รหัสโครงการ SUT3-304-48-36-31

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายชีวภาพตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากฟาร์ม มทส.

(Development of biological probes to assure traceability of tilapia from SUT farm)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวดาราวรรณ ร่วมกุศล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้ออำนวยสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้าโครงการสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ปลานิลจากฟาร์ม มทส. สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณ คุณปรางค์ขาว ปรุเขตต์ เลขานุการสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อำนวยความสะดวกเรื่องเอกสารการขอใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือต่างๆ ขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลทางด้านการเงินของโครงการวิจัยนี้ และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2550

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาเครื่องหมายชีวภาพเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากฟาร์ม มทส. ด้วยเทคนิค DGGE ความเข้มข้น denaturant ที่ต่างกันจะสามารถแยกความแตกต่างของสารพันธุกรรมด้วยประสิทธิภาพที่ต่างกัน สภาวะที่เหมาะสมของ DGGE จึงจำเป็นสำหรับการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในปลา ตัวอย่างปลานิลจำนวน 5 ตัวต่อครั้งถูกเก็บมาจากบ่อเลี้ยงที่ 5 จากฟาร์ม มทส. ในช่วงเดือนมิถุนายน 2550 ถึง เดือนเมษายน 2551 พบประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างปลาในฤดูฝนมีค่าแปรผันอยู่ระหว่าง 1.6×10^6 ถึง 5.1×10^7 cfu g^{-1} ฤดูหนาว 8.9×10^5 ถึง 1.3×10^7 cfu g^{-1} และฤดูร้อน 6.8×10^6 to 7.5×10^7 cfu g^{-1} ด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งกว่า 80% เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ตัวอย่างสารพันธุกรรมจากบริเวณเหงือกและลำไส้ปลาถูกสกัดและใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวน 16S rDNAของจุลินทรีย์ โดยใช้ไพรเมอร์ forward ที่มี GC clamp ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำไปทดสอบการแยกที่เปอร์เซ็นต์เจลโพลีอะคริลาไมด์ (6.5%, 8.0% และ 10.0%) ความเข้มข้น denaturant (55-45%, 30-60% และ 30-70%) ด้วยความต่างศักย์ (120 โวลต์ และ 200 โวลต์) ของการรันเจล และเวลา (5 ชั่วโมง และ12 ชั่วโมง) ที่แตกต่างกัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าที่สภาวะเจลโพลีอะคริลาไมด์ 8.0% ความเข้มข้น denaturant 30-60% ความต่างศักย์ 120 โวลต์ และเวลา 12 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ โดยสามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอนเอที่มีสารพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันได้ และได้ปรับเปลี่ยนสภาวะ DGGE อีกเล็กน้อย คือ ลดความต่างศักย์ที่ใช้เป็น 100 โวลต์ และเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบเป็น 18 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้ผลการทดลองที่คมชัดขึ้น และพบว่ามีแถบดีเอนเอ 3 แถบที่พบเฉพาะในตัวอย่างปลานิลจากฟาร์ม มทส. ในทุกฤดู แต่ไม่พบจากตัวอย่างปลาจากแหล่งอื่น และคาดว่าแถบที่จำเพาะนี้น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพถึงแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์ต้นตอได้

Abstract

The bacterial community of Suranaree University of Technology (SUT) tilapia was studied with the aim to develop biological markers for traceability. Different bacteria have different DNA sequences that will denature at different denaturant concentrations. The conditions of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) were optimized to screen the fish bacterial community. Five fish per time were sampled from SUT farm between June 2007 to April 2008. Bacterial community from fish skin surface, gill and intestine were grown on agar plates. Total viable count (TVC) of bacteria varied between 1.6×10^6 to 5.1×10^7 colony forming units (cfu) g^{-1} in rainy season, 8.9×10^5 to 1.3×10^7 cfu g^{-1} in cool season and 6.8×10^6 to 7.5×10^7 cfu g^{-1} in hot season. Eighty percent of the bacteria were Gram-negative bacteria. Total DNA was extracted from the fish gills and intestines and then used as template to amplify bacterial 16S rDNA using GC clamp primers. The amplified products were tested on vary percentage of polyacrylamide gel (6.5%, 8.0% and 10.0%), denaturant concentrations (55-45%, 30-60% and 30-70%), running times (5hr and 12hr) and voltages used (120V and 200V). The results indicated that, at 8.0% polyacrylamide gel, 30-60% denaturant concentration, 12hr running time and 120V voltage were the best conditions for these screening. This condition was able to separate different sequences of bacterial DNA. The DGGE condition has been modified further by decreased the voltage to 100V and increased the runtime to 18hr to obtain better results. The results showed 3 DNA bands on DGGE gel that specific only for bacterial DNA of SUT tilapia when compared to other farms. We think that these specific bands can be used as biological marker for traceability SUT tilapia samples.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเก็บตัวอย่างปลา	7
การวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย	7
การทำให้เชื้อบริสุทธิ์และการย้อมแกรม	8
การสกัดดีเอนเอ	9
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE	10
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	12
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	23
ข้อเสนอแนะ	24
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.	27
ภาคผนวก ข.	29
ประวัติผู้วิจัย	36

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงอุณหภูมิในบ่อเลี้ยง น้ำหนักและความยาวของปลา และประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปลานิลจากฟาร์ม มทส. ในแต่ละฤดูกาลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน 13

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิในบ่อเลี้ยง น้ำหนักและความยาวของปลา และประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปลานิลจากแหล่งอื่นในช่วงฤดูฝนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน 27

ตารางที่ 3 แสดงการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลฟาร์ม มทส. และปลานิลจากแหล่งอื่นด้วยการย้อมแกรมแบคทีเรีย และรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้ 27

ตารางที่ 4 แสดงการแปรผันเปอร์เซ็นต์เจลโพลีอะคริลาไมด์, ความเข้มข้น denaturant ค่าความต่างศักย์ และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ชิ้น 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สกัดได้จากตัวอย่างปลานิลจากฟาร์ม มทส. ด้วยวิธี PCR-DGGE 28

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงรูปร่างแบคทีเรียจากการย้อมแกรมและทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	14
รูปที่ 2	จีโนมิคดีเอนเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเหงือกและลำไส้ปลา	16
รูปที่ 3	ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2%	17
รูปที่ 4	DGGE conditions: 30-60% denaturant, 120 โวลต์, 12 ชั่วโมง และ A = 10% เจล และ B = 8% เจล	17
รูปที่ 5	DGGE conditions: 8% เจล, 30-60% denaturant, 120 โวลต์ และ A = 5 ชั่วโมง และ B = 12 ชั่วโมง	18
รูปที่ 6	DGGE conditions: 10% เจล, 45-55% denaturant, 5 ชั่วโมง และ A = 200 โวลต์ และ B = 120 โวลต์	18
รูปที่ 7	DGGE conditions: 8% เจล, 120 โวลต์, 12 ชั่วโมง และ A = 45-55% และ B = 30-60% denaturant	19
รูปที่ 8	PCR-DGGE 16S rDNA จากตัวอย่างปลาทั้ง 3 ฤดู	20
รูปที่ 9	PCR-DGGE 16S rDNA แถบจากทั้ง 3 ฤดูเมื่อเทียบแถบกับการเก็บตัวอย่างปลานิลจากแหล่งอื่นฟาร์มที่ 1	21
รูปที่ 10	PCR-DGGE 16S rDNA แถบจากทั้ง 3 ฤดูเมื่อเทียบแถบกับการเก็บตัวอย่างปลานิลจากแหล่งอื่นฟาร์มที่ 1 และฟาร์มที่ 2	22

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำกำลังเติบโตมากในประเทศไทย และเป็นที่ต้องการเป็นอย่างมากในประเทศแถบทวีปยุโรป ซึ่งมีแนวโน้มที่จะมากยิ่งขึ้นในปีต่อๆไป ปลานิลเป็นหนึ่งในสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงและส่งออกเป็นจำนวนมาก (FAO, 2008) แต่เนื่องจากปลาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เน่าเสียได้ง่าย และเหมาะแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคซึ่งเป็นความกังวลสำหรับผู้บริโภค ดังนั้นความปลอดภัยในอาหาร จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเฝ้าระวังตลอดทุกขั้นตอนจนกระทั่งถึงผู้บริโภค โดยผู้ประกอบการต้องให้ความมั่นใจในเรื่องความปลอดภัยและสามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังผลิตภัณฑ์นั้นๆได้ ปัจจุบันประเทศในกลุ่มยุโรปได้ออกกฎหมาย (European regulation CE 178/2002) ที่เกี่ยวกับความปลอดภัย (Safety) และการตรวจสอบย้อนกลับ (Traceability) ของวัตถุดิบอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ผู้ประกอบการจะต้องสามารถแสดง หรือบ่งบอกถึงที่มาของวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์อาหารของตน โดยกฎหมายนี้เริ่มมีผลบังคับใช้ตั้งแต่ มกราคม 2548 เป็นต้นไป นอกจากนี้ประเทศไทยก็ยังอยู่ในข่ายที่จะต้องแสดงเอกสารรับรอง (Certificate) อาหารสุขภาพและความปลอดภัยตามเงื่อนไขของ EU ที่ Thailand: 94/325/CE ประเทศไทยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องสร้าง และพัฒนาทางวิชาการและการวิจัยทางด้านความปลอดภัยทางอาหาร (Food Safety) เพื่อสร้างมาตรการและเทคนิคเฉพาะในการตรวจสอบที่มาของวัตถุดิบ ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการรับรองความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรงตามความต้องการผู้บริโภค

การตรวจสอบถึงแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์โดยใช้ตัวบ่งชี้ชีวภาพ จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีและใช้ประโยชน์ได้ แต่หากใช้สารพันธุกรรมของตัวปลาเองเป็นตัวบ่งชี้ อาจไม่สามารถแยกแหล่งที่มาได้ เพราะหลายๆแหล่งจะใช้ปลาสายพันธุ์ (ที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน) เดียวกัน ดังนั้นการใช้ตัวบ่งชี้ชีวภาพที่เป็นจุลินทรีย์ที่มาจากตัวปลา และสิ่งแวดล้อมของปลาจึงน่าจะมีความเหมาะสมกว่า แต่ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่จะใช้ตรวจสอบติดตามถึงแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์ได้อย่างแม่นยำ (Le Nguyen *et al.*, 2008) ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับของปลานิล จะเป็นรูปแบบ (Model) ของการพัฒนาเครื่องหมายสำหรับการตรวจสอบย้อนกลับของผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคเฉพาะทางในการตรวจสอบย้อนกลับ (Traceability) ในปลานิล
2. เพื่อพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลที่มาจากฟาร์ม มทส.
3. เพื่อเป็นการพัฒนา และเป็นองค์ความรู้สำหรับงานวิจัยอื่นๆต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้ตัวอย่างปลานิลจากฟาร์ม มทส. เปรียบเทียบจุลินทรีย์กับปลานิลจากแหล่งอื่น
2. ข้อมูลทางพันธุกรรมจะใช้ตรวจสอบโดย 16S rDNA-PCR, DGGE และการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing)

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้เทคนิคเฉพาะทางที่สามารถใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับ (traceability) ในปลานิล
2. ได้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่เป็นตัวติดตาม และตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากฟาร์ม มทส.
3. ใช้การตรวจสอบย้อนกลับนี้ เป็นต้นแบบในการตรวจสอบย้อนกลับปลาจากแหล่งอื่นๆ
4. งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนั้นความรู้และเทคโนโลยีในการศึกษาจะถูกถ่ายทอดโดยตรงกับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จึงจะเป็นการพัฒนากำลังคนทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งตรงกับนโยบายของประเทศ

การทบทวนวรรณกรรม (Reviewed literature)

โดยปกติแบคทีเรียที่พบในปลาก็จะมีความสัมพันธ์ และเกี่ยวข้องกับแหล่งที่อยู่ของปลา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ความเค็มของน้ำที่เป็นแหล่งที่อยู่ของปลา และอุณหภูมิ เป็นต้น เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียในปลานั้น มีทั้งวิธีที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultivable method) และวิธีทางอณูชีโมเลกุล (PCR-DGGE method) ส่วนตัวอย่างที่นิยมนำมาวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียก็ได้แก่ ผิวด้านนอก เหงือก และลำไส้ของปลา แต่อย่างไรก็ตามวิธีการที่ใช้ในการจับปลา ระยะเวลาในการเก็บปลาหลังจากการจับ อาจนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียได้ (Colwell, 1962; Shewan, 1971; Gillespie and Macrae, 1975) ซึ่งนักวิจัยหลายๆท่านได้ทำการศึกษาประชากรแบคทีเรียจากเหงือก และลำไส้ของปลาโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เนื่องจากวิธีนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียได้ทุกชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่างเหงือก และลำไส้ของปลา

Amann *et al.*, 1995 รายงานว่ามีเพียง 1% ของประชากรจุลินทรีย์เท่านั้นที่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (PCR-DGGE method) จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียทั้งที่เพาะเลี้ยงได้ และเพาะเลี้ยงไม่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรีย โดยวิธีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (PCR) เป็นวิธีที่ใช้เวลาสั้นและมีความจำเพาะสูง ซึ่งโดยส่วนมากบริเวณที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมโดยวิธีพีซีอาร์นั้นคือส่วนของ 16S ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งบริเวณนี้จะมีทั้งส่วนที่คล้ายคลึงกันมาก (conserved region) และส่วนที่ต่างกัน (variable region) จึงสามารถใช้แยกชนิดของแบคทีเรียได้ (Amann *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1996) ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับวิธีพีซีอาร์นั้นนักวิจัยหลายท่านได้ทำการออกแบบในหลายส่วนบน 16S rDNA ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนั้นๆ universal primers ของ 16S rDNA ส่วน conserved ที่ 338f กับ 518r นิยมใช้อย่างมากในการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรีย (Øvreas *et al.*, 1997; Ampe *et al.*, 1999; Ercolini, 2004; Le Nguyen *et al.*, 2008) นอกเหนือจากวิธีพีซีอาร์แล้วยังมีวิธีทางอณูชีววิทยาอีกหลายวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียในตัวอย่าง ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอนเอที่มีขนาดเท่ากันแต่มีลำดับของดีเอนเอที่แตกต่างกันโดยใช้สารเคมี (urea and formamide) ในการแยกสายดีเอนเอเป็นสายเดี่ยว (denature) ซึ่งวิธีการนี้สามารถบอกความหลากหลายในตัวอย่างชิ้นดีเอนเอได้ โดยวิธีการนี้ถูกอธิบายครั้งแรกโดย Fischer and Lerman (1983) นักวิจัยหลายๆท่านใช้วิธีการนี้สำหรับวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรีย เช่น Yang *et al.*, 2001 ใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% (w/v) และความเข้มข้น denaturant 30-70% ที่ 200 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์หาประชากร

แบคทีเรียในดิน Kawai *et al.*, 2002 ใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 6.5% (w/v) และความเข้มข้น denaturant จาก 45-55% ที่ 200 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายของแบคทีเรียจากน้ำที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว Le Nguyen *et al.*, 2008 ใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% (w/v) และความเข้มข้น denaturant จาก 30-60% ที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียในปลา และ Liew and Jong, 2008 ใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 10% (w/v) และความเข้มข้น denaturant จาก 30-70% ที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายของจุลินทรีย์ใน Malaysian crude oil.

ทฤษฎี สมมติฐาน และ กรอบแนวความคิด (Conceptual Framework)

เครื่องมือทางอณูชีวโมเลกุลสามารถใช้ในการเพิ่มจำนวน (amplify) และวิเคราะห์หาดีเอนเอของจุลินทรีย์ที่ถึงแม้จะปริมาณน้อยได้ การพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อยู่ในปลาน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงแหล่งที่มาของปลาได้เป็นอย่างดี จากข้อมูลของจุลินทรีย์ในปลานิลจากฟาร์ม มทส. สามารถใช้เป็นจุดเริ่มต้นการสร้างฐานข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยอื่นต่อไปได้

เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

Polymerase Chain Reaction (PCR) คือ การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ ด้วยการจับคู่ทางอณูวิทยา (molecular hybridization) ของไพรเมอร์และการต่อสายดีเอนเอโดยเอนไซม์โพลิเมอเรส ซึ่งเป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอนเออย่างเฉพาะเจาะจงโดยอาศัยหลักการการจำลองสายดีเอนเอ (DNA

replication) ด้วยการสังเคราะห์สายดีเอนเอสายใหม่จากดีเอนเอต้นแบบในหลอดทดลอง ซึ่งมีขั้นตอนการทำงานน้อยใช้ระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอนเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การพัฒนาดีเอนเอเพื่อใช้เป็นตัวติดตาม (DNA probe development) และการวิจัยประยุกต์อื่นๆ

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) คือ วิธีการในการเคลื่อนที่ของอนุภาคคอลลอยด์ที่แขวนอยู่ในตัวกลางโดยสนามไฟฟ้า (electrophoresis method) โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชิ้นดีเอนเอที่มีขนาดเท่ากันแต่มีลำดับของดีเอนเอที่แตกต่างกัน (Ercolini, 2004) ซึ่งภายในเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่มีตัวทำให้เกิดการแยกออกของดีเอนเอสายคู่ (denaturing polyacrylamide gel) นั้น ดีเอนเอสายคู่จะถูกแยกออกเมื่อเคลื่อนที่ไปในสารเคมี (urea and formamide) ที่เป็นตัวที่ทำให้เกิดการแยกออกของดีเอนเอสายคู่ (denaturant) มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารเคมีต่ำ ชิ้นดีเอนเอนั้นจะยังคงเป็นดีเอนเอสายคู่ แต่เมื่อความเข้มข้นของสารเคมีเพิ่มสูงขึ้น ชิ้นดีเอนเอจะเริ่มแยกออกจากกันจนกระทั่งเป็นดีเอนเอสายเดี่ยว 2 สาย แต่เนื่องจากมีการเติม 30-40 bp GC clamp เข้าไปที่ด้านปลาย 5′ ของไพรเมอร์ ทำให้การแยกจากกันอย่างสมบูรณ์ของดีเอนเอสายคู่ไม่เกิดขึ้น ดังนั้นหลังจากที่ชิ้นดีเอนเอเคลื่อนที่ไปบนเจลก็จะทำให้เห็นแถบดีเอนเอที่ตำแหน่งต่างๆ (DGGE fingerprints) ได้ โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคนี้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียในปลานิล และหาแบคทีเรียที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงแหล่งที่มาของปลาจากฟาร์ม มทส. และจะนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยอื่นๆต่อไป

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างปลา

สุ่มเก็บปลานิล 5 ตัวต่อครั้ง และน้ำในบ่อจากฟาร์ม มทส. โดยเก็บตัวอย่างในทุกฤดู (5 ครั้ง) ในระยะเวลา 1 ปี (มิถุนายน 2550 ถึง เมษายน 2551) ซึ่งในระหว่างขนส่งจากฟาร์มจนถึงห้องทดลองจะแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง และเมื่อมาถึงห้องทดลองจะทำการชั่งน้ำหนักและวัดขนาดปลา จากนั้นทำการวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำจากบ่อ, บริเวณผิวด้านนอก เหงือก และลำไส้ของปลา โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และแบ่งเหงือกและลำไส้มาสกัดดีเอนเอ นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างปลานิลจากแหล่งอื่น (จากฟาร์มท้ายเขื่อนลำพระเพลิง) เพื่อนำมาเปรียบเทียบประชากรแบคทีเรียเพื่อหาแบคทีเรียที่มีเฉพาะในปลาจากฟาร์ม มทส. เท่านั้นที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ปลาจากฟาร์ม มทส.

2. การวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย

เหงือก และลำไส้ถูกนำออกมาจากปลาแต่ละตัวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ บริเวณผิวด้านนอก และบางส่วนของ เหงือกและลำไส้ปลาถูกนำมาละลายใน 0.85% NaCl จากนั้นทำการเจือจางจนถึง 10^{-6} ส่วนน้ำจากบ่อเลี้ยงเจือจางถึง 10^{-3} จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วไปเกลี่ย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แก่ Plate Count Agar (PCA, Oxoid, UK) ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป, Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม 5 mg/ml chlortetracycline•HCl and 5 mg/ml chloramphenical (Oxoid, UK) ใช้เพาะเลี้ยงกลุ่มฟังไจ, Thiosulfate Ctitrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS, Oxoid, UK) ใช้

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Vibrio*, Aeromonas medium base (Ryan) ที่เติม 5 µg/ml ampliciline (Oxoid, UK) ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Aeromonas*, Pseudomonas agar base ที่เติม 5 µg/ml C-F-C supplement (Oxoid, UK) ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Pseudomonas* และ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid, UK) ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตและสามารถผลิตกรดแลคติค (Lactic Acid Bacteria and Lactic Acid Producing Bacteria) โดยAeromonas agar base บ่ม 18-24 ชั่วโมง, MRS 48 ชั่วโมง และ PDA 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส PCA บ่ม 24 ชั่วโมง และ TCBS agar 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ Pseudomonas agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-48 ชั่วโมง โดยอาหารทุกชนิดบ่มที่สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ยกเว้นอาหาร MRS บ่มที่สภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophillic condition) จากนั้นนับจำนวนโคโลนี

3. การทำให้เชื้อบริสุทธิ์และการย้อมสีแกรม

การทำให้เชื้อบริสุทธิ์และการย้อมสีแกรมทำตามวิธีการของ Rollins *et al.*, 2003 ดังนี้ เริ่มทำการขีดลากเชื้อ (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมที่เชื้อนั้นๆเจริญในตอนแรกจนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยวที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จากนั้นทำการเก็บเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในกลีเซอรอลและแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บสำรอง (stock) ไว้สำหรับการทดลองอื่นๆต่อไป นอกจากนี้เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จะนำมาจัดจำแนกกลุ่มโดยคราวๆด้วยการย้อมสีแกรม ซึ่งมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้ ขั้นแรกทำการเกลี่ยเชื้อลงบนสไลด์แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปผ่านไฟเพื่อให้เซลล์ติดสไลด์ แล้วย้อมด้วย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านเบาๆ จากนั้น

ย้อมด้วย iodine เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำประปา แล้วล้างด้วย 95% เอทานอลจนไม่มีสี crystal violet หลุดออกมา หรือประมาณ 3-4 หลอดของหลอดหยด (dropper) แล้วล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นย้อมด้วย safranin เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นซับให้สไลด์แห้ง แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การสกัดดีเอนเอ

ทำการสกัดดีเอนเอโดยปรับปรุงแก้ไขวิธีการเล็กน้อยของ Le Nguyen *et al.*, 2008 ซึ่งอธิบายพอสังเขปดังนี้ นำตัวอย่างเหงือกและลำไส้ปลามาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วนำตัวอย่างที่บดได้ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วเติม 720 µl extraction buffer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยเขย่าให้ผสมกันได้ดีด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) ทุกๆ 5 นาทีจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม 225 µl 5M potassium acetate แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใส 750 µl ถ่ายใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอนเอด้วย 500 µl isopropanol ที่แช่เย็น แล้วผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีแล้วทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม 70% เอทานอลที่แช่เย็น 300 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และทิ้งส่วนใส จากนั้นปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอนเอด้วย 30 µl TE buffer และเก็บสารละลายดีเอนเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

5.1 การเพิ่มจำนวนชิ้น 16S rDNA (16S rDNA amplification)

ใช้ไพรเมอร์ GC338f (5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGG GGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′) และ 518r (5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′) (Øvreås *et al.*, 1997; Ampe *et al.*, 1999; Ercolini, 2004; Le Nguyen *et al.*, 2008) ในการเพิ่มจำนวนชิ้น 16S rDNA จากตัวอย่างดีเอนเอที่ได้สกัด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยภายในแต่ละหลอดพีซีอาร์จะมีปริมาตรสุดท้าย 50 µl ประกอบด้วยดีเอนเอแม่แบบ, 0.4 µM ไพรเมอร์, 0.2 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 1x buffer ที่ไม่มี $MgCl_2$ (promega) และ 1.0 µl *Taq* polymerase (ทำเอง) สภาวะ PCR ที่ใช้คือ ขั้นตอนที่ 1; 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2; 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที, ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที และขั้นตอนที่ 3; 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที จากนั้นแบ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 3 µl มาทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2% ในสารละลาย 1x TAE buffer และเปรียบเทียบขนาดกับดีเอนเอมาตรฐาน (DNA mass ladder 100 bp, Promega)

5.2 สภาวะที่เหมาะสมของ DGGE ในการวิเคราะห์หา 16S rDNA ของประชากรแบคทีเรีย

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เหลือถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย DGGE โดยใช้เครื่อง DCode™ universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, USA) เพื่อแยกความแตกต่างชิ้น 16S rDNA ของ

แบคทีเรียแต่ละชนิดโดยจะพบแบนที่ตำแหน่งต่างๆกัน ซึ่งในขั้นแรกจะหาสภาวะของ DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียในตัวอย่าง โดยใช้เปอร์เซ็นต์เจลโพลีอะคิรลาไมด์ (8% และ 10% (w/v)), ความเข้มข้น denaturant (45-55%, 30-60% และ 30-70%) ความต่างศักย์ไฟฟ้า (120 โวลต์ และ 200 โวลต์) และเวลาที่ใช้ (5 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง) ของ DGGE ที่แตกต่างกันไป ซึ่งทุกสภาวะการทดลองใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสารละลาย 1x TAE buffer จากนั้นเจลจะถูกย้อมด้วย 1.0 μg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นส่องดูเจลด้วย UV transilluminator เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของ DGGE แล้วได้ทำการปรับสภาวะอีกเล็กน้อย โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ และเพิ่มระยะเวลาในการทดลองเป็น 18 ชั่วโมง ทำการแยกความแตกต่างของ 16S rDNA ของประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างดีเอนเอที่สกัดได้จากทั้งตัวอย่างปลาจากฟาร์ม มทส. และปลาจากแหล่งอื่น เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการระบุถึงแหล่งที่มาของปลาจากฟาร์ม มทส.

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการย้อมแกรมแบคทีเรีย

จากการเก็บตัวอย่างปลานิลครั้งละ 5 ตัวจากฟาร์ม มทส. ซึ่งเป็นฟาร์มเพาะเลี้ยงลูกปลาส่งขาย ในทุกฤดูตลอดระยะเวลา 12 เดือน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียทั้งโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีการ PCR-DGGE พบว่าอุณหภูมิในบ่อเลี้ยงเฉลี่ยอยู่ที่ 25-30 องศาเซลเซียส ปลามีความยาวอยู่ระหว่าง 10.5 ถึง 15.0 เซนติเมตร และน้ำหนักอยู่ระหว่าง 20.00 ถึง 32.59 กรัม ซึ่งส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีอายุอยู่ระหว่าง 2-3 เดือน เมื่อหาประชากรแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งหมดด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าประชากรแบคทีเรียที่นับได้ทั้งหมด (Total viable count: TVC) ในฤดูฝนมีค่าอยู่ระหว่าง 1.6×10^6 ถึง 5.1×10^7 colony forming units (cfu) g^{-1}, ฤดูหนาวมีค่าอยู่ระหว่าง 8.9×10^5 ถึง 1.3×10^7 cfu g^{-1} และในฤดูร้อนมีค่าอยู่ระหว่าง 6.8×10^6 ถึง 7.5×10^7 cfu g^{-1} (ตารางที่ 1) ซึ่งการที่ประชากรรวมของแบคทีเรียที่ตรวจพบไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมากนัก เนื่องจากในช่วงของการเก็บตัวอย่างปลานิลจากฟาร์ม มทส. ได้เกิดฝนตกทุกครั้งของการเก็บตัวอย่าง และบ่อเลี้ยงปลานิลอยู่กลางแจ้ง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ในช่วงที่น่าจะมีเชื้อแบคทีเรียมาก (ฤดูร้อน) จึงถูกน้ำฝนเจือจางเชื้อได้ และอุณหภูมิช่วงที่เก็บตัวอย่างไม่แตกต่างกันมากนัก

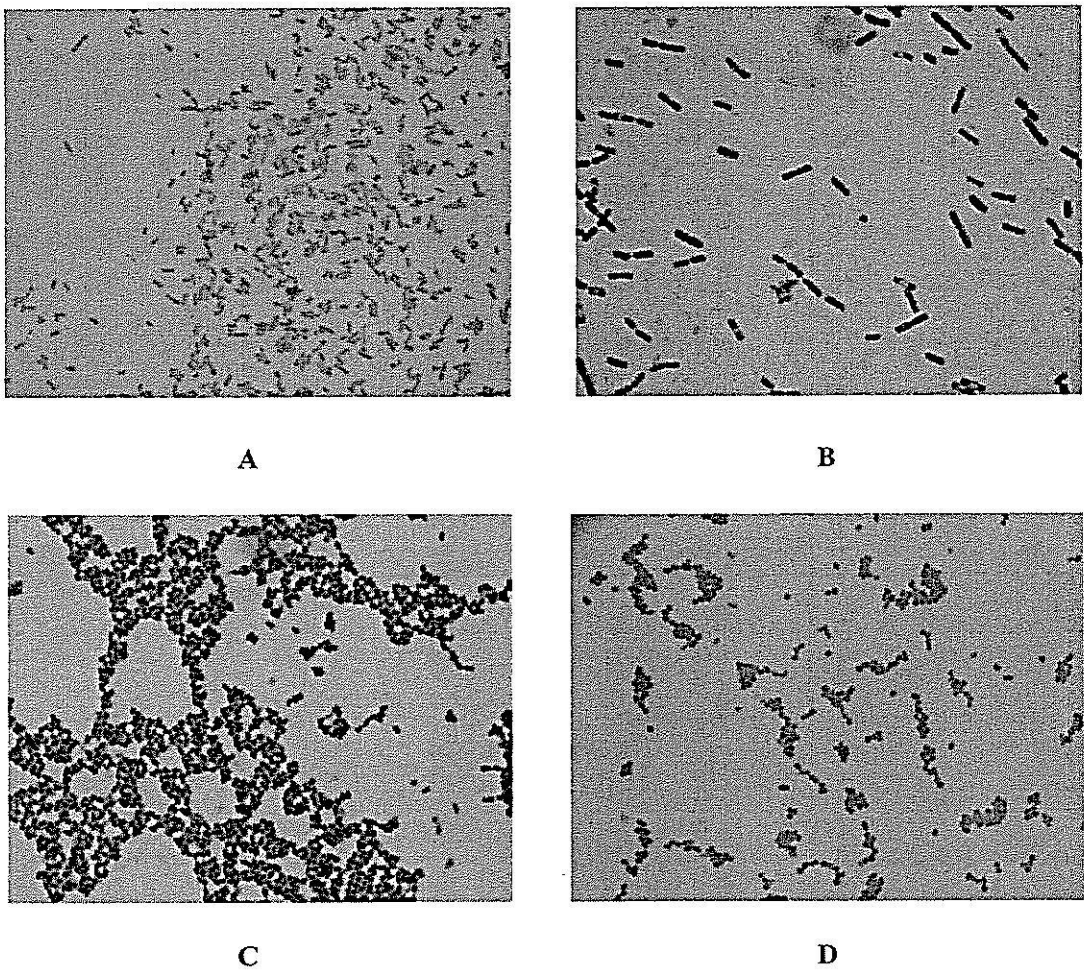
ตารางที่ 1 แสดงอุณหภูมิในบ่อเลี้ยง น้ำหนักและความยาวของปลา และประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปลานิลจากฟาร์ม มทส. ที่แตกต่างกันในแต่ละฤดูกาลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน

Seasons	Weight (g)	Length (cm)	Sample	PCA (cfu/g)	MRS (cfu/g)	Ps agar (cfu/g)	Aero agar (cfu/g)	TCBS (cfu/g)
Rainy (27-30°C)	27.2±1.5	12.4±1.1	Water	$4.8x10^5$	$3.7x10^3$	$1.2x10^4$	$2.8x10^4$	$1.7x10^3$
			Skin surface	$5.1x10^7$	$4.2x10^4$	$2.1x10^4$	$6.1x10^5$	$5.9x10^3$
			Gill	$7.4x10^6$	$7.4x10^4$	$6.8x10^4$	$8.6x10^5$	$7.4x10^3$
			Intestine	$1.6x10^6$	$1.5x10^5$	$2.6x10^4$	$3.6x10^5$	$2.6x10^3$
Cool (25-27°C)	30.2±2.4	13.4±1.7	Water	$2.3x10^5$	$4.3x10^3$	$1.8x10^4$	$1.1x10^3$	TSTC
			Skin surface	$1.3x10^7$	$4.5x10^4$	$3.3x10^4$	$4.9x10^4$	TSTC
			Gill	$3.6x10^6$	$1.9x10^5$	$9.6x10^4$	$9.3x10^4$	TSTC
			Intestine	$8.9x10^5$	$5.6x10^5$	$5.7x10^4$	$1.9x10^4$	TSTC
Hot (29-35°C)	21.7±1.7	11.5±1.0	Water	$3.6x10^5$	$1.3x10^3$	$3.1x10^3$	$1.6x10^4$	$3.6x10^4$
			Skin surface	$7.5x10^7$	$1.4x10^4$	$4.5x10^3$	$1.5x10^5$	$5.2x10^4$
			Gill	$2.4x10^7$	$4.2x10^4$	$7.4x10^3$	$4.6x10^5$	$8.4x10^4$
			Intestine	$6.8x10^6$	$7.1x10^4$	$5.5x10^3$	$8.8x10^4$	$4.5x10^4$

**TSTC = Too Small Too Count หมายถึง มีจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยกว่า 30 โคโลนี

นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรแบคทีเรียส่วนใหญ่ 80 % เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อนสั้น (Gram-negative rods) ดังรูปที่ 1A 13% เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเป็นท่อนสั้น (Gram-positive rods) ดังรูปที่ 1B ส่วนอีก 6 % เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (Gram-positive cocci) ดังรูปที่ 1C และอีก 1 % เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม (Gram-negative cocci) ดังรูปที่ 1D ทั้งนี้

เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในปลา ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) (Trust and Sparrow, 1974) ที่จะไม่ทำให้ปลาเกิดโรคในสภาวะที่ปลามีสุขภาพแข็งแรง แต่เมื่อปลามีภูมิคุ้มกันต่ำ มีบาดแผล หรือเกิดความเครียดจากการมีประชากรปลาในบ่อเลี้ยงมากเกินไป เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำให้ปลาป่วย เป็นโรคได้



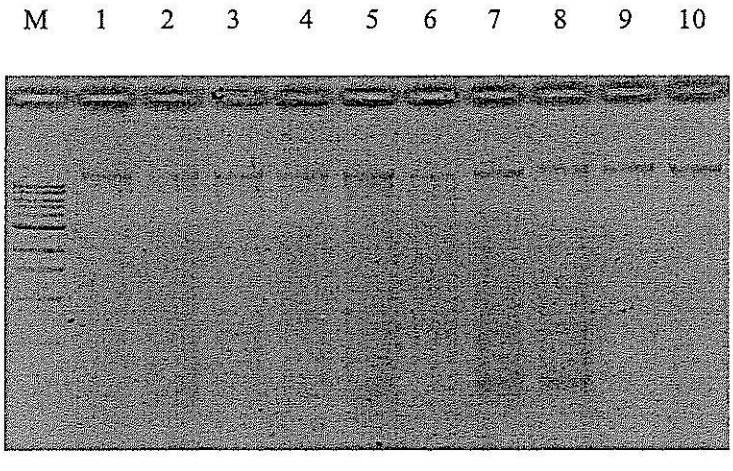
รูปที่ 1 แสดงรูปร่างแบคทีเรียจากการย้อมแกรมและทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (A = Gram-positive cocci, B = Gram-positive rods, C = Gram-positive cocci และ D = Gram-negative cocci)

2. การวิเคราะห์ดีเอนเอของประชากรแบคทีเรียในปลานิลจากฟาร์ม มทส. และปลานิลจากแหล่งอื่นด้วยวิธี PCR-DGGE

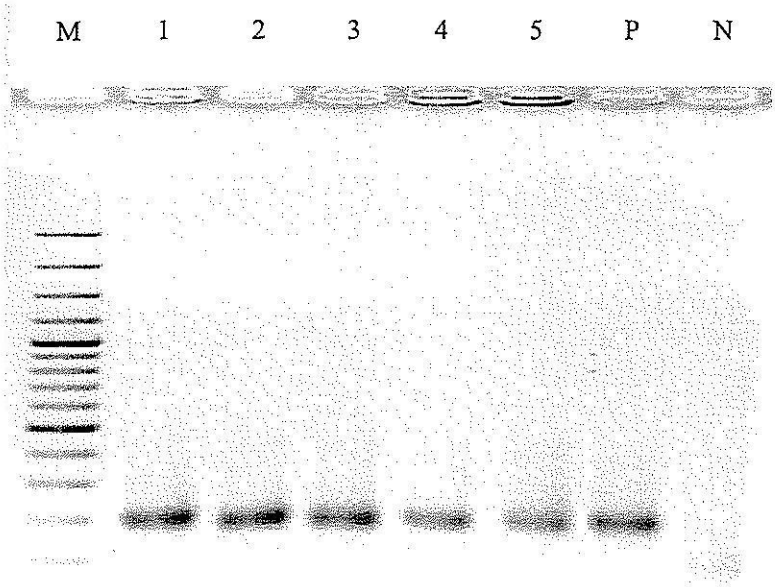
ในเบื้องต้นได้ทำการสกัดดีเอนเอทั้งหมด (genomic DNA: gDNA) จากเหงือกและลำไส้ปลา ซึ่งตัวอย่างจีโนมิคดีเอนเอที่สกัดได้แสดงดังรูปที่ 2 จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียในตัวอย่าง จึงใช้เพียงตัวอย่างดีเอนเอจากลำไส้ปลาเท่านั้นมาทำการทดลอง พบว่าเมื่อทำการเพิ่มชิ้น 16S rDNA ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 220 bp ดังรูปที่ 3 จากนั้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เหลือทั้งหมดถูกทดสอบและวิเคราะห์ที่สภาวะของ DGGE ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเจลโพลีอะคริลาไมด์ ในรูปที่ 4 ความเข้มข้นเจล 8% เวลาที่ใช้ 12 ชั่วโมง ในรูปที่ 5 ค่าความต่างศักย์ 200 โวลต์ ในรูปที่ 6 และความเข้มข้น denaturant 30-60% ในรูปที่ 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทดลอง การแยกดีเอนเอเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (รูปที่ 5A) จะพบว่าชิ้นดีเอนเอแยกกันได้ไม่ชัดเจนทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของชิ้นดีเอนเอที่มีลำดับที่ต่างกัน และนอกจากนี้บางส่วนอาจจะยังแยกสายดีเอนเอได้ไม่ดีจึงทำให้เห็นจำนวนแถบน้อย และอยู่ติดกันแยกได้ไม่ชัดเจน

สำหรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไป (รูป 6A) จะพบว่าชิ้นดีเอนเอเคลื่อนที่ลงมาอย่างรวดเร็วในช่วงแรกจึงอาจทำให้เกิดการอัดกันแน่น จนทำใช้ชิ้นดีเอนเอแต่ละชิ้นไม่สามารถแยกสายดีเอนเอได้และการเคลื่อนที่ก็ยากขึ้น และถ้าใช้ความเข้มข้น denaturant ที่ใกล้ๆกันก็จะยิ่งทำให้การแยกสายดีเอนเอเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้นดังรูปที่ 6 ส่วนเจลโพลีอะคริลาไมด์ 10% นั้นเนื่องจากมีช่องตาข่ายเจลที่เล็กกว่าที่เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% ทำให้ชิ้นดีเอนเอเคลื่อนที่ได้ลำบากกว่า จึงทำให้แยกความแตกต่างของชิ้นดีเอนเอที่มีลำดับใกล้เคียงกันได้ยากจึงทำให้เห็นแถบน้อยกว่าที่เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% แต่เมื่อดูในรูปที่ 4 จะเห็นว่าสามารถใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 10% ได้เช่นกัน แต่เมื่อเทียบกันแล้วที่เจลโพ-

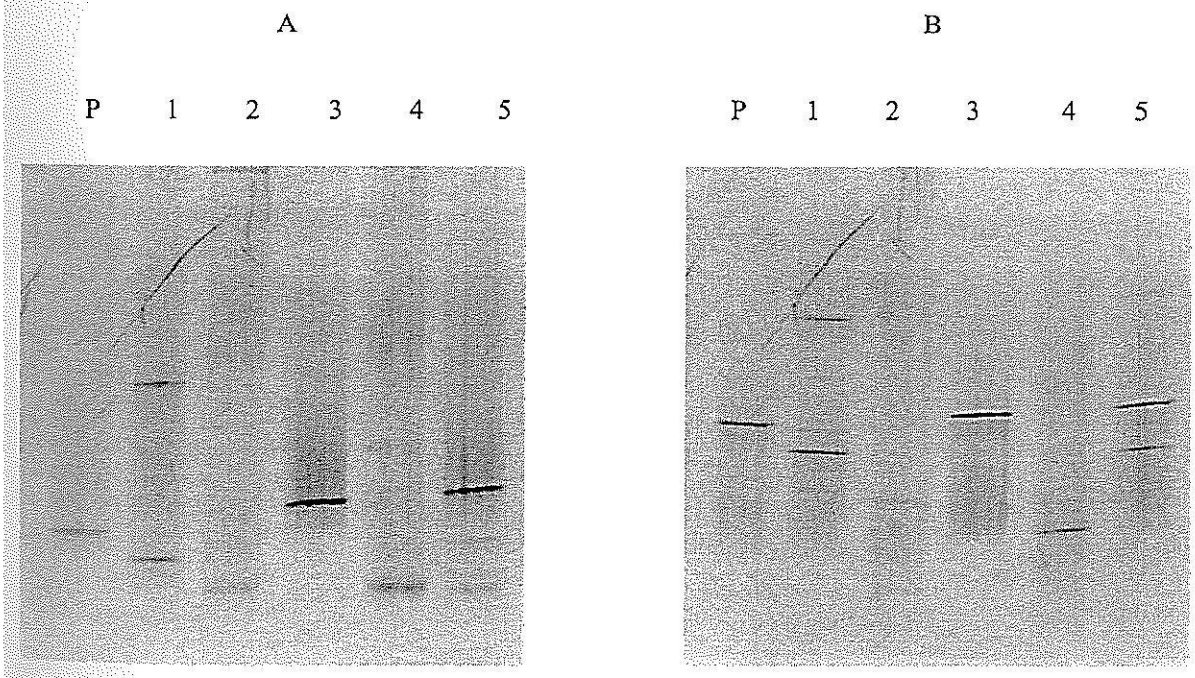
ลีอะคริไมด์ 8% จะเหมาะสมกับงานวิจัยนี้มากกว่า สำหรับเจลโพลีอะคริไมด์ 6.5% ผู้วิจัยทำการเตรียมแต่ผลปรากฏว่าเจลโพลีอะคริลาไมด์ไม่เกิดกระบวนการการสร้างตาข่ายของเจล (polymerization) จึงทำให้เจลไม่แข็งและไม่สามารถทำการทดลองต่อได้ สำหรับความเข้มข้น denaturant พบว่าที่ 30-60% สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอนเอได้ดีที่สุดเพราะว่าได้จำนวนแถบบนเจลโพลีอะคริลาไมด์มากสุด ทั้งนี้เนื่องจากช่วงและระยะของ gradient เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้ เพราะว่าที่ความเข้มข้น denaturant 30-70% น่าจะเป็นช่วงที่กว้างเกินไปสำหรับชิ้นดีเอนเอที่มีลำดับใกล้เคียงกันดังนั้นจึงแยกความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน ส่วนที่ความเข้มข้น denaturant 45-55% นั้น เป็นช่วงที่แคบเกินไปซึ่งไม่เหมาะกับชิ้นดีเอนเอที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเพราะต้องใช้พื้นที่ในการเคลื่อนที่มากนั่นเอง ซึ่งการวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-DGGE ก็จะใช้สภาวะที่ได้นี้ในการแยกความแตกต่างชิ้น 16S rDNA ของประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างเหงือกและลำไส้ปลานิลจากฟาร์ม มทส. และปลานิลจากแหล่งอื่นต่อไป



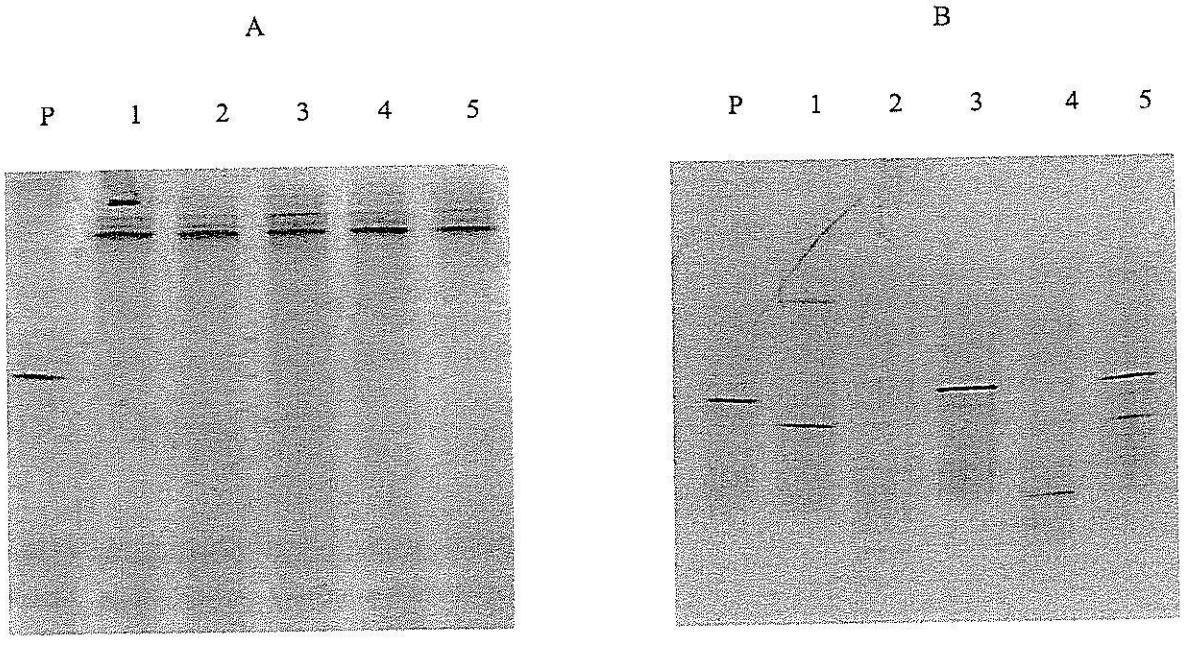
รูปที่ 2 จีโนมิคดีเอนเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเหงือกและลำไส้ปลา ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 1% (M = 1kp marker, 1-5 = จีโนมิคดีเอนเอจากเหงือกปลาตัวที่1-5 ตามลำดับ, 6-10 = จีโนมิคดีเอนเอจากลำไส้ปลาตัวที่ 1-5 ตามลำดับ)



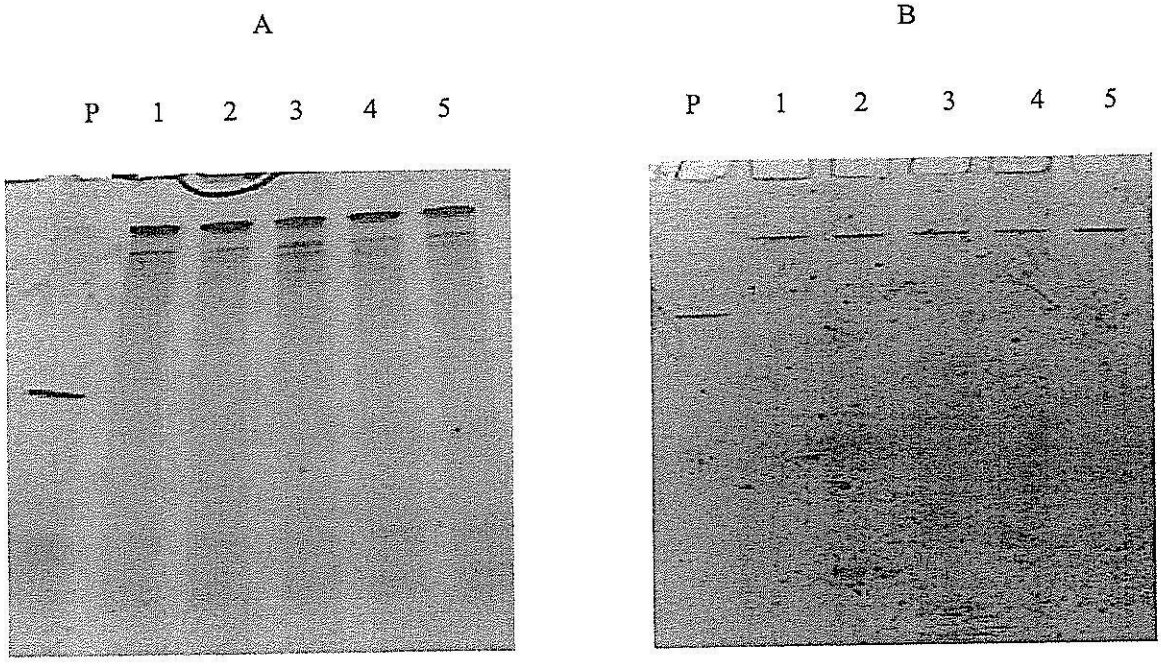
รูปที่ 3 ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2% (M = 100bp marker, 1-5 = ดีเอนเอตัวอย่างที่ 1-5 ตามลำดับ, P = positive control (*E. coli*) and N = negative control



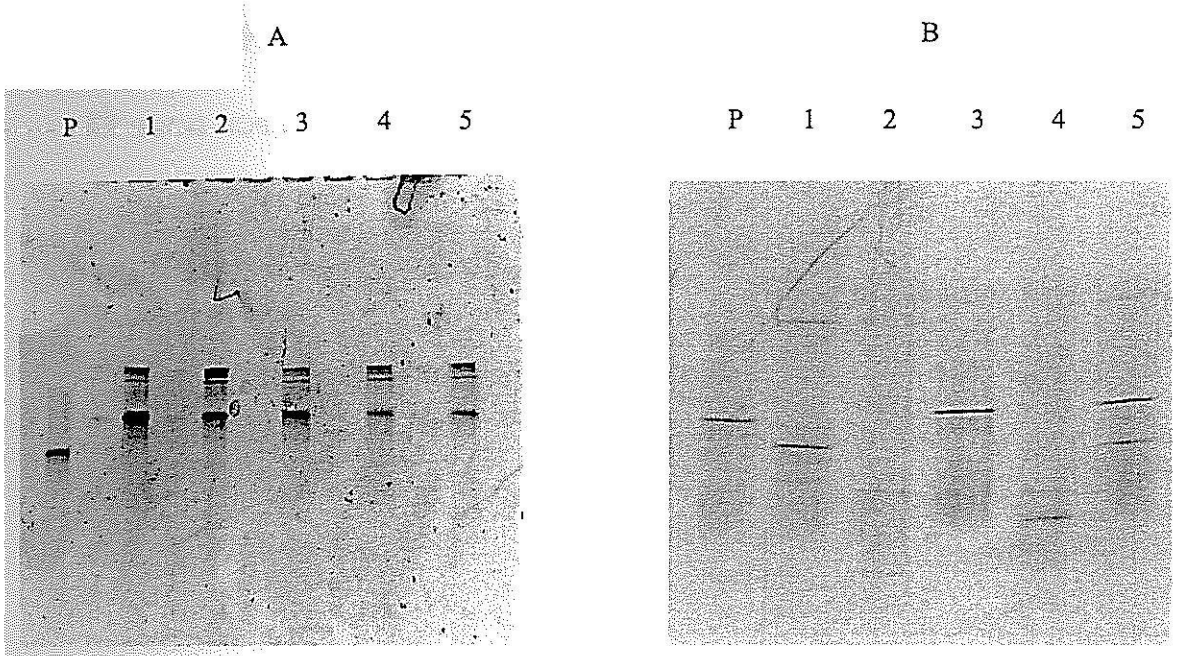
รูปที่ 4 DGGE conditions: 30-60% denaturant, 120 โวลต์, 12 ชั่วโมง และ A = 10% เจล และ B = 8% เจล (1-5 = ดีเอนเอตัวอย่างที่ 1-5 ตามลำดับ, P = positive control)



รูปที่ 5 DGGE conditions: 8% เจล, 30-60% denaturant, 120 โวลต์ และ A = 5 ชั่วโมง และ B = 12 ชั่วโมง (1-5 = ดีเอนเอตัวอย่างที่ 1-5 ตามลำดับ, P = positive control)



รูปที่ 6 DGGE conditions: 10% เจล, 45-55% denaturant, 5 ชั่วโมง และ A = 200 โวลต์ และ B = 120 โวลต์ (1-5 = ดีเอนเอตัวอย่างที่ 1-5 ตามลำดับ, P = positive control)

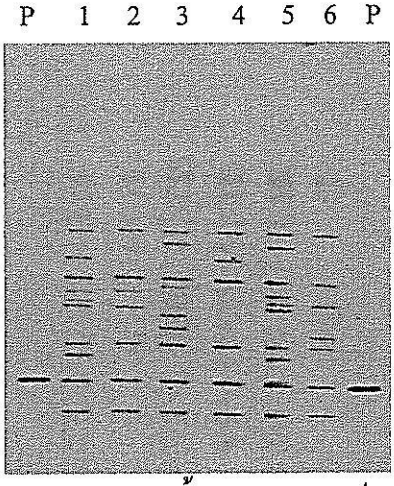


รูปที่ 7 DGGE conditions: 8% เจล, 120 โวลต์, 12 ชั่วโมง และ A = 45-55% และ B = 30-60% denaturant (1-5 = ดีเอนเอตัวอย่าง 1-5 ตามลำดับ, P = positive control)

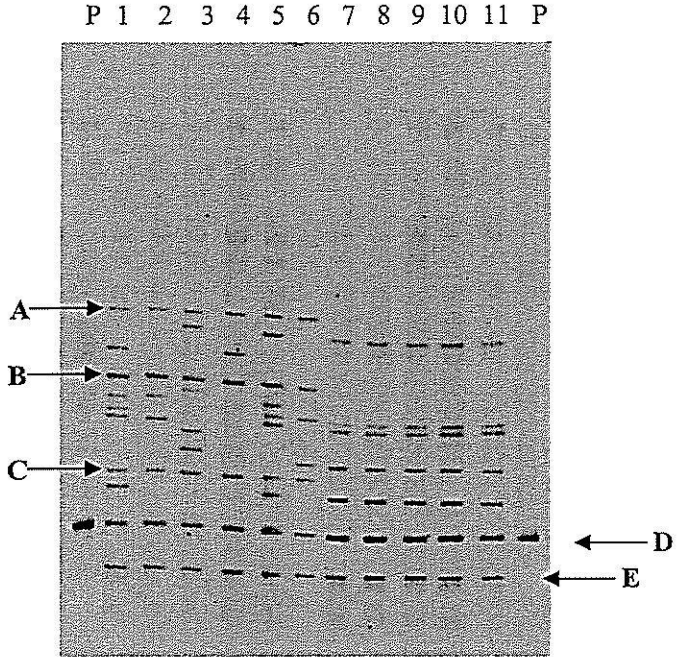
เมื่อได้สภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาประชากรแบคทีเรียในปลานิลจากฟาร์ม มทส. แล้วจึงทำการเพิ่มชิ้นส่วน 16S rDNA จากตัวอย่างทั้งหมดที่ได้ทำการสกัดจีโนมิคดีเอนเอ และเมื่อนำมาทดสอบและวิเคราะห์สภาวะ DGGE ที่เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% และ ความเข้มข้น denaturant 30-60% เวลาที่ใช้ 12 ชั่วโมง และความต่างศักย์ที่ 120 โวลต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละฤดู พบว่าตัวอย่างดีเอนเอจากเหงือก และลำไส้ปลาทั้ง 5 ตัวที่เก็บในแต่ละครั้งมีลักษณะแถบไม่แตกต่างกันบน DGGE แต่ลักษณะแถบจะต่างกันเล็กน้อยระหว่างเหงือกและลำไส้ที่มาจากปลาตัวเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละฤดูพบว่ามีบางแถบที่แตกต่างกัน แต่ก็พบว่ามีแถบที่พบในทุกฤดู ดังรูปที่ 8 ซึ่งคาดว่าแถบที่พบในทุกฤดูนี้น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้จำเพาะสำหรับปลาจากฟาร์ม มทส. ได้เมื่อเทียบกับปลาจากแหล่งอื่น แต่หลังจากที่ทำการทดลองในช่วงแรกพบว่าแถบดีเอนเอที่เห็นบน DGGE ไม่มีความคมชัดมาก

นัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีการปรับเปลี่ยนสภาวะ DGGE อีกเล็กน้อยโดยเพิ่มระยะเวลาจาก 12 ชั่วโมง เป็น 18 ชั่วโมง และลดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าจาก 120 โวลต์ เป็น 100 โวลต์ ดังนั้นสภาวะของ PCR-DGGE ที่ดีที่สุดสำหรับการวิจัยนี้คือ เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% ความเข้มข้น denaturant 30-60% ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และระยะเวลา 18 ชั่วโมง

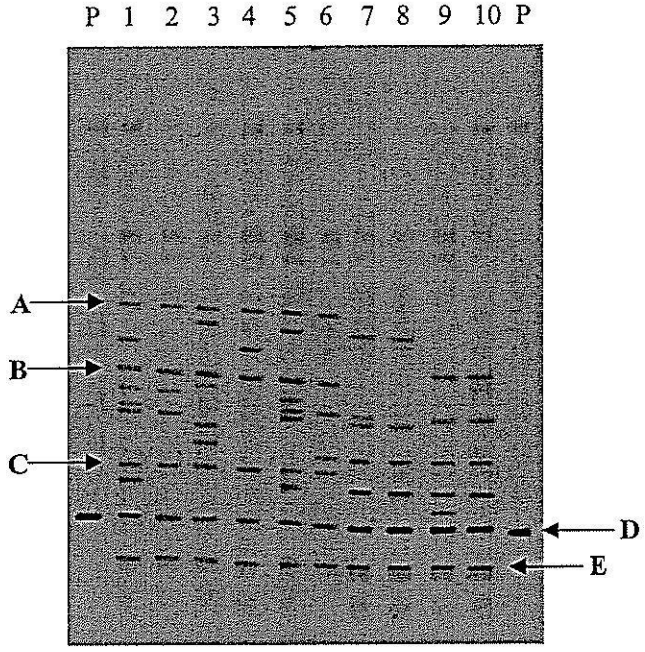
เมื่อทำการเก็บตัวอย่างปลานิลจากแหล่งอื่นมาเทียบกับตัวอย่างปลานิลจากฟาร์ม มทส. ด้วยการทำ PCR-DGGE แล้วพบว่าแถบดีเอนเอที่มีตรงกันในทุกฤดูจากฟาร์ม มทส. จำนวน 5 แถบนั้น มีเพียง 3 แถบเท่านั้นที่พบเฉพาะจากฟาร์ม มทส. ทั้งนี้เนื่องจากอีก 2 แถบ ปลานิลจากแหล่งอื่นก็มีเช่นกัน (รูปที่ 9 และรูปที่ 10) ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะแวดล้อม อาหารที่ใช้เลี้ยง และปัจจัยอื่นๆอาจมีผลต่อประชากรแบคทีเรียที่พบในแต่ละพื้นที่นั้นๆจึงทำให้ในแต่ละพื้นที่มีแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้ ดังนั้น 3 แถบที่พบเฉพาะในตัวอย่างปลาจาก มทส. นี้น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับตรวจสอบย้อนกลับมายังปลานิลจากฟาร์ม มทส.ได้



รูปที่ 8 PCR-DGGE 16S rDNA จากตัวอย่างปลาทั้ง 3 ฤดูของฟาร์ม มทส. (1, 3, 5 = ตัวอย่างจากลำไส้, 2, 4, 6 = ตัวอย่างจากเหงือก, 1-2 = ตัวอย่างในฤดูร้อน, 3-4 = ตัวอย่างในฤดูหนาว, 5-6 = ตัวอย่างในฤดูฝน และ P = positive control)



รูปที่ 9 PCR-DGGE 16S rDNA จากตัวอย่างปลาทั้ง 3 ฤดูจากฟาร์ม มทส. เทียบกับตัวอย่างปลานิลจากแหล่งอื่นฟาร์มที่ 1 (1, 3, 5 = ตัวอย่างจากลำไส้, 2, 4, 6 = ตัวอย่างจากเหงือก, 1-2 = ตัวอย่างในฤดูร้อน, 3-4 = ตัวอย่างในฤดูหนาว, 5-6 = ตัวอย่างในฤดูฝน, 7-11 = ตัวอย่างจากลำไส้ปลานิลจากแหล่งอื่นและ P = positive control), A, B และ C คือแถบดีเอนเอที่พบเฉพาะจากปลา มทส., D และ E คือแถบดีเอนเอที่พบในปลาทุกตัวอย่าง



รูปที่ 10 PCR-DGGE 16S rDNA จากตัวอย่างปลาทั้ง 3 ฤดูจากฟาร์ม มทส. เทียบกับตัวอย่างปลานิลจากแหล่งอื่นฟาร์มที่ 1 และฟาร์มที่ 2 (1, 3, 5 = ตัวอย่างจากลำไส้, 2, 4, 6 = ตัวอย่างจากเหงือก, 1-2 = ตัวอย่างในฤดูร้อน, 3-4 = ตัวอย่างในฤดูหนาว, 5-6 = ตัวอย่างในฤดูฝน, 7-8 = ตัวอย่างจากลำไส้และเหงือกปลานิลตามลำดับจากฟาร์มที่ 1, 9-10 = ตัวอย่างจากลำไส้และเหงือกปลานิลตามลำดับจากฟาร์มที่ 2 และ P = positive control), A, B และ C คือแถบดีเอนเอที่พบเฉพาะจากปลา มทส., D และ E คือแถบดีเอนเอที่พบในปลาทุกตัวอย่าง

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ประชากรแบคทีเรียที่พบในปลานิลมีความหลากหลายแตกต่างกันไป ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงและสถานที่อยู่อาศัยของปลานิล รวมทั้งแหล่งของอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งจะทำให้มีประชากรแบคทีเรียแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ดังนั้นจึงสามารถใช้แบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อพื้นที่นั้นในการบ่งชี้ถึงแหล่งที่มาได้ และสำหรับวิธี PCR-DGGE สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของชิ้น 16S rDNA ของแบคทีเรียที่อยู่ในปลาที่มีลำดับสารพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เครื่องมือนี้เป็นส่วนหนึ่งในการตรวจสอบย้อนกลับถึงแหล่งที่มาของปลานิลจากฟาร์ม มทส. และประยุกต์ใช้กับงานอื่นๆได้ ในการวิจัยนี้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเทคนิค PCR-DGGE คือ การใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 8% ความเข้มข้น denaturant 30-60 % ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และเวลาที่ใช้ 18 ชั่วโมง และการวิจัยนี้พบแถบดีเอนเอที่จำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียจากปลานิลในฟาร์ม มทส. ในอนาคตการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่จำเพาะต่อปลาของ มทส. จะทำให้สามารถตรวจสอบย้อนกลับปลาของ มทส. ได้ อีกทั้งสามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปประยุกต์ใช้กับการพัฒนาเครื่องหมายตรวจสอบย้อนกลับ ให้กับผลิตภัณฑ์อื่นๆต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น denaturant ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า และระยะเวลาที่ใช้สำหรับวิธี PCR-DGGE ต้องเหมาะสมกับกลุ่มของประชากรจุลินทรีย์ ตำแหน่งและขนาดของ 16S rDNA ที่ amplify ที่ผู้วิจัยต้องการจะศึกษาดังนั้นก่อนการทำงานวิจัยควรจะหาสภาวะที่เหมาะสมกับเป้าหมายที่สนใจจะศึกษา เช่นหากกลุ่มประชากรมีลำดับสารพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก ควรจะใช้ความเข้มข้น denaturant ที่ใกล้กัน เช่น 45-55% เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากฟาร์ม มทส. เทียบกับตัวอย่างปลานิลจากฟาร์มอื่นเพียงแค่ 2 ฟาร์มเท่านั้น หากสามารถสุ่มตัวอย่างปลานิลจากจังหวัดอื่นมาเปรียบเทียบด้วย น่าจะทำให้ทราบความถูกต้องและแม่นยำของเครื่องหมายชีวภาพที่พัฒนาขึ้นมาด้วยวิธีการ PCR-DGGE ในการบ่งชี้ถึงแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น

บรรณานุกรม

Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 59, 143-169.

Ampe, F., Omar, N. B., Moizan, C., Wacher, C., and Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Applied and Environmental Microbiology. 65, 5464-5473.

Colwell, R. R. (1962). The bacterial flora of Puget Sound fish. Journal of Applied Bacteriology. 25, 147-158.

Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods. 56, 297-314.

Fischer, S. G., and Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 80, 1579-1583.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2008). Present and future markets for fish and fish products from small-scale fisheries – case studies from Asia, Africa and Latin America [online]. FAO Fisheries Circular. No. 1033. Rome. 88p.

Gillespie, N. C., and Macrae, I. C. (1975). The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. Journal of Applied Bacteriology. 39, 91-100.

Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. (2002). 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 68, 699-704.

Le Nguyen, D. D., Ngoc, H. H., Dijoux, D., Loiseau, G., and Montet, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam. Food Control. 19, 454-460.

Liew, P. W. Y., and Jong, B. C. (2008). Application of rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of microbial diversity in a Malaysian crude oil. Journal of Microbiology and Biotechnology. 18, 815-820.

Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L., and Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplied gene fragment coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 63, 3367-3373.

Regulation (EC) No 178/2002 of the European parliament and of the council. (2002). Official Journal of the European Communities. http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2002/l_031/l_031200 20201en00010024.pdf

Rollins, D. M., Temenak, J. J., Shields, P., and Joseph, S. W. (2003). Microbial pathogenesis laboratory manual. 2nd Edition. Published & Available Online. http://www.life.umd.edu/ classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/GramStain.htm

Shewan, J. M. (1971). The microbiology of fish and fishery products-a progress report. Journal of Applied Bacteriology. 34, 299-315.

Trust, T. J., and Sparrow, R. A. H. (1974). The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Canadian Journal of Microbiology. 20:(9), 1219-1228.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 60, 407-438.

Yang, C.-H., Crowley, D. E., and Menge, J. A. (2001). 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and phytophthora infected avocado roots. FEMS Microbiology Ecology. 35, 129-136.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

http://www.oxoid.com

ภาคผนวก ก.

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิในบ่อเลี้ยง น้ำหนักและความยาวของปลา และประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปลานิลจากแหล่งอื่นในช่วงฤดูฝนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน

Seasons	Weight (g)	Length (cm)	Sample	PCA (cfu/g)	MRS (cfu/g)	Ps agar (cfu/g)	Aero agar (cfu/g)	TCBS (cfu/g)
Rainy (25 °C)	550±20	25.4±3.4	Water	$3.2x10^{1}$	<30	<30	<30	<30
			Skin	$2.6x10^{3}$	$1.0x10^{3}$	$9.8x10^{2}$	$7.7x10^{2}$	<30
			Gill	$5.5x10^{4}$	$2.0x10^{4}$	$7.6x10^{3}$	$6.8x10^{3}$	<30
			Intestine	$2.2x10^{4}$	$1.5x10^{4}$	$3.3x10^{3}$	$3.4x10^{3}$	<30

ตารางที่ 3 แสดงการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลฟาร์ม มทส. และปลานิลจากแหล่งอื่นด้วยการย้อมแกรมแบคทีเรีย และรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้

แหล่งปลานิล	จำนวนโคโลนี (โคโลนี)		รวม (โคโลนี)
	แกรมบวก	แกรมลบ	
ฟาร์ม มทส.	7	27	34
แหล่งอื่น	3	12	15

ตารางที่ 4 แสดงการแปลผันเปอร์เซ็นต์เจลโพลีอะคริลาไมด์, ความเข้มข้น denaturant, ค่าความต่างศักย์และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ชิ้น 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สกัดได้จากตัวอย่างปลานิลจากฟาร์ม มทส. ด้วยวิธี PCR-DGGE

ความต่างศักย์ (V)	เวลา (ชม.)	เจลโพลีอะคริลาไมด์ (%)	ความเข้มข้น denaturant (%)
120	5	8.0	45-55
			30-60
			30-70
		10.0	45-55
			30-60
			30-70
200	12	8.0	45-55
			30-60
			30-70
		10.0	45-55
			30-60
			30-70

ภาคผนวก ข.
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. Aeromonas medium base (Ryan)

	g/liter
Proteose peptone	5.00
Yeast extract	3.00
L. Lysine monohydrochloride	3.50
L. Arginine monohydrochloride	2.00
Sorbitol	3.00
Inositol	2.50
Lactose	1.50
Xylose	3.75
Bile Salts No.3	3.00
Sodium thiosulphate	10.67
Sodium chloride	5.00
Ferric ammonium citrate	0.80
Bromothymol blue	0.04
Thymol blue	0.04
Agar	12.50

pH 8.0 ± 0.2

Ampicillin Selective Supplement

Vial contents (each vial is sufficient for 500ml of medium)	**per vial**	**per liter**
Ampicillin	2.5mg	5.0mg

ละลายอาหาร 29.5 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลายโดยไม่ต้องนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม Ampicillin Selective Supplement ที่ละลายแล้วลงไปผสมให้เข้ากันดีก่อนเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

	g/liter
Casein peptone, tryptic digest	10.00
Meat extract	10.00
Yeast extract	5.00
Glucose	20.00
Tween 80	1.00
K_2HPO_4	2.00
Na-acetate	5.00
$(NH_4)_2$ citrate	2.00
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.20
$MnSO_4 \times H_2O$	0.05
Agar	15.00

pH 6.3 ± 0.2

ละลายอาหาร 62.0 กรัม และ 0.5% $CaCO_3$ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นต้มจนวุ้นละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 12 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3. Plate Count Agar (PCA)

	g/liter
Pancreatic digest of casein	5.00
Yeast extract	2.50
Glucose	1.00
Agar	15.00

pH 7.0 ± 0.2

ละลายอาหาร 23.5 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นต้มจนวุ้นละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. Potato Dextrose Agar (PDA)

	g/liter
Potatoes, infusion from	4.00
Glucose	20.00
Agar	15.00

pH 5.6 ± 0.2

Antibiotic solution (composition per 100ml)

Chlortetracyclin•HCl	0.5g
Chloramphenicol	0.5g

ละลายอาหาร 39.0 กรัมในน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร จากนั้นต้มจนวุ้นละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายยาปฏิชีวนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองลงไป 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5. Pseudomonas agar base

	g/liter
Gelatin peptone	16.00
Casein hydrolysate	10.00
Potassium sulphate	10.00
Magnesium chloride	1.40
Agar	11.00

pH 7.1 ± 0.2

Pseudomonas C-F-C Selective Agar Supplement

Vial contents (each vial is sufficient for 500ml of medium)	**per vial**	**per liter**
Cetrimide	5.0mg	10.0mg
Fucidin	5.0mg	10.0mg
Cephalosporin	25.0mg	50.0mg

ละลายอาหาร 24.2 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรอลลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นต้มจนวุ้นละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ค่อยเติม Pseudomonas C-F-C Supplement ที่ละลายแล้วผสมให้เข้ากันดีก่อนเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

6. Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS)

	g/liter
Yeast extract	5.00
Bacteriological peptone	10.00
Sodium thiosulphate	10.00
Sodium citrate	10.00
Ox Bile	8.00
Sucrose	20.00
Sodium chloride	10.00
Ferric citrate	1.00
Bromothymol blue	0.04
Thymol blue	0.04
Agar	14.00

pH 8.6 ± 0.2

ละลายอาหาร 88.0 กรัมในน้ำกลั่น1 ลิตร จากนั้นต้มจนวุ้นละลายโดยไม่ต้องนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

7. 1.0M Tris-Cl pH 8.0

ชั่ง Tris base 60.5 กรัมจากนั้นเติมน้ำ DI จนกระทั่งปริมาตรเกือบ 500 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่า pH 8.0 จากนั้นเทใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 500 มิลลิลิตร เทใส่ขวดดูแรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

8. 0.5M Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)

ชั่ง EDTA 146.0 กรัมจากนั้นเติมน้ำ DI จนกระทั่งปริมาตรเกือบ 500 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นจนได้ค่า pH 8.0 จากนั้นเทใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 500 มิลลิลิตร เทใส่ขวดดูแรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

9. 5.0M NaCl

ชั่ง NaCl 29.0 กรัมจากนั้นเติมน้ำ DI จนกระทั่งปริมาตรเกือบ 100 มิลลิลิตรจากนั้นคนให้ละลาย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) เพื่อปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวดดูแรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

10. 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 50.0 กรัมจากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 500 มิลลิลิตรจากนั้นคนให้ละลาย แล้วเทใส่ขวดดูแรน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

11. 5.0M Potassium Acetate (KOAC)

ชั่ง KOAC 24.5 กรัมจากนั้นเติมน้ำ DI จนกระทั่งปริมาตรเกือบ 50 มิลลิลิตรจากนั้นคนให้ละลาย แล้วเทใส่ขวด volumetric flask เพื่อปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดดูแรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

12. Extraction Buffer

1.0M Tris-Cl pH 8.0	1.00ml
0.5M EDTA pH 8.0	1.00ml
5.0M NaCl	1.00ml
10% SDS	1.25ml
DI water	5.75ml

ไปเปตสารข้างต้นใส่หลอดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

13. 40% (w/v) Acrylamide/Bis

Acrylamide	38.93g
N-N-methylene-bis acrylamide	1.07g

ชั่งสารข้างต้นแล้วละลายในน้ำ DI ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยในระหว่างละลายสารและการเก็บต้องอยู่ในที่มืดหรือหุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์

14. 50X TAE buffer (per liter)

Tris base	242.0g
Acetic acid glacial	57.1ml
0.5M EDTA pH 8.0	100.0ml

ชั่งและตวงสารข้างต้นแล้วเติมน้ำ DI จนกระทั่งปริมาตรเกือบ 1000 มิลลิลิตรจากนั้นคนให้ละลาย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) เพื่อปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดดูแรนโดยไม่ต้องฆ่าเชื้อ

15. สารละลายความเข้มข้น Denaturant 30% (for 8% polyacrylamide gel per 100ml)

40% Acrylamide/Bis	20.0ml
50X TAE buffer	2.0ml
Formamide	12.0ml
Urea	12.6g

ชั่งและตวงสารข้างต้น ผสมให้เข้ากันแล้วด้วยน้ำ DI เมื่อสารละลายแล้วเทสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดดูแรนที่หุ้มด้วยกระดาษ ฟลอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

16. สารละลายความเข้มข้น Denaturant 60% (for 8% polyacrylamide gel per 100ml)

40% Acrylamide/Bis	20.0ml
50X TAE buffer	2.0ml
Formamide	24.0ml
Urea	25.2g

ชั่งและตวงสารข้างต้น ผสมให้เข้ากันแล้วด้วยน้ำ DI เมื่อสารละลายแล้วเทสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดดูแรนที่หุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns

2. รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี

อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150

e-mail: ketudat@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2531	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2538	Ph.D. (Biology) 4.00
	University of California, San Diego, USA
พ.ศ. 2538	ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
	Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH, Germany

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   - Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
   - Recombinant Protein Production

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี,

7.2 **ผู้ประสานงานชุดโครงการ** การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7.3 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว
- การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย
- การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากมทส รายงานฉบับนี้
- การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ
- การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551
- การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเสนจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus* ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
- การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคสิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
- การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
- การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
- การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. (National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545
- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537

7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

ดูหัวข้อ 7.3

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :

- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว
- สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2552 และได้ดำเนินการไปแล้ว 5%
  - การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย
    - สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2551 และได้ดำเนินการไปแล้ว 50%
- Search for new Glycosyl hydrolases and theirs expression in KDML Rice
  - สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 98%
- Development of biological probes to assure traceability of tilapia from the North East of Thailand
  - สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 98%

Publications:

Ruamkusol, D., and Ketudat-Cairns, M. (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora Suranaree J. Aci Technol 16 (4)

Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B Suranaree J. Aci Technol 16 (4)

Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein Suranaree J. Aci Technol 16 (3) 245-251

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, M. Ketudat-Cairns, R. Parnpai (2009) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos Reprod, Fert and Dev (accepted Oct 2009)

Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2009). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos J Reprod Dev doi:10.1262/jrd.09-135A

Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin Jo. of Sci and Tech 31(4) 395-399

Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M.** (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev accepted May 19th 2008

Phetsom, J., Jung, K., **Ketudat-Cairns, M.,** and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.

Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T ., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. Immediate Publication, doi:10.1042/BJ20070734 16 August 2007

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and. Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Reproduction, Fertility and Development 19(1) 141

Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpong, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned Long- Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62

Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.**, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. Theriogenology. 67(4) 893-900

Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M.**, Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a β-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. Protein Expression and Purification (in press)

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant β-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. Journal of Biotechnology (122) 86-98

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering (27) 399-406 ** *Received Best paper of the year award.* **

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M.**, Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology (64), 1185-1196

Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β-glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5 (1) 51-55

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.

Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. Thai J. of Biot 2 (1): 55-62

Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). Plant Molec. Biol.41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)

Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211

Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100

Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings

Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700

Ueda T, Waverczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709

Paper Presented at National and International Conferences *only Related to this research*

Ruamkuson, D. and Ketudat-Cairns, M. (poster presentation) Seasonal Variation of SUT Tilapia Microbial Community Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology "Biotechnology for Global Care" Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand October 14-17, 2008. page 249-254

Ruamkuson, D. and **Ketudat-Cairns, M.** Microbial Community of SUT Tilapia (poster presentation) Proceeding of the 19th Thai Society for Biotechnology Annual meeting 9-12 October 2007, Pathumthani, Thailand

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ: นางสาวดาราวรรณ ร่วมกุศล

ที่อยู่: 58 หมู่ 9 ต. หนองบัว อ. บ้านฝาง จ. ขอนแก่น 40270

วัน/เดือน/ปีเกิด: 15 พฤษภาคม 2525

ศาสนา: พุทธ

สัญชาติ/เชื้อชาติ: ไทย

ประวัติการวัติศึกษา

- ระดับอุดมศึกษา (ปริญญาตรี) วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) สาขาจุลชีววิทยา
  คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนครขอนแก่น จ. ขอนแก่น

ผลงานและประสบการณ์

- งานผู้ช่วยวิจัยโครงการการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากฟาร์ม มทส. ถึง ปัจจุบัน
- งานผู้ช่วยนักวิจัยโครงการ การคัดแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของไก่พื้นบ้าน
- งานผู้ช่วยนักวิจัยโครงการ การศึกษาและปรับปรุงกระบวนการหมักปลาส้มโดยวิธีดั้งเดิม และวิธีใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์
- รายงานวิจัยปริญญาตรีเรื่อง การแยกหาและศึกษาเชื้อแบคทีเรียซึ่งสร้างกรดแลคติคที่สามารถทน และ/หรือชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง