, 1977) สำเหตุนี้เขาคิดว่า เกิดจากสังกะสีเข้าไปมีผลต่อกลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเจริญที่ไม่มีเหล็กเป็นบทบาทสำคัญ และเมื่อเขาพิจารณาปริมาณธาตุเหล็กภายในส่วนของรากกลับพบว่าค่าใกล้เคียงกับต้นปกติ ในขณะที่ปริมาณธาตุเหล็กในใบลดลงเพียงเล็กน้อย เช่นเดียวกับที่ Giordano และ Mortvedt (1971) ได้ทดลองกับพืชชนิดเดียวกันและให้ผลเหมือนกัน ทำให้ Rosen เชื่อว่าสังกะสีไม่มีผลต่อการขัดขวางการดูดธาตุเหล็กแต่มีผลบ้างเล็กน้อยต่อการสะสม ทั้งนี้อาจจะเกิดจากการแข่งขันกันกับตัวนำพา (carrier) ในระหว่างการสะสม ส่วนการลดลงของปริมาณ

คลอโรฟิลล์ที่เกิดจากผลของธาตุสังกะสีเมื่อความเข้มข้นของธาตุเหล็กมีค่าปกติซึ่งเขาได้เล่นขสมมติฐานการรบกวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ดังกล่าวภายใต้พื้นฐานการพิจารณาถึงรูปของธาตุเหล็กที่นำไปใช้ได้ว่า

1. มีการแข่งขันกันระหว่างธาตุเหล็กและธาตุสังกะสีเพื่อจับกับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ซึ่งมีธาตุเหล็กเป็น cofactor เช่น coprogen oxidase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน coproporphyrinogen เป็น protoporphyrinogen (Lingle et al, 1963)

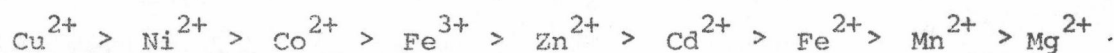
2. สังกะสีมีอิทธิพลต่ออัตราส่วนของธาตุเหล็กในรูป ferrous ion ( $Fe^{2+}$ ) ferric ion ( $Fe^{3+}$ ) ในพืชโดยเป็นตัวหมักเร่งการเปลี่ยนรูปของธาตุเหล็กจาก  $Fe^{3+}$  เป็น  $Fe^{2+}$  ซึ่งเป็นรูปที่พืชนำไปใช้สร้างคลอโรฟิลล์

อย่างไรก็ตามหลายการทดลองที่ทำกับถั่วเหลืองและ navy bean ที่ปลูกในสภาพสารละลายเช่นกันกลับพบว่า ธาตุสังกะสีที่ความเข้มข้นสูงขัดขวางการดูดและหรือการลำเลียงของธาตุเหล็ก ทำให้ปริมาณธาตุเหล็กในใบลดลง (Lingle et al, 1963; Polson & Adams, 1970; Ambler et al, 1970)

สำหรับการละลายของธาตุสังกะสีพบว่าละลายอยู่ในผนังเซลล์และไซโตพลาสซึมของเซลล์ราก, ในเนื้อเยื่อของใบพืชหลายชนิดและจับกับ nucleoprotein หรือโปรตีนในไซโตพลาสซึม (Rauser, 1972) รวมทั้งยังมีผลยับยั้งเอนไซม์ peroxidase (Mathys, 1977) สังกะสีในระดับความเข้มข้นสูงยังมีผลลดการคายน้ำในถั่ว bean แต่ไม่มีผลกับถั่วเหลือง (Rauser, 1973)

นอกจากแคดเมียม นิเกิล และสังกะสี ที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่าง ๆ ของพืชดังกล่าวข้างต้นแล้ว ธาตุโลหะหนักอื่น ๆ ที่มิได้กล่าวถึง ถ้ามีการปะปนเข้าสู่สภาพแวดล้อมก็ย่อมก่อให้เกิดปัญหาได้เช่นกัน โดยพบว่าความรุนแรงของโลหะหนักแต่ละธาตุและตำแหน่งที่ก่อให้เกิดพิษกับสิ่งมีชีวิตย่อมแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่าของ stability constant ของธาตุโลหะหนักกับชนิดของตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor หรือ ligand) ที่จับ รวมทั้งยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ขั้นตอนการพัฒนาและปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ

Mellor และ Melley (1948) ได้กำหนด stability constant ของธาตุโลหะหนัก ตามความล้ามากรค่าเฉพาะในการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะหนักกับสารอินทรีย์และ ได้ลำดับค่าดังกล่าวจากค่ามากไปหาน้อยดังนี้



อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาความรุนแรงของธาตุโลหะหนักตามการตอบสนองของพืช เช่น อาการขีดเหลืองหรือการลดลงของน้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง พบว่าลำดับความรุนแรงของธาตุโลหะหนักแตกต่างไปจากเกณฑ์ที่พิจารณาจากค่า stability constant ข้างต้น (ตารางที่ 1) ซึ่งเห็นได้ชัดว่าขึ้นอยู่กับชนิดและการตอบสนองของพืชรวมทั้งภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกพืชอีกด้วย

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นจากธาตุโลหะหนักทั้งสามที่มีต่อพืชชนิดต่าง ๆ ที่พบว่าเกิดขึ้นได้บ่อยและลักษณะคล้ายกันคือ อาการขีดเหลืองที่คล้ายกับการขาดธาตุเหล็กเช่นเดียวกับที่ Brenchley และนักวิทยาศาสตร์คนอื่น ๆ ได้กล่าวไว้ตั้งแต่ต้น แต่อาการขีดเหลืองที่ปรากฏก็เห็นได้ชัดอีกว่าเป็นผลจากการที่โลหะหนักไปมีผลทางอ้อมต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของธาตุเหล็กภายในพืชมากกว่าผลที่เกิดจากผลของโลหะหนักโดยตรง ทั้งนี้กลไกอาจจะมีผลต่อปริมาณหรือรูปของธาตุเหล็กที่นำไปใช้ได้แล้วจึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาโบลิซึมที่นำไปสู่ความผิดปกติทางด้านสรีรวิทยา และการชะงักการเจริญเติบโตในเวลาต่อมา เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าธาตุเหล็กจัดเป็นธาตุอาหารที่สำคัญเป็นต่อสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติทางเคมีของธาตุเหล็กพบว่าเมื่ออยู่ในสภาพละลายจะมีค่า oxidation state ได้ 2 ค่า คือ  $\text{Fe}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{3+}$  โดย  $\text{Fe}^{2+}$  มักจะถูกออกซิไดซ์เป็น  $\text{Fe}^{3+}$  เมื่อมี chelate ion เช่น citrate เป็นต้น (Aisen, 1976) เนื่องจาก  $\text{Fe}^{3+}$  เป็น strong electrophile ทำให้สามารถสร้างสารประกอบกับ ligand ทำให้ไม่เคลื่อนที่หรือเกิดการตกตะกอนกับ ligand ที่เป็นฟอสเฟตหรือไฮดรอกไซด์ ส่วน  $\text{Fe}^{2+}$  มักจะถูกจับด้วย chelator ที่เป็น N-donor สร้างเป็นสารเชิงซ้อนแต่ที่สุดท้ายก็ถูกออกซิไดซ์เป็นสารประกอบ  $\text{Fe}^{3+}$  (Buckingham, 1973) Moore (1972) เชื่อว่า  $\text{Fe}^{2+}$  เป็นรูปที่พืชต้องการและจำเป็นต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมและจะ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับความรุนแรงของธาตุโลหะหนักต่าง ๆ ต่อพืช

species	order of severity	determination	reference
oat	$Ni^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Cr^{3+} > Zn^{2+} > Mo^{2+} > Mn^{2+}$	chlorosis	Hunter & Vergnano, 1953
sugar-beet etc.	$Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > CrO_4^{2-} > Zn^{2+} > Cr^{3+} > Mn^{2+}$	chlorosis	Hewitt, 1951
mustard	$Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Cr^{3+} > Mn^{2+}$	fresh weight &	DeKock, 1956
barley	$Ni^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+}$	chlorosis	Agarwala <u>et al.</u> , 1977
barley	$Ni^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Cu^{2+}$	dry matter	Agarwala <u>et al.</u> , 1977
White bean	$Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$	dry mater & chlorosis	Rauser, 1977
cabbage	$Co^{2+}, Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+} > Sr^{2+}$	dry mater & chlorosis	จ.โลภรณ์ บุญญกิจจินดา, 2523

ถูกพืชดูดเข้าไปในรูปดังกล่าวด้วย เมื่อ  $Fe^{2+}$  เข้าสู่ต้นแล้วจะถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็น  $Fe^{3+}$  แล้วถูกลำเลียงไปยังส่วนของใบ ในรูป anionic citrate chelate (Tiffin, 1972) โดยสะสมในรูปของ ferric phosphoprotein หรือ phytoferritin (Hyde et al, 1963) ซึ่งเป็น iron-storage protein. ferritin ที่สังเคราะห์เป็นโพรงแบ่งเป็นชั้น ๆ หนาประมาณ 4500 อะตอม ซึ่งพบได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Munro & Linder, 1978) ในรา (David & Easterbrook, 1971) และในแบคทีเรีย (Stiefel & Watt, 1979) Hyde และคณะ (1963) เสนอว่าธาตุเหล็กจะถูกละลายในรูปของ phytoferritin ( $Fe^{3+}$ ) เพื่อเตรียมสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยจะต้องมี reducing เอนไซม์หรือระบบ redox ภายในต้นพืชเปลี่ยน  $Fe^{3+}$  เป็น  $Fe^{2+}$  เสียก่อน (Hughes, 1972; Hall et al, 1974; Ochiai, 1977) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชี้ชัดว่า phytoferritin granule ปรากฏอยู่ที่ใบเลี้ยงของถั่ว (Phaseolus vulgaris) ในส่วนของเมทิส (plastid) ที่กำลังพัฒนาและที่กำลังสลายตัว (Robards & Robinson, 1968; Barton, 1970; Whatley, 1977) และบางรายงานยังพบว่าปริมาณของธาตุเหล็กในใบที่เก็บไว้ในที่มืดนั้น 50 เปอร์เซ็นต์พบสะสมอยู่ใน ferritin และเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวจะลดลงเมื่อนำใบที่อยู่ในที่มืดมารับแสงหรือใบที่ได้รับแสงอยู่สม่ำเสมอ มีการลำเลียงเหล็กจากส่วนของใบเลี้ยงไปสู่ส่วนของอวัยวะที่กำลังพัฒนาโดยสัมพันธ์กับความต้องการวิกฤติที่จะใช้ธาตุเหล็กดังกล่าว ferritin จึงทำหน้าที่คล้ายกับเป็นแหล่งควบคุมการเก็บสะสมและการนำไปใช้ของธาตุเหล็กภายในพืช (Mark et al, 1981)

บทบาทของธาตุเหล็กที่สำคัญคือ การเข้าไปเป็นส่วนประกอบสำคัญในรูป biological redox reaction ในฮีม (heme) และ non heme protein, iron metalloprotein เช่นในเอนไซม์ dehydrogenase หรือเป็น reducing agent เช่น Fe-S protein และ ferridoxin เป็นตัวรับส่งอิเล็กตรอนในระบบของ cytochrome b, c เป็น oxidase ใน cytochrome oxidase peroxidase และ catalase (Clarkson & Hanson, 1980) และรูปของธาตุเหล็กที่ใช้ได้ในระบบ redox reaction ไม่ว่าจะในคลอโรพลาสต์, ไมโทคอนเดรียหรือ peroxisome ล้วนแต่เป็นเหล็กในรูป active iron ( $Fe^{2+}$ ) (Price, 1968; Rains, 1976) ที่ศึกษากันมากได้แก่ aconitase ซึ่ง  $Fe^{2+}$

สับอยู่ กับ citrate และเอนไซม์ในลุ่ม catalytic site (Villafranca, 1974; Rains, 1976)

Baumeister (1958) พบว่าพืชต้องการธาตุเหล็กในการรักษาความเขียว ในขณะที่พืชขาดธาตุเหล็ก, ปริมาณโปรตีนก็ต่ำลงด้วย จึงเชื่อว่าเหล็กมีส่วนเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาขั้นต้นของเมตาโบลิซึมของโปรตีน การขาดเหล็กทำให้คลอโรฟิลล์ไม่เสถียร จากการศึกษาในแบคทีเรีย chlorophyll mutant xantha 5 ของต้นมะเขือเทศ พบว่าถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (media) มีค่า oxidation potential ต่ำ สามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ถึง 5 - 10 เท่า เชื่อว่าเป็นการกระตุ้นธาตุเหล็กให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Machold & Stephan, 1969) นั้นหมายถึงการเปลี่ยนรูปของธาตุเหล็กจาก  $Fe^{3+}$  เป็น  $Fe^{2+}$  (Katyal & Sharma, 1980) Machold (1969) ศึกษาในแบคทีเรียชนิดเดิมแล้ว incubate ด้วย succinate-1, 4- $^{14}C$  และ glycine-2- $^{14}C$  พบว่า mutant type สะสม  $\delta$ -aminolaevulinic acid ( $\delta$ -ALA) ได้ในปริมาณมากกว่าพวกปกติ รวมทั้งปริมาณของ coproporphyrin (COPRO) ด้วย แต่เมื่อพิจารณา protoporphyrin กลับพบผลตรงกันข้าม และเมื่อใช้ redox potential พร้อมกับกระตุ้น (activate) ธาตุเหล็ก พบว่าใน mutant type สามารถเปลี่ยน COPRO ไปสู่ PROTO และเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์มากขึ้นเช่นเดียวกับที่พบผลที่ทำในจุลินทรีย์อื่น ๆ (Machold, 1969) หรือในพืชชั้นสูง (Hsu Miller, 1965) แต่ Beale, (1978) แย้งว่า ALA ที่เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์ tetrapyrrole, ถ้าในเนื้อเยื่อสีเขียวของใบพืชชั้นสูง และในลำห่วยบางชนิดจะถูกสร้างขึ้นจากโครงสร้างของคาร์บอนทั้งหมดของ glutamate หรือ  $\alpha$ -ketoglutarate มากกว่าที่สร้างขึ้นจาก glycine และ succinyl CoA อย่างที่เกิดในเนื้อเยื่อสัตว์หรือแบคทีเรียที่ Machold ได้เสนอไว้

ความสนใจเกี่ยวกับธาตุเหล็กภายในพืชที่เกิดอาการขีดเหลืองได้เน้นมาที่ธาตุเหล็กที่อยู่ในสถานะไม่เคลื่อนที่ (immobilization) หรือเฉื่อยต่อปฏิกิริยา (inactivation) (Jacobson, 1945) หลายการทดลองชี้ให้เห็นว่าเคราะห์เกี่ยวกับปริมาณธาตุเหล็กทั้งหมด (total iron) ปริมาณของรูปที่นำไปใช้ได้ (active iron) และรูปที่นำไปใช้ไม่ได้ (inactive iron) Oserkowsky (1933) ได้สกัดผงใบพืชแห้งด้วยกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์แมล แล้วนำ acid soluble iron ที่ได้เทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรงตัดกับแกน y ที่จุดต่ำ

011147

กว่าจุดเริ่มต้นจึงสรุปว่า ปริมาณธาตุเหล็กที่เป็นผลต่างระหว่างปริมาณ acid soluble iron กับปริมาณเหล็กที่ curve ตัดกับแกน x คือ active iron เช่นเดียวกับที่ Bolle-Jones (1955) เสนอว่า active iron หมายถึงปริมาณธาตุเหล็กที่สกัดจากใบพืชสดด้วย ส่วนผสมระหว่างกรดเกลือความเข้มข้น 10 นอร์แมลกับอีเทอร์อิ่มตัว และพบว่า active iron ที่ได้ตามวิธีทั้งสองนี้หมายถึงธาตุเหล็กที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยตรง (Jacobson, 1945; DeKock et al, 1979)

ในปี 1898 Blau ได้ค้นพบสารเคมี 1-10 o-phenanthroline เป็นครั้งแรก (Harvey et al, 1955) และมีผู้นำไปใช้ศึกษาราคูเหล็ก เพราะสารเคมีนี้เมื่อรวมกับธาตุเหล็กจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีในรูป iron-phenanthroline complex (Fortune & Mellon, 1938; Somer & Shive, 1942; Smith et al, 1952; Harvey et al, 1955; Oertli & Jacobson, 1960; Brown & Jones, 1976) เมื่อธาตุเหล็กอยู่ในรูป  $Fe^{2+}$  จะได้สารประกอบ  $Fe^{2+}$  - phenanthroline complex  $Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{2+}$  หรือ Ferriin, มีค่า stability constant สูงถึง 21.3 ส่วน  $Fe^{3+}$  - phenanthroline complex, ferriin มีค่า stability constant เพียง 14.1 และสามารถอ่านสีส้มของของสารประกอบดังกล่าวได้ที่ absorbance 510 nm. สารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองมี identical absorbance coefficient ที่ 396 nm. (Harvey et al, 1955) นอกจากนี้สำหรับสารประกอบ ferriin มีความเสถียรมากป้องกันการเกิดออกซิเดชันของตัวเองได้เป็นอย่างดี (Katyal & Sharma, 1980) ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้ได้ใช้เทคนิคการตรวจสอบรูปของธาตุเหล็กด้วยสาร 1-10 o-phenanthroline ในพืชที่ได้รับโลหะหนักชนิดต่าง ๆ