Thesis Title Detection of Contaminated *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Export Vegetable Production by Molecular Biology Techniques

Author Ms. Piyamat Somphee

Degree Doctor of Philosophy
(Soil Science and Natural Resources Management)

Thesis Advisory Committee

Dr. Arawan Shutsrisung	Advisor
Dr. Choochad Santasub	Co-advisor
Prof. Dr. Saisamorn Lumyoung	Co-advisor

ABSTRACT

Escherichia coli and *Salmonella* spp infections associated with vegetables crops have occurred with increasing frequency in recent years. Contaminated manure and polluted irrigation water are probable carriers for the pathogen in cropping systems. Therefore, the contaminated fresh vegetables exporting to EU markets are the major accusation in obstruction. In order to reduce an obstruction, guideline for decontamination and development the methods for detection of both pathogens were the aim of this study. Since conventional methods for detection of both pathogenic bacteria require several days and labors, molecular biology technique is ideally appropriate solution. The research works consisted of 1) comparison of detection methods included BAM, 3M Petrifilm and real-time PCR with pure cultures of *E. coli* ATCC 25922 and *S. typhimurium* ATCC 13311 were derived from the Department of Medical Science, Ministry of Public Health of Thailand. The agricultural of 100 samples of vegetables, soils, waters, organic fertilizers and animal feces (26, 32, 17, 9 and 16 samples, respectively) were also determined for contamination. 2) quantification of contamination of both pathogens in composted animal manure and effect of composting on dynamic population of both pathogens. Composting of two materials; poultry layer and cow feces were carried out and quality comparison was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

done between composted and non-composted manures. Sample collections and determination of treatments for *E. coli* and *Salmonella* spp. were evaluated at interval of 1, 3, 5, 7, 14, 21, 35, 42, 56, 70, 84, 96, 112, 126 and 140 days. Materials quality changing included C:N ratio, electrical conductivity (EC), organic matter (%OM), temperature (Tm) and pH values, and decreasing of both pathogens were statistical evaluation of treatment effects by Peason's correlation. 3) dynamic population of both pathogens was periodically examined after composted cow manure application for vegetable growing under natural environmental conditions. In the last consequence experiment, split-plot block design was carried out. Types of vegetables; asparagus, kale, coriander, stink weed and peppermint were assigned for main plots. Subplots were the application of composted cow manure, non-composted cow manure and without manuring.

Real-time PCR assessment was not significantly different from plate count techniques as BAM and 3M Petrifilm methods. It also showed high sensitivity (100%) on counting pure culture samples. Additionally, this method reduced materials, area, labor, time and device. Completely decontamination of *E. coli* and *Salmonella* spp. in poultry layer and cow feces composting were occurred at 70 to 98 days, respectively. Composting of manures reduced the values of C:N, %OC, %OM and pH of the materials whereas EC values became higher with time of composting duration. On the other hand, temperature in the two composted materials reached highest at 66.7 and 60.3°C after incubation for 1 to 14 days. Thereafter, it consequently declined until becoming stable similar to that of nearby environment. Decreasing of both microbes was significantly correlated with the change of all mentioned factors.

Although, application of composted cow manure for growing vegetables had decontaminated *E. coli* in soil and vegetables but it still appeared in non composted manure treatments. For *Salmonella* spp., contamination was found in all soil samples but it was not infected on vegetables. Similar results in non composted manure were found the same as *E. coli.* In conclusions, the real-time PCR could be an alternative appropriate tool for detection of *E. coli* and *Salmonella* spp. contamination in agricultural samples. Moreover, from this finding we ensure that composting of animal manure, especially chicken layer and cow manure, for 70 to 98 days before

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

using as organic fertilizer for vegetables cultivation can be absolutely decontamination of both pathogenic bacteria. Thus, the products will be safe for producers and consumers and the quality is qualified for export as well.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบการปนเปื้อน *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ในการผลิตผักส่งออกโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

ผู้เขียน นางสาวปิยะมาศ โสมภีร์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
(ปฐพีศาสตร์และการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ดร. ชูชาติ สันธทรัพย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อสาเหตุของโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และกำลังเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการส่งออก เนื่องจากมีการปนเปื้อนไปกับผักสดที่ส่งไปยังสหภาพยุโรป ทำให้สินค้าผักสดของไทยถูกระงับการส่งออก ดังนั้นก่อนการส่งออกต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดนี้ก่อน แต่เนื่องจากวิธีการตรวจสอบตามวิธีดั้งเดิมใช้เวลานาน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อน และลดการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ตั้งแต่กระบวนการผลิต โดยมีวิธีการคือ 1) เปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิด โดยใช้วิธี real-time PCR เปรียบเทียบกับ วิธีBAM และ 3M Petrifilm ทำการทดสอบกับตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* ATCC 13311 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบกับตัวอย่างทางการเกษตร จำนวน 100 ตัวอย่าง คือ ผัก ดิน น้ำ ปุ๋ยอินทรีย์ และ มูลสัตว์ (26, 32, 17, 9, และ 16 ตัวอย่าง ตามลำดับ) 2) หาปริมาณการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดในมูลสัตว์หมักและผลกระทบของการหมักต่อจำนวนประชากรของเชื้อทั้งสองชนิด โดยทำการหมักวัสดุรองพื้นคอกไก่ และมูลวัว เปรียบเทียบกับวิธีการไม่หมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 1, 3, 5, 7, 14, 21, 35, 42, 56, 70, 84, 96, 112, 126, และ 140 วัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิด และศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของวัสดุ คือ สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ความสามารถในการนำไฟฟ้า (EC) เปอร์เซ็นต์อินทรีย์คาร์บอน (%OC) เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ (%OM) อุณหภูมิ (Tm) และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติโดย Peason's Correlation 3) ศึกษาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลดการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดจากการใช้มูลวัวหมักกับการปลูกผักเพื่อการส่งออก วิธีการคือ วางแผนการทดลองแบบ split plot block design มีปัจจัยหลักคือ ชนิดของพืช (หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชี-ไทย ผักชีฝรั่ง และ สะระแหน่) ปัจจัยรอง คือ การใส่มูลวัวหมัก การใส่มูลวัวไม่หมัก และไม่ใส่มูล-วัว ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินทุก 7, 21, 35 และ 45 วัน ส่วนตัวอย่างพืชเก็บที่ระยะ 49 วันเท่านั้น นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิด ผลการทดลองพบว่า 1) วิธี real-time PCR สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับการนับด้วยวิธี plate count และสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนทั้งสองชนิดในตัวอย่างทางการเกษตรได้ โดยให้ค่าความไวที่สูง (100%) สามารถลดการใช้วัสดุ พื้นที่ แรงงาน เวลา และเครื่องมือ ลงได้ วิธีการนี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับวิธี BAM และ 3M Petrifilm 2) จากการทดลองการหมักวัสดุรองพื้นคอกไก่ และมูลวัว ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิด เมื่อหมักวัสดุทั้งสองชนิดนาน 70 ถึง 98 วัน และผลของการหมักทำให้ C:N, %OC, %OM และ pH ลดลง และทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นในช่วง 1 ถึง 14 วัน (66.7°C และ 60.3°C) หลังจากนั้นอุณหภูมิค่อยๆลดลงจนไม่แตกต่างจากอุณหภูมิภายนอก ส่วน EC สูงขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก และพบว่าการลดลงของปริมาณเชื้อมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับทุกปัจจัย 3) หลังจากนำมูลวัวที่ผ่านกระบวนการหมักที่สมบูรณ์แล้วมาใส่ร่วมกับการปลูกผัก 5 ชนิด ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทย สะระแหน่ และผักชีฝรั่ง พบว่า การใส่มูลวัวหมักไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ทั้งในตัวอย่างดิน และตัวอย่างผักทุกชนิด ขณะที่การใส่มูลวัวที่ไม่มีการหมัก มีการปนเปื้อนเชื้อนี้ในดินทุกระยะของการตรวจสอบ รวมทั้งในตัวอย่างผักด้วย ยกเว้นสะระแหน่ สำหรับ *Salmonella* spp. มีการปนเปื้อนในตัวอย่างดินปลูกพืช แต่ไม่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างพืชทั้ง 5 ชนิด โดยสรุปแล้ว สามารถนำผลการประเมินปริมาณเชื้อด้วยวิธี real-time PCR ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ได้ และก่อนที่จะนำมูลสัตว์มาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์กับการปลูกพืชผักควรหมักก่อนอย่างน้อย 70 ถึง 98 วัน เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิด ทำให้ผลผลิตผักมีความปลอดภัย และมีคุณภาพเหมาะแก่การส่งออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved