Thesis Title Reduction of Microcystin-LR Quantity in Microcystis Blooming Water by Bio-reactor and Morning Glory (*Ipomoea aquatica*)

Author Miss Pinpetch Pengwongwan

Degree Master of Science (Toxicology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal Member

ABSTRACT

The incidence of cyanobacterial blooms that can produce and release toxin in water is a problem worldwide including Thailand, where it occurs in Northern, Central and North Eastern areas. The toxin-producing cyanobacteria have an impact on animal and human health because microcystin is a potent hepatotoxin, especially microcystin-LR. Therefore, in this study, surface water was collected from the pond at the King Rama IX Lanna Royal Park in Chiang Mai in order to identify and count the cyanobacterial blooms contained in it and extract their DNA. The presence of cyanobacterial 16s rRNA and the microcystin synthetase gene (*mcyE*) were amplified by using polymerase chain reaction (PCR). The results showed that over 95% of the cyanobacteria were *Microcystis aeruginosa* Kütz., and there were *mcyE* genes that could produce microcystin within the cell showing DNA fragments of 1,200 bp and 589 bp on electrophoresis agarose gel.

An experimental pond was constructed with the bottom and four sides surrounded with plastic. It was put outdoors in order to study the reduction of microcystin-LR by

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

using the combination of a bio-reactor, which was invented and filled with a carrier module for trapping microorganisms, and the aquatic plant, morning glory (*Ipomoea Aquatica*). This plant was grown in advance on soil before bringing it to the experimental pond. The pond was divided to 3 compartments. The first compartment was overgrown with *M. aeruginosa,* the second compartment contained the bio-reactor and the third compartment was planted with grown morning glory. The water was pumped to circulate water from the first compartment to the second and the third, consecutively, and then back to the first compartment again. This experimental pond, sized 1.5×1.5×1.5 m, was placed within a natural pond, size 6×17×2 m, located at the Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University. The water samples were collected weekly from the 3 compartments for 3 months and the microcystin-LR concentrations were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC), with a UV visible detector at 238 nm and diode array detector at 200-300 nm. A C_{18} column was also used. Linear gradient elution of 30-70% acetonitrile was operated with 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) for 40 minutes at a flow rate of 1 mL/min. The analytical results showed the peak of the microcystin-LR at a retention time of 10.2 ± 0.6 minutes and the amount of microcystin-LR in the first compartment ranged from 60.0 to 464.0 μg/L. However, the microcystin-LR in the second and the third compartment could not be detected.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The next experiment was set up in the laboratory using two of four and a half liter glass jars sized 10×15×30 cm, which were filled with water containing *M. aeruginosa.* Grown morning glory was added to the second jar. The experimental jars were placed in room temperature for one week, exposed to sunlight during daytime and aerated with

oxygen via a pump. A hundred microliters of water samples were taken from both jars before and after one week for microcystin-LR quantification. It was found that the microcystin-LR concentration in the second jar had decreased from 99.21 ± 57.60 to 66.12 ± 32.78 µg/L. Therefore, the morning glory could reduce microcystin-LR. The water in both jars and the morning glory were collected in order to examine the microorganism under microscope. Microorganisms, *Lecane* sp., *Euglypha* sp., *Aeolosoma* sp., *Centropyxis* sp. and an unknown species were found in high quantity at the roots of the morning glory. The *Lecane* sp was the dominant species found in the water of both jars. The result of microcystin-LR analysis in the extracted morning glory found a non-detectable level.

The water quality of the samples from the outdoor experimental pond also showed that the bio-reactor and morning glory could reduce chlorophyll a and ammonium-nitrogen, but not nitrate-nitrogen or orthophosphate.

In conclusion, the bio-reactor effectively reduced microcystin-LR concentrations in contaminated water, and the morning glory was also able to reduce amounts of microcystin-LR, in which microorganisms were assumed to play an important role in microcystin-LR reduction.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การลดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ในน้ำที่มีไมโครซิสติสเจริญอย่างรวดเร็วโดยเครื่องไบโอรีแอคเตอร์และผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*)

ผู้เขียน นางสาวปิ่นเพชร เพ่งวงษ์วาล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์ ประธานกรรมการ

รศ.ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล กรรมการ

บทคัดย่อ

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งสามารถผลิตและปล่อยสารพิษไมโครซิสตินลงในแหล่งน้ำเป็นปัญหาที่พบในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย ทั้งภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์เพราะไมโครซิสตินมีพิษต่อตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เก็บสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนผิวน้ำในอ่างเก็บน้ำสวนหลวงล้านนา ร.9 จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อจำแนกชนิดและศึกษาปริมาณของสาหร่ายรวมทั้งสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่ายเพื่อพิสูจน์ว่ามี cyanobacterial 16s rRNA และ microcystin synthetase gene (*mcyE)* ที่สามารถสร้างสารพิษไมโครซิสตินได้หรือไม่ โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ผลการทดลองพบว่าร้อยละ 95 ของสาหร่ายเป็น *Microcystis aeruginosa* Kütz. และมียีนที่สามารถสร้างสารพิษไมโครซิสตินได้โดยปรากฏท่อนดีเอ็นเอขนาด 1,200 และ 589 bp บน electrophoresis agarose gel

บ่อจำลองบุด้วยพลาสติกด้านล่างและด้านข้างได้ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ศึกษาการลดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยเครื่องไบโอรีแอคเตอร์ซึ่งเป็นเครื่องดักจับสารพิษไมโครซิสติน มี carrier อยู่ภายในเพื่อให้ microorganisms มาเกาะติดและเจริญเติบโต ร่วมกับการใช้พืชน้ำผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) ที่ปลูกบนแปลงดินก่อนนำมาใช้ในบ่อจำลองนี้ โดยแบ่งบ่อจำลองออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 เป็นส่วนที่มีการเจริญของสาหร่าย *M. aeruginosa* ส่วนที่ 2 เป็นส่วนที่ใช้วางไบโอรีแอคเตอร์และส่วนที่ 3 เป็นส่วนที่ปลูกผักบุ้ง น้ำในส่วนที่ 1 ถูกปั๊มไปยังส่วนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และนำกลับมายังส่วนที่ 1 หมุนวนอยู่อย่างนี้ตลอดการทดลอง โดยตั้งบ่อจำลองขนาด 1.5×1.5×1.5 เมตร นี้ไว้ในบ่อน้ำธรรมชาติขนาด 6×17×2 เมตร ในบริเวณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แม่โจ้ และเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อจำลองทั้ง 3 ส่วน เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ที่มีเครื่องวัด UV ที่ความยาวคลื่นแสง 238 นาโนเมตร และเครื่องวัด diode array ที่ความยาวคลื่นแสง 200-300 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ C_{18} และ 30-70% acetonitrile ที่มี 0.05% trifluoroacetic acid เป็น mobile phase กำหนดอัตราเร็วสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ภายในระยะเวลา 40 นาที โดยเก็บตัวอย่างน้ำสัปดาห์ละหนึ่งครั้ง เป็นระยะเวลา 3 เดือน ผลการวิเคราะห์พบว่าไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ถูกแยกออกมาที่เวลา 10.2 ± 0.6 นาที และมีปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ ในส่วนที่ 1 ของบ่อจำลองอยู่ในช่วงความเข้มข้น 60.1-464.0 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่น้ำในส่วนที่ 2 และ 3 ไม่สามารถตรวจปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ได้

การทดลองต่อมาได้ทำในห้องปฏิบัติการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้โหลแก้วความจุ 4.5 ลิตร ขนาด 10×15×30 เซนติเมตร จำนวน 2 โหล และเติมสาหร่าย *M. aeruginosa* ทั้งสองโหลเท่ากัน ส่วนโหลที่ 2 มีผักบุ้งปลูกไว้ ตั้งโหลทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ให้ได้รับแสงแดดตลอดช่วงกลางวัน พร้อมทั้งได้รับออกซิเจนผ่านทางเครื่องปั้ม และเก็บน้ำจากโหลแก้วทั้งสอง 100 มิลลิลิตร ก่อนและหลังหนึ่งสัปดาห์เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ ผลการทดลองพบว่าน้ำในโหลที่ 2 มีปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ต่ำกว่าในโหลที่ 1 โดยลดลงจาก 99.21 ± 57.60 เป็น 66.12 ± 32.78 ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงว่าผักบุ้งสามารถลดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ได้ เมื่อนำน้ำจากโหลทั้งสองและผักบุ้งมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า มีปริมาณของ microorganism เป็นจำนวนมากในโหลที่ 2 สายพันธุ์ที่พบคือ *Lecane*, *Euglypha*, *Aeolosoma*, *Centropyxis* และสายพันธุ์ที่ไม่ทราบชื่อ โดยพบสายพันธุ์ *Lecane* มากที่สุดและพบมากบริเวณรากของผักบุ้ง ผลการวิเคราะห์ผักบุ้งหลังการสกัดพบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ในน้ำสกัดจากผักบุ้งได้

ผลการตรวจคุณภาพน้ำจากบ่อจำลองพบว่า ไบโอรีแอคเตอร์และผักบุ้งสามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแอมโมเนียม-ไนโตรเจนได้ แต่ไม่สามารถลดปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจน หรือออร์โธฟอสเฟสในตัวอย่างน้ำได้

สรุปผลการศึกษาครั้งนี้ได้ว่า ไบโอรีแอคเตอร์สามารถลดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ในน้ำที่มีการปนเปื้อนไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ผักบุ้งสามารถลดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์ได้เพียงบางส่วน โดยคาดว่า microorganisms มีบทบาทสำคัญในการลดสารพิษไมโครซิสตินชนิดแอลอาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved