

Thesis Title Identification and Hepatotoxicity of Microcystin-LR Isolated from *Microcystis aeruginosa* Kütz. in Huay Yuak Reservoir Chiang Mai Province

Author Miss Soraya Aroonvilairat

Degree Master of Science (Toxicology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Member
Assoc. Prof. Nirush Lertprasertsuke	Member
Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal	Member

ABSTRACT

Microcystin-LR is a potent hepatotoxin produced by several species of blue-green algae or cyanobacteria, especially *Microcystis aeruginosa* Kütz., which causes serious water quality problems. Surface cyanobacterial blooms were collected from Huay Yuak reservoir in Chiang Mai province, Thailand and extracted for microcystin-LR identification and analysis. The hepatotoxicity of microcystin-LR was investigated on primary cultured rat hepatocytes using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay which detect mitochondrial damage. *M. aeruginosa* was cultured for one month in order to investigate the relationship between the intracellular microcystin-LR concentrations in the cyanobacterial cells and the extracellular microcystin-LR concentrations in the culture media.

Microcystin-LR was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), with a UV detector at 238 nm using a C₁₈ column and linear gradient elution of 30-70% acetonitrile (0.05%

trifluoroacetic acid) in 40 min. The main component of the surface cyanobacterial blooms was microcystin-LR, and its peak showed a retention time of 11.8 min, whilst microcystin-RR was also found in a small amount at 4.9 min retention time. The quantity of microcystin-LR was 0.14 mg/g of dried cells. Confirmatory identification of microcystin-LR was analyzed under optimized liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) conditions. Microcystin-LR exhibited toxic effects on primary cultured rat hepatocytes with an IC₅₀ of 10.34 ng/mL at 24 h incubation. The logarithmic and stationary growth phases of *M. aeruginosa* cultures showed that the intracellular microcystin-LR concentrations in the cyanobacterial cells correlated negatively with the extracellular microcystin-LR concentrations in the culture media. The microcystin-LR concentrations in the cyanobacterial cells ranged between 120.09-458.59 µg/g of dried cells. The concentrations in the culture media ranged between 0.67-10.46 µg/mL.

This study indicated that microcystin-LR found in cyanobacterial samples from Huay Yuak reservoir had high toxicity on rat hepatocytes. Therefore, exposure to microcystin-LR contaminated in the water could result in cellular damage and harm for people who use this reservoir. To prevent the potential hazard of microcystins on human health in Chiang Mai's reservoirs, specific monitoring and control of cyanobacterial growth are necessary.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพิสูจน์เอกลักษณ์และความเป็นพิษของ microcystin-LR ที่แยกได้จาก <i>Microcystis aeruginosa</i> Kütz. ต่อเซลล์ตับ ในอ่างเก็บน้ำห้วยหยวก จังหวัด เชียงใหม่	
ชื่อผู้เขียน	นางสาวโสธยา อรุณวิไลรัตน์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. วีระวรรณ เรืองบุทธิการณ	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. พรงาม ถิมตระกูล	กรรมการ
	รศ. นิรัชร์ เกศประเสริฐสุข	กรรมการ
	รศ. ดร. บুদ্ধี พีรพรพิศาล	กรรมการ

บทคัดย่อ

Microcystin-LR เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่มีพิษสูงต่อตับ สร้างโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Microcystis aeruginosa* Kütz. ส่งผลให้เกิดปัญหาภัยร้ายแรงต่อคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำ ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนผิวน้ำที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำห้วยหยวกจังหวัดเชียงใหม่ ได้ถูกนำมาสกัดเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ microcystin-LR พร้อมกับศึกษาความเป็นพิษของ microcystin-LR ต่อเซลล์ตับของหนูขาวโดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งเป็นการทดสอบความเสียหายต่อไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ได้เพาะเลี้ยง *M. aeruginosa* ในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือนเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ microcystin-LR ภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียและในอาหารเพาะเลี้ยง

การตรวจวัดสารพิษ microcystin-LR ใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และเครื่องวัด UV ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ C_{18} และแยกสารพิษด้วย 30-70% acetonitrile ที่มี trifluoroacetic acid ร้อยละ 0.05 ภายในระยะเวลา 40 นาที พบว่า microcystin-LR ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในไซยาโนแบคทีเรียถูกแยกออกมาที่เวลา 11.8 นาที และพบ microcystin-RR ปริมาณเพียงเล็กน้อยถูกแยกออกมาที่เวลา 4.9 นาที ปริมาณ microcystin-LR มีค่าเท่ากับ 0.14 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ microcystin-LR ทำโดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) นอกจากนี้พบว่า microcystin-LR มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับของหนูขาว ได้ค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ตับร้อยละ 50 หรือได้ค่า $IC_{50} = 10.34$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อป้อนเซลล์ตับกับสารพิษ microcystin-LR ไว้ด้วยกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* มี 2 ระยะคือระยะเริ่มต้น ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วเป็นระยะ logarithmic ตามด้วยระยะ stationary ซึ่งการเจริญเติบโตคงที่ การวิเคราะห์พบว่าปริมาณ microcystin-LR ในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีความสัมพันธ์แบบปฏิกิริยาคงกับกับปริมาณ microcystin-LR ในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณ microcystin-LR ที่พบในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีค่าระหว่าง 120.09 ถึง 458.59 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ส่วนปริมาณ microcystin-LR ที่พบในอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าระหว่าง 0.67 ถึง 10.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่า microcystin-LR ที่พบในตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำห้วยหวกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูสูงมาก ดังนั้นการสัมผัสสารพิษ microcystins ที่ปนเปื้อนในน้ำอาจมีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ และเป็นอันตรายต่อสุขภาพของประชาชนที่ใช้แหล่งน้ำแห่งนี้ได้ การติดตามตรวจสอบแหล่งน้ำและการควบคุมการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง