ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาดีเอ็นเอของเอสเชอริเชีย โคไล ที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และบริเวณใกล้เคียง

ผู้เขียน นายคลนชัย ยาวิชัย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว

บทคัดย่อ

น้ำมีบทบาทอย่างมากในชีวิตประจำวัน เนื่องจากมีความสำคัญในกระบวนการ เมทาบอลิ - ซึมของร่างกาย ดังนั้นน้ำที่นำมาบริโภคไม่ควรมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเช่น เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ดังนั้นจึงใช้เชื้อ *E. coli* เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในน้ำดื่ม ในงานวิจัยครั้งนี้ทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำโดยตรงใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อ *E. coli* โดยเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าได้ PCR product ขนาด 582 bp จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *E . coli* เท่านั้น โดยความไวของ PCR ในการตรวจพบเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ได้น้อยที่สุดคือ 4.29 x 10^0CFU/ml และปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจพบน้อยที่สุด 10 pg เมื่อทำการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำ 63 ตัวอย่างคือ ตัวอย่างน้ำจากโรงเรียนภายในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 23 ตัวอย่าง น้ำตู้กด 10 ตัวอย่าง น้ำบรรจุขวด 10 ตัวอย่าง และน้ำแข็ง 20 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค PCR และเทคนิคทางชีวเคมี พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลที่ตรงกันคือพบเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง 11 ตัวอย่าง คือ I-3, I-4, I-6, I-10, I-11, I-12, I-13, I-15, I-16, I-17 และ I-18 ดังนั้นการใช้เทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มนั้นเป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำให้ลดระยะเวลาขั้นตอนในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย และยังเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง จากนั้นนำ PCR product ของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำ เชื้อ *E. coli* O157: H7 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR*II, *Hae*III และ *Rsa*I พบว่ารูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำ มีแถบดีเอ็นเอคล้ายกับเชื้อ *E. coli* O157: H7 และเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อโดยรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างคือ ตัวอย่าง I-6, I-10 และ I-15 เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของเชื้อ *E. coli* O157: H7 และ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 ตัวอย่างมีความแตกต่างกันโดยมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ โดยตัวอย่าง I-6 พบความแตกต่างของ นิวคลีโอไทด์ที่บริเวณตำแหน่งที่ 103, 104, 105, 106, 166, 480, 487, 501, 507, 521, 528 และ 532 มีการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 107 ในตัวอย่าง I-10 พบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณตำแหน่งที่ 103, 104, 105, 106 และ 605 มีการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งที่ 107 และตัวอย่าง I-15 พบความแตกต่างของ นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งที่ 235, 259, 538, 544, 545 และ 547 มีการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 173 และเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่มของ Enteroaggregative *E. coli*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Detection of *Escherichia coli* DNA Contaminated in Drinking Water in Chiang Mai University and Its Vicinity

Author Mr. Donachai Yawechai

Degree Master of Science (Biology)

Thesis Advisor Assistant Professor Dr. Yingmanee Tragoolpua

ABSTRACT

Water plays a major role in daily life since it is essential in body metabolic processes. Therefore, drinking water should not be contaminated with bacteria such as *Escherichia coli*. Some strains cause diarrhea in both children and adults. Thus, *E. coli* has been marked as an indicator for monitoring of potential enteric pathogens in drinking waters. In this study, polymerase chain reaction (PCR) was applied directly to detect *E. coli* DNA contaminated in water. DNA region in 16S rRNA gene of *E. coli* was amplified using specific primers comparing with standard culture of *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* and *Pseudomonas aeruginosa*. The result showed that 582 bp PCR product was amplified. The sensitivity of the PCR assay to detect *E. coli* DNA was 10 pg/ml and amount of *E. coli* cells could be detected even 4.29x 10^6 CFU/ml. Sixty three drinking water samples including 23 water samples from schools in Chiang Mai, 10 samples of filtered water from selling machines, 10 samples of bottles of water and 20 samples of ice were detected for *E. coli* DNA directly by PCR and biochemical test. Eleven samples of water; I-3, I-4, I-6, I-10, I-11, I-12, I-13, I-15, I-16, I-17 and I-18 were contaminated with *E. coli* after detection by PCR technique. Therefore, the PCR technique to determined *E. coli* contamination in drinking water is a rapid method, reduce the time consuming and steps for bacterial detection, and this technique is also a high accuracy

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

method. The PCR results were the same as obtained when using biochemical tests. PCR products of contaminated *E. coli* in water, *E. coli* O157:H7 and standard *E. coli* ATCC 25922 were then cleaved by appropriate restriction enzyme; *Eco*RII, *Hae*III and *Rsa*I. It was found that, restriction patterns of contaminated *E. coli* in water were similar to *E. coli* O157:H7 and *E. coli* ATCC 25922. Thus, restriction patterns could not differentiate between each sample. However, nucleotide sequences of *E. coli* in contaminated water; I-6, I-10 and I-15 were compared with 16S rRNA nucleotide sequences *E. coli* O157: H7 and *E. coli* ATCC 25922. It was found that nucleotide sequences of I-6 were different at the position 103, 104, 105, 106, 166, 480, 487, 501, 507, 521, 528, 532 and deletion at position 107. Nucleotide sequences of I-10 were different at position 103, 104, 105, 106 and 605 and deletion at position 107. Nucleotide sequences of I-16 were different at position 235, 259, 538, 544, 545, 547 and deletion at position 173. Moreover 3 isolates were identified as enteroaggregative *E. coli*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved