ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47201

DETECTION OF CONTAMINATED *Escherichia coli* AND *Salmonella* spp. IN EXPORT VEGETABLE PRODUCTION BY MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

PIYAMAT SOMPHEE

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN SOIL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES MANAGEMENT

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JULY 2011

b00254097

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47201

DETECTION OF CONTAMINATED *Escherichia coli* AND *Salmonella* spp. IN EXPORT VEGETABLE PRODUCTION BY MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

PIYAMAT SOMPHEE

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATED SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN SOIL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES MANAGEMENT

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JULY 2011

DETECTION OF CONTAMINATED *Escherichia coli* AND *Salmonella* spp. IN EXPORT VEGETABLE PRODUCTION BY MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

PIYAMAT SOMPHEE

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN SOIL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES MANAGEMENT

EXAMINING COMMITTEE

Somporn Choonluchanon ..... CHAIRPERSON
Assc. Prof. Dr. Somporn Choonluchanon

Arawan Shutsrirung ..... MEMBER
Dr. Arawan Shutsrirung

Ch. Santasup ..... MEMBER
Dr. Choochad Santasup

Saisamorn Lumyong ..... MEMBER
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong

Thaworn Onpraphai ..... MEMBER
Asst. Prof. Dr. Thaworn Onpraphai

THESIS ADVISORY COMMITTEE

Arawan Shutsrirung ..... ADVISOR
Dr. Arawan Shutsrirung

Ch. Santasup ..... CO-ADVISOR
Dr. Choochad Santasup

Saisamorn Lumyong ..... CO-ADVISOR
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong

6 July 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENT

The author would like to express the deepest appreciation to her advisor, Dr. Arawan Shutsrirung for guidance and valuable suggestions. I also would like to express my appreciation to Assoc. Prof. Dr. Somporn Choonluchanon and Dr. Choochad Santasup for academic guidance and valuable suggestions. I appreciated Prof. Dr. Saisamorn Lumyong and Asst. Prof. Dr. Thaworn Onpraphaithe member of thesis committee for they valuable advice.

Very special thanks are due to my friends for helping in the experiment.

I would like to express my wholeheartedly thanks my family for their will power.

I would like to thank Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives.

This thesis is partially supported by the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE)

Piyamat Somphee

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

E 47201

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

E47201

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

E 47201

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.

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

E 47201

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 หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบกับตัวอย่างทางการเกษตรจำนวน 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

E47201

ลดการปนเปื้อนเชื้อทั้งสองชนิดจากการใช้มูลวัวหมักกับการปลูกผักเพื่อการส่งออก วิธีการคือ วางแผนการทดลองแบบ split plot block design มีปัจจัยหลักคือ ชนิดของพืช (หน่อไม้ฝรั่ง คะน้า ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง และ สะระแหน่) ปัจจัยรอง คือ การใส่มูลวัวหมัก การใส่มูลวัวไม่หมัก และไม่ใส่มูลวัว 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

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	vii
TABLE OF CONTENS	ix
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	4
2.1 Quarantine of export fresh vegetables	4
2.2 Characteristic and pathogenesis of *E. coli*	5
2.2.1 Biological and biochemistry	5
2.2.2 Pathogenesis of *E. coli*	7
2.2.3 Epidemiology of gastrointestinal infection	9
2.3 Characteristic and pathogenesis of *Salmonella* spp.	12
2.3.1 Biological and biochemistry	12
2.3.2 *Salmonella* nomenclature	13
2.3.3 Antigenic structure	14
2.3.4 Pathogenesis of *Salmonella* infections in humans	15
2.4 Source of *E. coli* and *Salmonella* spp.	18
2.5 Methods for detection of *E. coli* and *Salmonella* spp.	19
2.5.1 Conventional methods for detection of *E. coli* and *E. coli* O157	19
2.5.2 Conventional methods for detection of *Salmonella* species	23
2.5.3 Rapid methods for detection of *E. coli* and *E. coli* O157	27
2.5.4 Rapid methods for detection of *Salmonella* spp	38
2.6 Sources of pathogenic organisms in agricultural products	50
2.6.1 Enteropathogenic *E. coli*	52

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

		Page
2.6.2	*Salmonella* spp.	53
2.7	Composting of animal manures	55
2.7.1	Composting process	55
2.7.2	Compost microorganism	59
2.7.3	Types of composting systems	60
2.7.4	Factors affecting composting	62
2.7.5	Maintaining a compost pile	63
2.7.6	Intrinsic and extrinsic properties of the composting process to control foodborne pathogens	64
CHAPTER III	MATERIALS AND METHODS	68
3.1	Comparison of *E. coli* and *Salmonella* spp. detection methods	68
3.1.1	Enumeration of pure culture	68
3.1.2	Enumeration of *E. coli* contaminated in agricultural samples	73
3.1.3	Sensitivity and specificity	82
3.1.4	Statistical analysis	82
3.2	Effect of composting animal manure on dynamic population of *E. coli* and *Salmonella* spp.	82
3.2.1	Experimental setup	82
3.2.2	Materials handling	82
3.2.3	Isolation and enumeration of *E. coli* and *Salmonella* spp.	83
3.2.4	Change in quality of materials	83
3.2.5	Statistical analysis	83
3.3	Reduction of contaminated *E. coli* and *Salmonella* spp. by application of composted cow manure in export vegetables	84
3.3.1	Experimental setup	84
3.3.2	Plants bed preparation	84
3.3.3	Vegetable production	84
3.3.4	Sample collection	86

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

		Page
3.3.5	Bacterial analyses	87
3.3.6	Measuring fresh and dry weight of vegetables	87
3.3.7	Statistical analysis	87
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSIONS		88
4.1	Comparison of *E. coli* and *Salmonella* spp. detection methods	88
4.1.1	Enumeration of pure culture	88
4.1.2	Enumeration of *E. coli* contaminated in agricultural samples	89
4.1.3	Percentage of the sensitive and specific method of 3M Petrifilm and RT-PCR compared to BAM method	96
4.1.4	Comparison of procedure steps, time consuming, and budget application among conventional, 3M Petrifilm, and RT-PCR techniques	98
4.2	Quantification of the contamination of *E. coli* and *Salmonella* spp. in animal manure compost and effect on dynamic population of both species	101
4.2.1	Dynamic population of *E. coli* and *Salmonella* spp. in compost and non compost poultry layer and cow manures	101
4.2.2	Factors affecting correlation efficient on dynamic population of *E. coli* and *Salmonella* spp. in composted and non composted poultry layer and cow feces	103
4.3	Reduction of *E. coli* and *Salmonella* spp. in export vegetables with application of cow manure compost	111
4.3.1	Contamination of *E. coli* in soil and vegetables under manures application	111
4.3.2	Interaction between types of vegetables and manures application on contamination of *E. coli*	111
4.3.3	Contamination of *Salmonella* spp. in soil samples and on vegetables	113
4.3.4	Effect of manures on fresh and dry weight of vegetables	116

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

	Page
CHAPTER V CONCLUSION	119
REFERENCES	121
CURRICULUM VITAE	139

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Enteric *E. coli* (EC) are classified on the basis of serological characteristics and virulence properties	11
2	Comparison of Quantitray, MPN and MF techniques	22
3	Isolation and detection of *Salmonella*	28
4	Prevalence of Enteric pathogens in humans, cattle, pigs and poultry	51
5	Agricultural samples collected at various locations	74
6	Comparison of *E. coli* ATCC 25922 and *S. typhimuriun* ATCC 1311 population in Plate count, BAM, 3M Petrifilm, and RT-PCR cultivation techniques	88
7	Monitoring of *E. coli* and *Salmonella* spp. detected by BAM, 3M-Petrifilm and RT-PCR methods in agricultural samples	91
8	Significant correlation of *E. coli* population counted by conventional, 3M Petrifilm, and RT-PCR techniques in 100 agricultural tested samples	94
9	Sensitivities and specificities of various test methods for detection of *E. coli* and *Salmonella* spp. in 100 samples using BAM method as a reference	98
10	Working steps and time consuming of *E. coli* and *Salmonella* spp. detected by BAM and RT-PCR methods in one sample with triplicate	100
11	Dynamic population of *E. coli* and *Salmonella* spp. in each periodical sampling of composted and non-composted poultry layer and cow feces	103
12	Correlation (Pearson) of *E. coli* in poultry layer and cow manure both in composting and non-composting on various factors at 1 to 140 days	110
13	Effect of manures application on contamination of *E. coli* in soil and vegetables	111
14	Interaction between types of vegetables and manures application on contamination of *E. coli*	112

LIST OF TABLES (CONTINUED)

Table		Page
15	Contamination of *Salmonella* spp. contaminated in soil and plants applied with composted cow manure and non-composted cow manure	114
16	Application of manures on fresh and dry weight of vegetables	117
17	Approximate nutrient composition of various types of animal manure and compost (all values are on a fresh weight basis)	118

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	*E. coli* bacteria, the most prevalent Gram-negative flora in the intestine	6
2	*Salmonella typhi*, the agent of typhoid. Gram stain	13
3	Changing of C:N ratio of composted and non-composted materials, the error bars represent the standard error	105
4	Changing of EC of composted and non-composted materials, the error bars represent the standard error	106
5	Changing of OM of composted and non-composted materials, the error bars represent the standard error	107
6	Changing of temperature of composted and non-composted materials, the error bars represent the standard error	108
7	Changing of pH of composted and non-composted materials the error bars represent the standard error	110