

กาญจนา ซาหอม : การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. (DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา , 98 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในระบบนิเวศอาหาร โดยเริ่มจากประเมินการใช้ไพรเมอร์ GC567F และ 680R ในการเพิ่ม DNA และ cDNA ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอทั้งหมด 10 สปีชีส์ด้วยวิธีพีซีอาร์ และแยกความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้โพลีอะคลิลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ที่มีเกรเดียนต์ของสารดีเนเจอร์แรนคือยูเรียและฟอร์มาไมด์เข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าเทคนิคดีจีจีอีสามารถแยกแถบ DNA และ cDNA ของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบ DNA และ cDNA ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้จำนวน 2 คู่ คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* เมื่อประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธีในการตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากัน พบว่าเทคนิค PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้เพียง 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* และ *Vibrio alginolyticus* ในขณะที่เทคนิค RT-PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้ถึง 5 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* และเมื่อตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอที่มีชนิดและความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน (แปรค่าตั้งแต่ 10²-10⁵ CFU/ml) พบว่า PCR-DGGE ตรวจพบแถบ DNA ของวิบริโอสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดสองลำดับแรกในกลุ่ม ในขณะที่ RT-PCR-DGGE ตรวจพบแถบ cDNA ของวิบริโอสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์แตกต่างกันได้ถึงห้าลำดับแรกในกลุ่ม ดังนั้นจึงเลือกเทคนิค RT-PCR-DGGE สำหรับประเมินการใช้งานต่อไป เมื่อประเมินผลของสภาวะเซลล์ต่อการตรวจพบวิบริโอด้วยเทคนิคดังกล่าว ได้แก่ สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) เซลล์บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง (IVC) และเซลล์บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) พบว่าตรวจพบแถบ cDNA ของเซลล์จากทุกสภาวะได้ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเซลล์ของ *Plesiomonas shigelloides* ภายใต้ สภาวะ IVC และ PIVC ปรากฏแถบ cDNA มากกว่า 1 แถบ เมื่อประเมินการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE สำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยเติมเซลล์ *Vibrio parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างอาหารที่ปราศจากเชื้อ พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารได้ตั้งแต่ 10² CFU/g และให้ผลที่เป็นไปในแนวทางเดียวกับวิธีมาตรฐาน (FDA-BAM, 2004) และเมื่อประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเชื้อวิบริโอในอาหาร จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ารูปแบบของวิบริโอที่ตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานร้อยละ 100 จำนวน 3 ตัวอย่าง ร้อยละ 75 จำนวน 1 ตัวอย่าง ร้อยละ 50 จำนวน 6 ตัวอย่าง และให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน จำนวน 4 ตัวอย่าง

5471914023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY KEYWORDS: RT-PCR-DGGE / VIBRIO SPP.

KANCHANA CHAHORM: DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS. ADVISOR: ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 98 pp.

The aim of this research was to evaluate the feasibility of an application of PCR-DGGE and RT-PCR-DGGE techniques for detection of *Vibrio* species in the ecosystem of foods. Primers GC567F and 680R were initially evaluated for amplification of DNA and cDNA of ten references *Vibrio* species by PCR method. The GC-clamp PCR amplicons were separated according to their sequences by the DGGE using 10% (w/v) polyacrylamide gel with a denaturing gradient from 45 to 70% of urea and formamide. The results showed that DNA and cDNA band of *Vibrio* species could be separated by DGGE technique. Two pair of *Vibrio* species, which could not be differentiated on gel were *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* and *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*. Apparently, DNA and cDNA amplicons of all ten *Vibrio* species separated by PCR-DGGE and RT-PCR-DGGE method gave the same migratory patterns on DGGE gel. For the detection limit evaluation, in the community of 10 reference strains containing the same viable population, distinct DNA bands of 3 species; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio alginolyticus* were consistently observed by PCR-DGGE technique. Furthermore, 5 species; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio fluvialis* consistently observed by RT-PCR-DGGE technique. In the community containing different viable population decreasing from 10² to 10⁵ CFU/ ml. PCR-DGGE analysis only detected the two most prevalent species, while RT-PCR-DGGE detected the five most prevalent species. Therefore, RT-PCR-DGGE technique was selected for further evaluation. RT-PCR-DGGE technique were evaluated in detection of various *Vibrio* cell conditions such as viable cell (VC), injured cells from frozen (IVC) and injured cells from frozen with pre-enrichment (PIVC). It was found that cDNA band of all cell conditions gave the same migratory patterns excepted that multiple cDNA bands of *Plesiomonas shigelloides* under IVC and PIVC conditions were found. When RT-PCR-DGGE was evaluated in detection of *Vibrio parahaemolyticus* spiked food samples, it could detect *Vibrio parahaemolyticus* in food containing at least 10² CFU/g. The results obtained also corresponded to standard method (FDA-BAM, 2004). When RT-PCR-DGGE was applied in detection of *Vibrios* in fourteen food samples, the vibrio profiles were detected, which were 100 % similar to the standard method (observed in 3 samples), 75% and 50% observed in 1 and 6 samples, respectively and totally different (0%) observed in 4 samples.