ดาราวรรณ ร่วมกุศล : การพัฒนาเครื่องหมายชีวภาพจากเชื้อประจำถิ่นเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับ ปลานิลจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส) (DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL PROBES FROM MICROFLORA TO ASSURE TRACEABILITY OF TILAPIA FROM SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (SUT) FARM) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 56 หน้า

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาเครื่องหมายชีวภาพ เพื่อการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส) ด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ตัวอย่างปลานิลจำนวน 5 ตัวต่อครั้งถูกเก็บมาจากบ่อเลี้ยงจากฟาร์มมทสและแหล่งอื่น พบประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างปลาจากฟาร์มมทส ในฤดูฝนมีค่าแปรผันอยู่ระหว่าง 1.6 x 10^6 ถึง 5.1 x 10^7 cfu g^{-1} ฤดูหนาว 8.9 x 10^5 ถึง 1.3 x 10^7 cfu g^{-1} และฤดูร้อน 6.8 x 10^6 ถึง 7.5 x 10^7 cfu g^{-1} ด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประชากรแบคทีเรียจากแหล่งอื่นๆมีปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณแบคทีเรียจากฟาร์มมทส โดย 73% ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ตัวอย่างสารพันธุกรรมจากบริเวณเหงือกและลำไส้ปลาถูกสกัดและใช้เป็นแม่-แบบในการเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของจุลินทรีย์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มี GC clamp ได้ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์โพลีอะคริลาไมด์เจล denaturant ระยะเวลา และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สามารถแยกความแตกต่างของสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์จากปลานิล ให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด สภาวะที่เหมาะสมของ DGGE สำหรับการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในปลา พบว่าที่สภาวะเจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% ความเข้มข้น denaturant 30-60% ความต่างศักย์ 120 โวลต์ และเวลา 12 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ แต่ได้ปรับเปลี่ยนสภาวะ DGGE อีกเล็กน้อย คือ ลดความต่างศักย์ที่ใช้เป็น 100 โวลต์ และเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบเป็น 18 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้ผลการทดลองที่คมชัดขึ้น และพบว่ามีแถบดีเอนเอ 3 แถบที่พบเฉพาะในตัวอย่างปลาจากฟาร์มมทส ในทุกฤดูแต่ไม่พบจากแหล่งอื่น เมื่อนำแถบดีเอนเอทั้ง 3 แถบไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบข้อมูลจาก NCBI พบว่าทั้ง 3 แถบมาจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (uncultured bacteria) ได้ และเป็นคนละชนิดกัน และเมื่อออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ตัวอย่างนี้แล้ว ใช้ในการเพิ่มชิ้นดีเอนเอจากตัวอย่างทั้งจากฟาร์มมทส และแหล่งอื่น พบว่ามีเพียงชุดไพรเมอร์ D2 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มชิ้นดีเอนเอจากเฉพาะตัวอย่างฟาร์มมทส ซึ่งมีขนาด 120 bp ได้ แต่ตัวอย่างจากแหล่งอื่นรวมทั้งเชื้อบริสุทธิ์ไม่สามารถ

ใช้ไพเมอร์คู่นี้ในการเพิ่มจำนวนดีเอนเอตามขนาดที่ถูกต้องได้ ดังนั้นชุดไพเมอร์ D2 จึงน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ตัวอย่างจากฟาร์มมทส ได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

DARAWAN RUAMKUSON : DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL PROBES FROM MICROFLORA TO ASSURE TRACEABILITY OF TILAPIA FROM SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (SUT) FARM. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 56 PP.

TILAPIA/MICROBIAL COMMUNITY/MICROFLORA/GC-CLAMP/16S rDNA PCR-DGGE

The bacterial community of Suranaree University of Technology (SUT) tilapia was studied with the aim to develop biological markers for traceability using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Five fish per treatment were sampled from SUT farm and other sources. Total viable count (TVC) of bacteria from SUT farm varied between 1.6×10^6 and 5.1×10^7 colony forming units (cfu) g^{-1} in rainy season, 8.9×10^5 and 1.3×10^7 cfu g^{-1} in cool season and 6.8×10^6 and 7.5×10^7 cfu g^{-1} in hot season. The other sources found bacterial load less than sample from SUT farm. Seventy three percent of the bacteria was Gram-negative. Total DNA was extracted from the fish gills and intestine and then used as template to amplify bacterial 16S rDNA using GC clamp primer. Different bacteria have different DNA sequences that will be denatured at different percentage of polyacrylamide gel, denaturant, run time and voltage. The conditions of DGGE were optimized to screen the fish's bacterial community. The results indicated that 8% of polyacrylamide gel, 30-60% of denaturant concentration, running time of 12hr and voltage of 120V gave the best condition for this screening. However, the DGGE condition was modified by decreasing the voltage to 100V and increasing the running time to 18hr to obtain

better results. The results showed 3 DNA bands on DGGE gel being specific only to bacterial DNA of SUT tilapia when compared to the other sources. All of the 3 DNA bands were sequenced and aligned. The results indicated that they were uncultured bacteria of different species. Primers were designed from the 3 specific sequences and used to amplify DNA samples from four sources and pure cultured bacteria. The results indicate that only primer pair D2 can amplify DNA samples from SUT farm and give a specific band of about 120 bp, but it can not amplify other samples. Therefore, primer D2 can be used to specify samples from SUT farm.

School of Biotechnology

Academic Year 2009

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____