

ความปลอดภัยของน้ำนมดิบจากฟาร์มคณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
Safety of Raw Milk from the Dairy Farm of Faculty of Agricultural
Technology Rajamangala University of Technology Thanyaburi

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ชรินทร์ รัตนสิน¹, สุภาพ เหมือนกล้า², ส่งศักดิ์ ศรีสง่า³

Received: August 2008; Accepted: February 2009

บทคัดย่อ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่กำลังให้นมจำนวน 13 ตัว โดยคละอายุ และคละระยะเวลาการให้นม จากฟาร์มคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมจำนวน 13 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ รวมจำนวนตัวอย่างน้ำนมทั้งสิ้น 78 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความปลอดภัยโดยการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อน ผลการตรวจสอบพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด อยู่ระหว่าง 5.11 - 8.18 log CFU/ml ส่วนเชื้อ *Enterococci*, *Lactic acid bacteria*, *Bacillus* และ *Staphylococcus aureus* มีจำนวนอยู่ระหว่าง 4.14-6.53, 4.22-6.42, 5.67-8.43 และ 4.15-6.52 log CFU/ml ตามลำดับ สำหรับการตรวจหาเชื้อ Coliform, Fecal coliform และ *Escherichia coli* พบว่ามีจำนวนต่างกันมากในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง มีจำนวนอยู่ระหว่าง 1.87-5.20, 0.30-5.17 และ 0.30-4.74 log MPN/100 ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Salmonella* ตรวจไม่พบในทุกตัวอย่างน้ำนมดิบในการศึกษาครั้งนี้

คำสำคัญ : แบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด ปนเปื้อน น้ำนมดิบ

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ ศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (โดยความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Raw milk samples were collected from 13 lactating cows (mixed ages and duration of lactating) from the dairy farm of Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi. The samples were collected once every 2 weeks. All 78 samples were studied for safety by enumeration for bacterial contamination. The results found total viable bacteria log 5.11 - 8.18 CFU/ml. Amounts of *Enterococci*, *Lactic acid bacteria*, *Bacillus* and *Staphylococcus aureus* were log 4.14-6.53, 4.22-6.42, 5.67-8.43 and 4.15-6.52 CFU/ml., respectively. While Coliform, Fecal coliform and *Escherichia coli* numbers varied from log 1.87-5.20, 0.30-5.17 and 0.30-4.74 MPN/100 ml., respectively. Salmonella was not found in this study.

Key words : total viable bacteria contamination raw milk

บทนำ

น้ำนมโคเป็นแหล่งอาหารที่มีประโยชน์ต่อทั้งคนและสัตว์ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางโภชนาการที่ครบถ้วน และเนื่องจากมีส่วนประกอบที่ใกล้เคียงกับน้ำนมของคนมาก จึงมีการใช้เป็นอาหารสำหรับทารกโดยใช้แทนนมแม่หลังการหย่านม และทารกบางคนยังสามารถบริโภคน้ำนมโคได้ตั้งแต่แรกเกิด ปัจจุบันมีการรณรงค์ให้มีการดื่มนมเพื่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น กลุ่มผู้บริโภคน้ำนมโคที่สำคัญคือ เด็กวัยเจริญเติบโต ผู้สูงอายุ สตรีมีครรภ์และผู้ป่วย ดังนั้นน้ำนมโคที่จะนำมาใช้ในการบริโภคจึงต้องมีคุณภาพดี มีการผลิตที่ได้มาตรฐานและปราศจากสิ่งปนเปื้อนต่างๆ เพื่อสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภค

สิ่งปนเปื้อนที่พบในน้ำนมมีได้หลายอย่าง เช่น สารพิษ ยาต้านจุลชีพตกค้าง และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ ไวรัสและแบคทีเรีย ซึ่งแต่ละอย่างก็มีอันตรายต่อทั้งคนและสัตว์ที่กินเข้าไป เช่น การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะไปเป็นพิษต่อตับในเด็กและสัตว์วัยอ่อน และสามารถก่อมะเร็งในคนได้ (อรวรรณ นวีภาพ, 2540) ส่วนการปนเปื้อนสารต้านจุลชีพตกค้าง ก็อาจเป็นผลทำให้เกิดการแพ้ยา เป็นผื่นแดง หายใจขัด และอาจทำให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้ หรืออาจทำให้เกิดภาวะดื้อยาต้านจุลชีพ การปนเปื้อนที่สำคัญและพบได้บ่อยในน้ำนมก็คือ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไวรัสและแบคทีเรีย ไวรัสที่ติดต่อผ่านทางน้ำนมไปสู่คน เช่น FMD virus เมื่อติดเชื้อมักจะปรากฏอาการเกิดเม็ดตุ่มใส

บริเวณตำแหน่งที่เชื้อเข้าหรือที่เยื่อเมือกในปาก ต่อมา จะเกิดเม็ดตุ่มขนาดที่ 2 ขึ้นที่ในปาก มือและเท้าตามมา (Acha and Szyfres, 1987) สำหรับการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคได้โดยการติดโรคผ่านทางน้ำนม ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Bacillus* เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมนี้จะทำให้คุณภาพของน้ำนมเสียไป และอาจเกิดอันตรายโดยตรงกับผู้บริโภค โดยอาจทำให้เกิดอาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง มีไข้ ปวดศีรษะ ปวดตามตัว (Limon, 2007) และในรายที่ติดเชื้อ *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogens* อาจเกิดอาการอย่างรุนแรงและในบางรายอาจถึงแก่ชีวิตได้ (สุมนธนา วัฒนสินธุ์, 2545) ปัจจุบันมีการนำน้ำนมดิบมาต้มก่อนการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งการกระทำดังกล่าวจะยิ่งเป็นการเพิ่มความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนม เพราะมีแบคทีเรียในกลุ่มที่ทนร้อนหลายชนิดที่ยังสามารถปนเปื้อนในน้ำนมได้ เช่น เชื้อ *Enterococci*, *Lactic acid bacteria*, *Bacillus* เป็นต้น ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำนมจึงเป็นเรื่องสำคัญมาก จึงมีการศึกษาหาแนวทางปฏิบัติเพื่อลดอุบัติเหตุการปนเปื้อนของแบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการปนเปื้อนของแบคทีเรียอาจเกิดขึ้นในขณะที่ทำการรีดนม การจับเก็บหรือช่วงก่อนเข้ากระบวนการผลิตน้ำนมและในบางครั้งอาจเกิดจากการรีดนมจากโคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการก็ได้

การศึกษาเรื่องความปลอดภัยโดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำนมครั้งนี้ ได้ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด เชื้อ *Enterococci*, *Lactic acid bacteria*, *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Coliform*, *Fecal coliform*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญและมักจะพบปนเปื้อนในน้ำนม เพื่อดูการปนเปื้อนของแบคทีเรียในฟาร์มโคนมที่ใช้ในการฝึกงานของนักศึกษา และเพื่อนำข้อมูลไปประกอบกับประวัติการรักษาของแม่โค ในการปรับปรุงการสุขาภิบาล สุขศาสตร์การรีดนม และการจัดการแม่พันธุ์ทดแทน เพื่อความปลอดภัยของน้ำนมดิบจากฟาร์มคณะเทคโนโลยีการเกษตร มทร.ธัญบุรีต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างน้ำนมดิบ

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคนมจำนวน 13 ตัว คละอายุและระยะเวลาการให้นม โดยไม่มีการกำหนดจำนวนครั้งที่เก็บในแต่ละตัว ตัวอย่างน้ำนมดิบจะถูกเก็บในการรีดนมช่วงเช้าจากฟาร์มของคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 13 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ได้จำนวนตัวอย่างรวม 78 ตัวอย่าง

วิธีการเก็บตัวอย่าง เก็บภายหลังการอาบน้ำทำความสะอาดเต้านมและเต้านมเรียบร้อยแล้ว เช็ดเต้านมและหัวนมด้วยน้ำยาคลอรีน รีดนมแต่ละเต้าเพื่อตรวจความผิดปกติ จากนั้นจึงทำการรีดนมโดยใช้เครื่องรีด เมื่อรีดเสร็จเรียบร้อยจุ่มหัวนมด้วยยาฆ่าเชื้อ แบ่งน้ำนมที่รีดได้ใส่ลงในขวดฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 250 มล. บรรจุในกล่องที่มีน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิให้เย็นสม่ำเสมอที่ 4-6 °C แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการทันที

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. BPW (Buffer Peptone Water) เป็นอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella*

2. MSR/V medium (Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis medium) เป็นอาหารเฉพาะสำหรับคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*

3. XLD Agar สำหรับเพาะแยกหมวดหมู่ของเชื้อ *Salmonella*

4. Antiserum ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *Salmonella* ระดับซีโรกรุ๊ป ประกอบด้วย antiserum ดังนี้
- *Salmonella* polyvalent A-67^C และ A-1^C และ
- *Salmonella* antiserum group B^C, C^C, D^C, E^C และ G^C

5. DLTB (Double Luaryl Tryptose Broth) เป็นอาหารสำหรับใช้ในการเพาะเชื้อ *Coliform* และ *E. coli* โดยวิธี MPN (Most Probable Number)

6. Brilliant Green Bile Broth 2% เป็นอาหารสำหรับใช้ในการเพาะเชื้อ *Coliform* และ *E. coli* โดยวิธี MPN (Most Probable Number)

7. EC medium (*Escherichia coli* medium) เป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เพื่อยืนยันเชื้อ *E. coli* โดยวิธี MPN (Most Probable Number)

8. PCA (Plate Count Agar) เป็นอาหารสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

9. PDS (Peptone Dilution Saline) เป็นน้ำยาละลายสำหรับทำการเจือจาง

10. SF (*Streptococcus Faecalis*) Medium เป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococci*

11. MRS (De Man Rogosa and Sharp) เป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง *Lactic acid bacteria*

12. MYP (Mannitol egg-Yolk Polymyxin B) เป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus*

13. BPA (Baird Parker Agar) เป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus*

การตรวจนับแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบ

การเจือจางตัวอย่าง: ดำเนินการตามวิธี ISO 6887-1 (1999) ดังนี้

ทำการเขย่าตัวอย่างน้ำนมดิบในขวดเก็บตัวอย่างนาน 30 วินาที แล้วถ่ายเชื้อจากน้ำนมดิบโดย

การใช้ไปเปิดดูตมา 10 มล. ถ่ายลงในขวดที่มี PDS 90 มล. เขย่าให้เข้ากันดี ความเข้มข้นหรือการเจือจาง จะเท่ากับ 10^{-1} จากนั้นเขย่าเบาๆ ใช้ไปเปิดดูตจากขวด 10^{-1} ออกมา 1 มล. ใส่ลงในหลอด PDS 9 มล. (หลอดที่ 2) ใช้ไปเปิดดูตขึ้นลง 3 - 5 ครั้ง การเจือจางนี้มีความเข้มข้น 10^{-2} จากนั้นทำการเจือจางเช่นนี้ไปจนถึงระดับความเข้มข้นที่ 10^{-3}

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด: โดยวิธี Pour plate method (Maturin and Peeler, 1998)

ทำการแบ่งตัวอย่างน้ำนมดิบออกเล็กน้อย เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการเขย่าตัวอย่างน้ำนมดิบให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างน้ำนมดิบ 1 มล. เจือจางด้วย PDS 9 มล. ให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} ใส่ตัวอย่างเจือจาง 1 มล. ลงจานเพาะเชื้อที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่ความเข้มข้นละ 2 จานเพาะเชื้อ เทอาหารเพาะเชื้อ PCA ใส่จานเพาะเชื้อ ที่มีตัวอย่างน้ำนมดิบจานละ 15 มล. แล้วเขย่าจานเพาะเชื้อเบาๆ ให้เชื้อกระจายทั่วๆ ตั้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว จากนั้นบ่มเชื้อในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชม. แล้วตรวจผลโดยนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกจำเพาะ (selective media)

วิธีการแยกตามชนิดของเชื้อที่ทำการทดสอบ

1. การนับจำนวนของแบคทีเรีย *Enterococci*: ดำเนินการโดยดัดแปลงมาจากวิธี ISO 7899-2 (1984)

ทำการเขย่าขวดตัวอย่างน้ำนมดิบ ดูดตัวอย่าง 1 มล. เจือจางด้วย PDS 9 มล. และเจือจางจนถึงความเข้มข้นที่ 10^{-2} - 10^{-4} จากนั้นดูดตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล. หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ SF medium ที่เติม 1% TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride) แล้วเกลี่ยให้แห้งด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมจนแห้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-20 นาที แล้วบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชม. ตรวจผลโดยการนับโคโลนี

2. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella*: ดำเนินการโดยดัดแปลงมาจากวิธี ISO 6579 (1993)

ทำการเขย่าขวดตัวอย่างนมดิบ ดูดตัวอย่าง 10 มล. เจือจางด้วย Buffer Peptone Water (BPW) 90 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. จากนั้นเขย่าตัวอย่างน้ำนมดิบใน BPW ดูดมา 1 มล. หยดบนผิวหน้าอาหาร MSRVR จานละหยด บ่มในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 24 ชม. ทำการตรวจผลโดยดูการแผ่ของเชื้อเป็นวงสีขาวกระจายออกจากจุดที่หยดเชื้อ ให้ผลเป็นบวกซึ่งต้องทำการยืนยันด้วยอาหาร XLD และ TSI (Triple Sugar Iron) โดยใช้หลอดเชื้อแต่ละบริเวณที่เชื้อแผ่ออกไปไกลที่สุด เชื้อเชื้อบนผิวหน้าอาหาร XLD และ TSI แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. ใช้เข็มเชื้อบนอาหาร XLD, BGA (Brilliant Green Agar) แล้วทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับ Polyvalence antisera-*Salmonella* หากมีปฏิกิริยาการจับกลุ่มแสดงว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ทำการทดสอบต่อด้วย Anti-sera group เพื่อจำแนกกลุ่มของ *Salmonella* A-I บันทึกผล

3. การนับจำนวนของ *Lactic acid bacteria*: โดยวิธี Direct plating method (Guessas and Kihal, 2004)

ทำการเขย่าขวดตัวอย่างน้ำนมดิบ ดูดมา 1 มล. เจือจางด้วย PDS 9 มล. และเจือจางจนถึงความเข้มข้นที่ 10^{-2} - 10^{-4} ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล. หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แล้วเกลี่ยให้แห้งด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมจนแห้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 - 20 นาที บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 24 - 48 ชม. แล้วตรวจผลโดยการนับโคโลนี

4. การนับจำนวนแบคทีเรีย Coliform: ใช้วิธี APHA - Five tube method-MPN (APHA AWWA WPCF, 1995)

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำนมดิบให้มีความเข้มข้น 10^1 , 10^0 , 10^{-1} และ 10^{-2} แล้วจัดเรียงหลอดที่มี Durham'tube เป็นแถวๆ ละ 5 หลอด และใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแถวที่ 1 เป็นอาหาร Double Lauryl Tryptose Broth 10 มล. แถวที่ 2, 3 และ 4 เป็นอาหาร SLTB (Single

Lauryl Tryptose Broth) 10 มล. แถวที่ 1 ดูดตัวอย่างน้ำนมดิบที่ไม่มีการเจือจางมาใส่ลงไปทุกหลอด หลอดละ 10 มล. แถวที่ 2 ดูดตัวอย่างน้ำนมดิบที่ไม่มีการเจือจางมาใส่ลงไปทุกหลอด หลอดละ 1 มล. แถวที่ 3 ดูดตัวอย่างน้ำนมดิบที่เจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} มาใส่ลงไปหลอดละ 1 มล. และแถวที่ 4 ดูดตัวอย่างน้ำนมดิบที่เจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2} มาใส่ลงไปหลอดละ 1 มล. แล้วบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชม. ทำการยืนยันผลของแบคทีเรีย Coliform โดยใช้ Brilliant Green Bile Broth 2% โดยคัดเฉพาะหลอดที่มีก๊าซในหลอด Durham's tube ในแต่ละแถวที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วใช้หลอดเขี่ยจุ่มลงในหลอดเชื้อ ถ่ายในหลอดอาหาร Brilliant Green Bile Broth 2% ที่มี Durham's tube บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชม. แล้วบันทึกผล

5. การนับจำนวนของแบคทีเรีย Fecal coliform: (APHA AWWA WPCF, 1995)

ดำเนินการต่อเนื่องจากการนับจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม Coliform โดยการคัดเลือกเอาหลอดที่มีก๊าซในหลอด Durham's tube ในแต่ละแถวตามความเข้มข้นต่างๆ แล้วใช้หลอดเขี่ยจุ่มลงในหลอดเชื้อ ถ่ายในหลอดอาหาร EC medium บ่มเพาะเชื้อในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ $45 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ชม. แล้วอ่านผลเฉพาะหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นในหลอด Durham's tube นับจำนวนบวกในแต่ละแถวเรียงตามลำดับของความเข้มข้น ทำการทดสอบเพื่อยืนยันเชื้อ *E. coli* โดยใช้หลอดเขี่ยเชื้อจุ่มในหลอดบวก แล้วขีดเชื้อลงบนอาหาร EMB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42°C นาน 18-24 ชม. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร EMB จะมีหมวดยีสี่ม่วงดำตรงกลางและจะมีการแผ่ที่เกิดจากการตกตะกอนของสีลักษณะวาวๆ คล้ายปีกแมลงทับ นับจำนวนบวกจากแต่ละแถวนำไปคำนวณหาค่า MPN

6. การนับจำนวนของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*: โดยวิธี Direct plating method (Bennett and Lancette, 1998)

ทำการเขี่ยขวดตัวอย่างน้ำนมดิบดูมา 1 มล. เจือจางด้วย PDS 9 มล. และเจือจางจนถึงความ

เข้มข้นที่ $10^{-2} - 10^{-4}$ ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล. หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA แล้วเกลี่ยให้แห้งด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมจนแห้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-20 นาที แล้วบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชม. ทำการตรวจผลโดยการนับโคโลนีที่มีสีดำและมีไฮนส์เหลืองแสดงถึงการมีเอนไซม์ lecithinase ในการย่อยไข่แดงในอาหาร BPA และทดสอบเชื้อด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับพลาสมา กระต่าย coagulase test, Vogres-Proskaur salt test, DNase test

7. การนับจำนวนของแบคทีเรีย *Bacillus*: โดยวิธี Direct plating method (Rhodehamel and Harmon, 1998)

ทำการเขี่ยขวดตัวอย่างน้ำนมดิบแล้วดูมา 1 มล. เจือจางด้วย PDS 9 มล. และเจือจางจนถึงความเข้มข้นที่ $10^{-3} - 10^{-5}$ ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล. หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP เกลี่ยให้แห้งด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมจนแห้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 - 20 นาที บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชม. ตรวจผลโดยการนับโคโลนีตรงแบบของเชื้อที่ขึ้นบนผิวหน้าอาหาร MYP ทั้งหมด

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำนมดิบ พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียมีค่าระหว่าง 5.11 - 8.18 log CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 7.4 log CFU/ml ซึ่งจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้เป็นจำนวนที่สูงกว่าค่ามาตรฐานที่กรมปศุสัตว์ (2546) ได้กำหนดให้ค่ามาตรฐานของจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนม (Standard plate count หรือ SPC) มีค่าไม่เกิน 4.0×10^5 CFU/ml (= 5.6 log) ซึ่งเป็นจำนวนที่เท่ากับประกาศของกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 1267 (พ.ศ. 2530) ได้กำหนดให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบ ไม่เกิน 400,000 CFU/ml (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2530) ดังที่แสดงเปรียบเทียบในรูปที่ 3 สำหรับในต่างประเทศ เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา New York State Milk Standard

กำหนดให้มีค่านี้ได้มากที่สุดไม่เกิน 30,000 CFU/ml (Cornell University, 2006) การที่จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดมีจำนวนที่สูงนั้น อาจเกิดจากปัญหาในกระบวนการรีดนม Reinemann et al. (1997) กล่าวว่า การที่นับจำนวนแบคทีเรียได้สูง มักเป็นผลมาจากสุขศาสตร์การรีดนมไม่ดี หรือมีปัญหาในการทำความสะอาดเครื่องมือและการสุขาภิบาล หรือมีปัญหาเรื่องเต้านมอักเสบ หรือมีระยะพักตัวของเชื้อแบคทีเรียในระบบการเคลื่อนย้ายน้ำนม ซึ่งสอดคล้องกับ Pankey (1989a) รายงานว่า การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้สูงเกี่ยวข้องกับการสุขาภิบาลของเครื่องรีดนมไม่เหมาะสมหรือเย็นไม่เพียงพอ และจำนวนเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อเต้านมและหัวนมเปียก หรือทำการเช็ดให้แห้งไม่ดีพอก่อนที่จะรีดนม หรือมีน้ำหยดลงไปใน teat cups

เชื้อ *Enterococci* มีจำนวนที่ตรวจนับได้ log 4.14 - 6.53 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 1 มีค่าเฉลี่ย log 5.7 CFU/ml เชื้อนี้จะพบอยู่ในลำไส้ของสัตว์ มูลสัตว์ ตามอุปกรณ์และสภาพแวดล้อมที่เป็นมูลสัตว์ และจะแพร่จากสภาพแวดล้อมสู่ตัวสัตว์ได้ (กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกมา สามงามนึ่ง, 2550) แต่ Kagkli et al. (2007) กล่าวว่า เชื้อ *E. coli*, *Enterococcus* หรือ *Aerococcus* จากอุจจาระของโคจะไม่ปนเปื้อนในน้ำนม การปนเปื้อนของเชื้อ *Enterococci*, *Lactobacilli* และ *Coliform* จากอุจจาระในน้ำนมเกิดขึ้นน้อยมาก และชี้ว่าเชื้อ *Enterococci*, *Lactobacilli* และ *Coliform* ที่ปนเปื้อนมาจากน้ำเป็นหลัก สำหรับการที่ตรวจนับเชื้อนี้ได้สูงก็อาจเป็นเพราะมีการใช้น้ำบาดาลที่พักไว้ในแท็งก์น้ำแทนน้ำประปา ทำให้ตรวจนับเชื้อนี้ได้ในจำนวนที่สูง

เชื้อ *Lactic acid bacteria* ตรวจนับได้ log 4.22-6.42 CFU/ml แสดงในรูปที่ 1 มีค่าเฉลี่ย log 5.9 CFU/ml เชื้อกลุ่มนี้สามารถพบอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ และจะออกมานอกร่างกายโดยปนมากับอุจจาระ สามารถพบได้ในธรรมชาติ ตามพืชผัก และน้ำนม (สุกมา สามงามนึ่ง, 2545) การตรวจนับเชื้อได้จำนวนสูงมาก น่าจะเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกับเชื้อ *Enterococci* ที่การปนเปื้อนเชื้อมาจากน้ำเช่นกัน

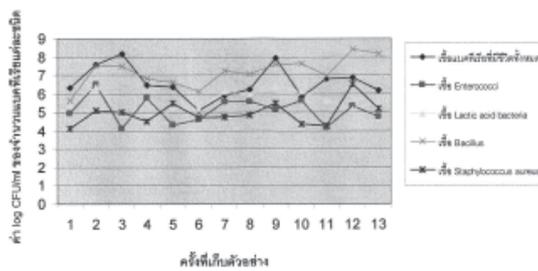
เชื้อ *Bacillus* ตรวจนับได้ log 5.67-8.43 CFU/ml แสดงในรูปที่ 1 มีค่าเฉลี่ย log 7.7 CFU/ml เชื้อกลุ่มนี้ กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกมา สามงามนึ่ง (2550) รายงานว่าเป็นเชื้อที่พบอยู่ในสภาพแวดล้อมและจะแพร่จากสภาพแวดล้อมสู่ตัวสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับที่สุกมา สามงามนึ่ง (2545) รายงานไว้ว่า เชื้อนี้จะแพร่กระจายในธรรมชาติพบได้ในดิน น้ำ และรั้วพืช เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้ทำให้แพร่กระจายในอากาศในฝุ่นละออง หรือตามสภาพแวดล้อมได้ ดังนั้นน้ำที่ใช้น่าจะเป็นแหล่งของเชื้อในการปนเปื้อน

เชื้อ *Enterococci*, *Lactic acid bacteria* และ *Bacillus* จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียทนร้อน ซึ่งกรมปศุสัตว์ (2546) กำหนดให้ค่ามาตรฐานของจำนวนเชื้อแบคทีเรียทนร้อนในน้ำนมดิบ ไม่เกิน 1×10^3 CFU/ml. และจากการตรวจนับครั้งนี้ ผลรวมของจำนวนเชื้อแบคทีเรียทนร้อน *Enterococci*, *Lactic acid bacteria* และ *Bacillus* ที่ตรวจนับได้มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานมากดังที่ปรากฏในรูปที่ 4

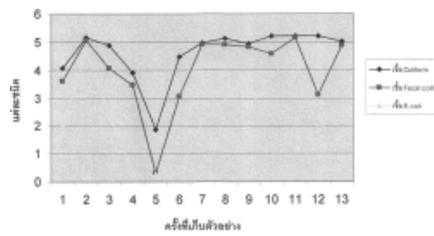
เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทำให้เกิดการอักเสบของเต้านมโค พบปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง log 4.15 - 6.52 CFU/ml แสดงในรูปที่ 1 มีค่าเฉลี่ย log 5.5 CFU/ml เชื้อนี้ตรวจนับได้ในจำนวนค่อนข้างสูง เนื่องจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่สุกมา สามงามนึ่ง (2545) รายงานไว้ว่าพบที่บริเวณปลายเปิดของอวัยวะที่เป็นช่องทางติดต่อกับสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกาย และในกรณีอักเสบอาจพบเชื้อน้อยอยู่ได้ราว $10^3 - 10^6$ ต่อตารางเซนติเมตร ดังนั้นถ้าในการรีดนมมีกระบวนการทำความสะอาดไม่ดีพอ ก็จะทำให้เชื้อปนเปื้อนลงในน้ำนมได้ง่าย สอดคล้องกับ Galton et al. (1984) รายงานว่า ในการรีดนมที่มีการทำความสะอาดของเต้านมและหัวนมไม่เหมาะสม และมีน้ำไหลผ่านจากเต้านมจะพบเชื้อนี้ปนเปื้อนในน้ำนมในปริมาณที่สูงเป็นลำดับที่สอง รองมาจากการรีดนมโดยไม่มีการเตรียมเต้านมก่อนรีดนม และ Pankey (1989b) ที่รายงานเชื้อ *S. aureus* นี้ปกติแล้วมักพบอยู่บริเวณหัวนมและเต้านมของแม่โค ซึ่งถ้าการเตรียมเต้านมก่อนการรีดนมไม่เหมาะสมก็จะทำให้มีจำนวนเชื้อในน้ำนมเพิ่มขึ้นได้

ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เรียกลุ่ม Coliform, Fecal coliform และ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีที่สำคัญในการชี้วัดการปนเปื้อนอุจจาระ (Kagkli et al., 2007; สุขุมธาดา วัฒนสินธุ์, 2545) ในการตรวจครั้งนี้พบเชื้อกลุ่ม Coliform, Fecal coliform และ *E. coli* อยู่ระหว่าง log 1.87 - 5.20, 0.30 - 5.17 และ 0.30 - 4.74 MPN/100ml ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 2 มีค่าเฉลี่ย log 4.9, 4.7 และ 3.8 MPN/100ml การที่จำนวนเชื้อ Coliform นับได้ค่อนข้างสูง Kagkli et al. (2007) กล่าวว่า Coliform ที่ปนเปื้อนมาจากน้ำเป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับ สุณิรัตน์

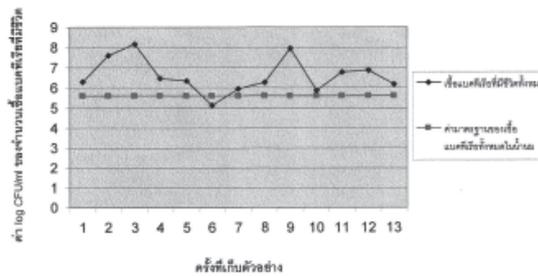
เอี่ยมละมัย และคณะ (2542) ที่กล่าวว่า เชื้อ Coliform สูงอาจเกิดจากน้ำที่ใช้ไม่สะอาดพอหรือการล้างฆ่าเชื้ออุปกรณ์การรีดนมไม่สะอาด นอกจากนี้ Reinemann et al. (1997) ได้ระบุว่า จำนวน Coliform นี้เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของขั้นตอนการเตรียมแม่โคในการรีดนมและความสะอาดของสภาพแวดล้อมของแม่โค ถ้าพบ Coliform มีจำนวนอยู่ระหว่าง 100-1,000 MPN/ml บ่งชี้ได้ว่ามีสุขศาสตร์การรีดนมที่ไม่ดี ส่วนเชื้อ *Salmonella* ตรวจไม่พบในทุกตัวอย่างในการตรวจนับในครั้งนี้



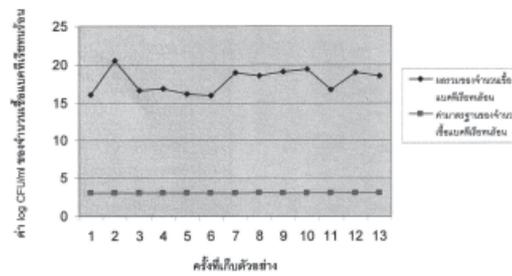
รูปที่ 1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง มีค่าเป็น log CFU/ml



รูปที่ 2 จำนวนเชื้อกลุ่ม Coliform ชนิดต่างๆในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง มีค่า log MPN/100 ml



รูปที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดกับค่ามาตรฐาน มีค่าเป็น log CFU/ml



รูปที่ 4 เปรียบเทียบผลรวมจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดกับค่ามาตรฐาน มีค่าเป็น log CFU/ml

สรุป

การวิจัยเรื่องความปลอดภัยของน้ำนมดิบโดยตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในครั้งนี้ พบจำนวนเชื้อแบคทีเรียมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน ดังปรากฏในรูปที่ 3 และรูปที่ 4 ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย แหล่งที่มาของเชื้อ และแนวทางแก้ไขได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 คณะผู้วิจัยเห็นว่า เนื่องจากฟาร์มนี้เป็นฟาร์มที่ใช้ฝึกนักศึกษา ดังนั้นข้อมูลที่ได้นี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงการฝึกนักศึกษาให้ตระหนัก

ถึงเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมมากขึ้น และคณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำน้ำนมดิบและนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ มาทำการตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียต่างๆ และ Somatic cells เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพนม และสุขศาสตร์การรีดนมต่อไป

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรีย แหล่งที่มาของเชื้อ และแนวทางแก้ไข

เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งที่มาของเชื้อ	แนวทางแก้ไข
1. เชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด	<ul style="list-style-type: none"> - สุขศาสตร์การรีดนมไม่ดี - การทำความสะอาดอุปกรณ์และเครื่องรีดนมไม่ดี - เต้านมและหัวนมเปียก - มีน้ำหยดลงใน teat cup - มีปัญหาเรื่องเต้านมอักเสบ 	<ul style="list-style-type: none"> - ปรับปรุงสุขศาสตร์การรีดนม - มีมาตรการที่เข้มงวดในการทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ - เพิ่มความระมัดระวังในการเตรียมเต้านม และขณะทำการรีดนม - ควบคุมและป้องกันเรื่องโรคเต้านมอักเสบ
2. เชื้อแบคทีเรียทนร้อน - <i>Enterococci</i> , <i>Lactic acid bacteria</i> และ <i>Bacillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - น้ำบาดาลที่พักเก็บไว้ในแทงก์ใช้ในการเตรียมเต้านม 	<ul style="list-style-type: none"> - มีการจัดหาแหล่งน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อน เช่น การใช้น้ำประปา
3. เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - เต้านมไม่แห้ง - มีน้ำปนเปื้อนลงในเต้านม - ทำความสะอาดเต้านมและหัวนมไม่ดี 	<ul style="list-style-type: none"> - เพิ่มความระมัดระวังในการเตรียมเต้านม และขณะทำการรีดนม
4. เชื้อ <i>Coliform</i> , <i>Fecal coliform</i> และ <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - น้ำที่ใช้ไม่สะอาดพอ - สภาพคอกสัตว์ไม่สะอาดพอ 	<ul style="list-style-type: none"> - มีการจัดหาแหล่งน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อน - ปรับปรุงการสุขาภิบาลในคอกสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ. เกียรติศักดิ์ พูนสุข รศ.น.สพ.ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และอาจารย์เป็ล่งศรี อิงคินันท์ แห่งคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่งเป็นผู้ให้การสนับสนุนและอนุเคราะห์ด้านการค้นคว้าหาข้อมูลต่างๆ ตลอดจนอาจารย์อัญชลี ทองกำเนิด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ผู้ให้คำแนะนำการประมวลผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงอุตสาหกรรม. (2530, 4, พฤศจิกายน). ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรม

นมสด. ฉบับที่ 1267.

กรมปศุสัตว์. (2546). คู่มือระเบียบการปฏิบัติงาน การตรวจมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตนํ้านมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกมา สามงามนิม. (2550). การตรวจวินิจฉัยเต้านมอักเสบ และคุณภาพนํ้านมดิบทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุนีรัตน์ เอี่ยมละออ ธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล และปราจีน วีรกุล. (2542). ประมวลสถานภาพองค์ความรู้ด้านสุขภาพโคนม: แนวทางการวิจัยและ

- พัฒนาในอนาคต. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.).
- สมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. นนทบุรี : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- อรรวรรณ นวีภาพ. (2540). ความรู้เบื้องต้นของสารพิษจากเห็ดและราสาย. หน้า 32-49. ใน เปล่งศรี อังคนินันท์. **สารพิษจากเชื้อรา : ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. การประชุมวิชาการในวาระ 80 ปีแห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 13-14 มีนาคม 2540.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ตรีรัตนสาร.
- Acha, P.N., and Szyfres, B. (1994). **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. 2nd ed. Washington D.C. : Pan American Health Organization.
- APHA AWWA WPCF (American public Health Association, American Water Work Association, Waste Pollution Control Federation). (1995). **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water**. 19th ed. Washington D.C. : American Public Health Association.
- Bennett, R.W., and Lancette, G.A. (1998). *Staphylococcus aureus*. **Bacteriological Analytical Manual** [Online]. January 2001. Chapter 12. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Date: February 2008. Available at <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>
- Cornell University. (2006). **Microbial Standard for Milk**. [online]. Updated 29-1-2007. Date: March 2008. Available at <<http://www.milkfacts.info/milk%20Microbiology/Microbial%20standards.htm>>
- Galton, D.M., Peterson, L.G., Merrill, W.G., Bandler, D.K., and Shuster, D.E. (1984). Effects of premilking udder preparation on Bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. **Journal of Dairy Science**. Vol.67(11). pp. 2580-2589.
- Guessas, B., and Kihal, M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goatsmilk. **African Journal of Biotechnology**. [online] 3(6): 339-342. Date: February 2008. Available at <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2004/Jun/Guessas%20and%20Kihal.pdf>>
- ISO 6579. (1993). Microbiology - General guidance on methods for the detection of *Salmonella*.
- ISO 6887-1. (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- ISO 7899-2. (1984.12.15). Water Quality - Detection and Enumeration of Faecal streptococci. Part 2: Method by membrane filtration.
- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill C., and Cogan, T.M. (2007). Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. **Journal of Applied Microbiology**. Vol. 103(5), pp.1393-1405.
- Limon, C. (2007). **Raw milk contains harmful bacteria that can be life threatening**. [online] Updated 01-03-2007. Date: February 2008. Available at <<http://www.worldwidehealth.com/article.php?id=1199>>
- Maturin, L.J., and Peeler, J.T. (1998). **Aerobic plate count. Bacteriological Analytical Manual** [Online], January 2001. Chapter 3. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Date: March 2008. Available at <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-3.html>>
- Pankey, J.W. (1989 a). Update on Mastitis : Hygiene at milking time in the prevention of bovine mastitis. **British Veterinary Journal**. Vol. 145(5) : 401-409.
- Pankey, J.W. (1989 b). Our Industry Today : Premilking udder hygiene. **Journal of Dairy Science**. Vol. 72 (5) : 1308-1312.
- Reinemann, D.J., Mein, G.A., Bray, D.R., Reid, D., and Britt, J.S. (1997). Troubleshooting high bacteria counts in farm milk. **Paper presented at the 1997 Annual Meeting of the National Mastitis Council**. [Online], Date: February 2008. Available at <http://www.uwex.edu/uwmrml/pfd/MilkMachine/Cleaning97_NMC_Procedures_for_Trouble_shooting.pdf>
- Rhodehamel, E.J., and Harmon, S.M. (1998). *Bacillus. Cereus*. **Bacteriological Analytical Manual Online**, [Online], January 2001. Chapter 14. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Date: March 2008. Available at <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html>>