

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380297

ชื่อโครงการ: การพัฒนาวิธีตรวจวัด *Bacteroides*-infecting bacteriophages ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอ เพื่อการบ่งชี้การปนเปื้อนของแหล่งน้ำจากสิ่งปฏิกูลจากคน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

อีเมล: kwanrawee@cri.or.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ: ด้วยข้อจำกัดของการใช้แบคทีเรียชี้แนะกลุ่มดั้งเดิม (Traditional Fecal Indicators) เป็นมาตรฐานทางชีววิทยาของคุณภาพน้ำ จึงมีการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพน้ำทางชีววิทยาได้ดี หนึ่งในนั้นคือเฟจของแบคทีเรีย *Bacteroides* (bacteriophages of *Bacteroides*) งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอของเฟจของแบคทีเรีย *Bacteroides* สำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลจากคนและมูลสัตว์ในแหล่งน้ำของประเทศไทย จากการตรวจหาเฟจชนิด ATCC 51477-B1 และ ATCC 700786-B1 ในน้ำเสียที่เกิดจากคนและสัตว์ในประเทศไทย พบเฟจ ATCC 51477-B1 ในน้ำที่มีสิ่งปฏิกูลจากคนปนเปื้อน โดยตรวจไม่พบหรือพบเฟจชนิดนี้ในปริมาณต่ำมากในตัวอย่างน้ำที่ได้จากสัตว์ แสดงให้เห็นว่าเฟจชนิด ATCC 51477-B1 มีความจำเพาะกับคน ส่วนเฟจชนิด ATCC 700786-B1 ตรวจพบได้บ่อยกว่าในน้ำ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีที่ใช้แยกเฟจชนิด ATCC 51477-B1 ออกจากเฟจชนิด ATCC 700786-B1 ด้วยการหาลำดับเบสที่จำเพาะกับเฟจชนิด ATCC 51477-B1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ และการวิเคราะห์หาลำดับเบส จากนั้นทำการพัฒนาวิธี PCR ขึ้นใหม่ และนำมาทดสอบกับน้ำเสียตัวอย่างจากคนและจากสัตว์ พบว่า วิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ไม่สามารถตรวจพบเฟจ ATCC 51477-B1 ได้แม้ในตัวอย่างที่มีปริมาณเฟจ 257 PFU ต่อ 100 มิลลิลิตร นอกจากนี้ การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliforms) และอีโคไล (*E. coli*) กับเฟจชนิด ATCC 51477-B1 กล่าวคือในน้ำเสียตัวอย่างเดียวกัน พบแบคทีเรียดังกล่าวจำนวนมาก แต่กลับไม่พบเฟจ ATCC 51477-B1 เลยทั้งในการวัดด้วยวิธีเพาะเลี้ยงและวิธี PCR ผลการศึกษานี้เป็นการต่อยอดองค์ความรู้ในด้านการตรวจหาที่มาของการปนเปื้อนของแหล่งน้ำด้วยจุลินทรีย์ (microbial source tracking) และเป็นประโยชน์ต่อการจัดการน้ำและการควบคุมมลพิษในแหล่งน้ำต่อไป

คำหลัก : การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูล, คุณภาพน้ำ, การตรวจหาที่มาของการปนเปื้อนของแหล่งน้ำด้วยจุลินทรีย์, เฟจของแบคทีเรีย *Bacteroides*, เทคนิคพีซีอาร์

Abstract

Project Code: MRG5380297

Project Title: Development of a DNA-based method for bacteriophages of *Bacteroides* for tracking human-derived fecal pollution in water sources

Investigator: Kwanrawee Sirikanchana, PhD., Chulabhorn Research Institute

E-mail Address: kwanrawee@cri.or.th

Project Period: 2 years

Abstract: Traditional fecal indicators, including a group of coliforms (total and fecal), *E. coli*, and enterococci have many shortcomings that have directed researchers and authoritative parties to discovering new group(s) of indicators. There have been efforts to study several organisms as new groups of fecal indicators, among of which are bacteriophages of *Bacteroides*. The ultimate goal of this research project was to develop a new and rapid DNA-based method to measure phages of *Bacteroides* for a purpose of identifying human-derived fecal pollution in water sources. Firstly, to determine the presence of *Bacteroides* phages in Thailand, the strains ATCC 51477-B1 and ATCC 700786-B1 were enumerated in wastewater samples. Phage ATCC 51477-B1 was positively detected in some human-derived wastewater samples, but was found at very low levels, if not absent, in animal-derived samples. This implies that phage ATCC 51477-B1 is specific to human sources. Secondly, since a non-specific strain (ATCC 700786-B1) was found more prevalently in water, it is important for the newly-designed DNA-based assay not to pick up this non-specific phage strain as well. The DNA regions of phage strain ATCC 51477-B1 that were not present in phage strain ATCC 700786-B1 were therefore determined using molecular techniques such as restriction enzyme digestion, DNA sequencing and sequence analysis. After that, the PCR primers were designed, the PCR reaction components and cycling conditions were optimized, and the PCR method detection limit was determined. Thirdly, the newly-designed PCR method was used with human- and animal-derived wastewater samples to detect phage ATCC 51477-B1. The results indicated that the amount of phage ATCC 51477-B1 of up to 257 PFU/100 ml in wastewater samples was not detected by the PCR assay. Lastly, traditional fecal indicators, i.e., total coliforms and *E. coli*, enumerated in the same set of water samples showed high concentrations, while phage strain ATCC 51477-B1 was not detected in most samples by both the culture method and the PCR assay. Therefore, no correlation was observed. This information helps to advance the knowledge in the field of microbial source tracking that will eventually facilitate in water management and pollution control of water sources.

Keywords: Fecal contamination, water quality, microbial source tracking, bacteriophages of *Bacteroides*, PCR