คุณภาพทางจุลชีววิทยาของนมผงและเนยแข็ง

Microbiological Quality of Milk Powders and Cheese

กานดา มากหมื่นไวย์ ยุพยงค์ บุญทวี และ สุดสายชล หอมทอง*
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131
Kanda magmhuenwai Yupayong Boontawee and Sudsaichon Homthong*
Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

บทคัดย่อ

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของนมผง 30 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์เนยแข็ง 30 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าต่าง ๆ ในบริเวณอำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี โดยทำการสุ่มตรวจในเดือนพฤศจิกายน 2548 ถึงเดือนมกราคม 2549 พบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในนมผงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ (1.22±4.9)x10 CFU/g โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบอยู่ในช่วงน้อยกว่า 102 CFU/g คิดเป็น 76.67 เปอร์เซ็นต์ และพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มและ *Escherichia coli* มีปริมาณน้อยกว่า 3 MPN/g สำหรับการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคนั้นพบการปนเปื้อน *Bacillus cereus* จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และพบ *Listeria* sp. 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.67 เปอร์เซ็นต์ ตรวจไม่พบ *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างทั้งหมด

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในเนยแข็งมีค่าน้อยกว่า 10^2 CFU/g คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด สำหรับแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่พบปริมาณมากเท่ากับ 460 MPN/g คิดเป็น 3.34 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด ส่วน E. coli มีจำนวนน้อยกว่า 3 MPN/g ในทุกตัวอย่าง และไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus Salmonella* sp. *B. cereus* และ *L. monocytogenes*

คำสำคัญ : คุณภาพทางจุลชีววิทยา, นมผง, เนยแข็ง

Abstract

Thirty samples of milk powder and thirty samples of cheeses purchased from different department stores of the Muang Chonburi district, Chonburi Province were investigated for microbiological quality. The experiment was performed during November 2005 to January 2006. Average levels of total aerobic bacteria in milk powder were (1.22 ±4.9)x10 CFU/g. The total aerobic bacteria count lower than 10^2 CFU/g was about 76.67%. Coliform and *Escherichia coli* were present in lower than 3 MPN/g in any sample. Three samples (10%) and two samples (6.67%) were found to be positive for *Bacillus cereus* and *Listeria* sp. respectively. *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were not detected in any samples.

Total aerobic bacteria counts of cheeses were present in lower than 10^2 CFU/g in 66.67 % of the samples. Coliforms were present high numbers as 460 MPN/g in 3.34% of the samples. *Escherichia coli* was present in lower than 3 MPN/g in any samples. *S. aureus*, *Salmonella* sp, *B. cereus* and *L. monocytogenes* were not detected in all samples.

Key word: Microbiological Quality, Milk powders, Cheese

* **Corresponding author.** E-mail: sudsaich@buu.ac.th

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทนำ

นมเป็นอาหารที่จำเป็นมากสำหรับมนุษย์และสัตว์ มีคุณค่าทางอาหารสูง ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 87 ไขมันร้อยละ 3.66 โปรตีนร้อยละ 3.42 แลกโทสร้อยละ 4.92 และเถ้าร้อยละ 0.71 จากส่วนประกอบเหล่านี้จะมีวิตามิน เกลือแร่ ที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิดรวมอยู่ด้วย ซึ่งนิยมบริโภคกันทั้งในรูปนมสด นมผง และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น นมเปรี้ยว (fermented milk) ไอศครีม เนยเหลว (butter) เนยแข็ง เป็นต้น (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในกลุ่มเหล่านี้ด้วยแบคทีเรียก่อโรคซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่งสำหรับผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งเด็กเล็กและเด็กทารก แบคทีเรียที่พบว่ามีการปนเปื้อนส่วนใหญ่คือแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Klebsiella* spp., *Enterobacter sakazakii, Enterobacter* spp., *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* และ *Salmonella* spp. แบคทีเรียในกลุ่มนี้พบได้ทั่วไป ในน้ำ ในดิน พืชผัก ลำไส้คนและสัตว์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ทุกที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ที่มีความชื้นหรือปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย เช่น ภาชนะและสิ่งของเครื่องใช้ที่ผ่านการจับด้วยมือ จึงเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนในอาหารเครื่องดื่มได้ง่าย (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนกลุ่ม thermophilic bacilli ได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Geobacillus, Anoxybacillus* และ *Bacillus* โดยเฉพาะ *Bacillus* ซึ่งพบได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *B. stearothermophilus, B. licheniformis, B. coagulans, B. macerans, B. subtilis* และ *B. cereus* แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะปนเปื้อนในนมผงและผลิตภัณฑ์นมอยู่ในรูปของสปอร์ ซึ่งสามารถที่จะทนความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตได้ หลังจากนั้นหากได้รับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ สปอร์จะมีการงอกและพัฒนาเป็นเซลล์ปกติ (Frazier & Westhoff, 1978; Rückert *et al.*, 2004) โดยเฉพาะ *B. cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษแบบมีอาการอาเจียน (emetic toxin) (Svensson *et al.*, 2006) โดยจำนวนเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ที่สามารถเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้คือมีปริมาณเท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Marth & Steele, 2001) สำหรับในเนยแข็งอาจมีการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นโรคฉวยโอกาส (opportunistic disease) อาการป่วยจะรุนแรงหรือไม่ขึ้นอยู่กับสุขภาพของแต่ละบุคคล ถ้าผู้ป่วยที่มีสุขภาพร่างกายไม่แข็งแรง หรือมีร่างกายอ่อนแอ เช่น เด็ก ทารก คนท้อง คนชรา รวมทั้งผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคไต โรคหัวใจ โรคเอดส์ หากผู้ป่วยติดเชื้อโรคนี้ จะมีอาการป่วยอย่างรุนแรง อาจถึงตายได้ (30-40 เปอร์เซ็นต์) เป็นต้น การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคเหล่านี้อาจมาจากตัววัตถุดิบเอง น้ำ อุปกรณ์และเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต (สุวิมล กีรติพิบูล, 2545) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการที่จะวิเคราะห์คุณภาพทาง จุลชีววิทยาของนมผงและเนยแข็งซึ่งถือว่าเป็นตัวแทนของนมและผลิตภัณฑ์นมซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าในจังหวัดชลบุรีว่ามีคุณภาพตามมาตรฐานหรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับผู้บริโภคในการเลือกซื้อนมและผลิตภัณฑ์นม นอกจากนี้ยังสามารถจะประเมินสภาวะทางด้านความสะอาดและความปลอดภัยของนมและผลิตภัณฑ์นมในปัจจุบันที่มีวางจำหน่ายอยู่ในห้างสรรพสินค้า รวมทั้งสามารถใช้ข้อมูลที่ได้นี้นำไปแนะนำผู้ผลิตเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตนมและผลิตภัณฑ์นมให้มีคุณภาพและความปลอดภัยต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างนมผงและเนยแข็ง

ตัวอย่างนมผงและเนยแข็งที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า 2 แห่งในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นนมผง 30 ตัวอย่าง และเนยแข็ง 30 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างนมผง 30 ตัวอย่างนั้นแบ่งเป็นนมผงช่วงอายุแรกเกิดถึง 1 ปี จำนวน 11 ตัวอย่าง นมผงช่วงอายุ 6 เดือนถึง 3 ปี จำนวน 8 ตัวอย่าง นมผงช่วงอายุ 1 ปี ขึ้นไป จำนวน 5 ตัวอย่าง และนมผงสำหรับผู้ใหญ่ จำนวน 6 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างเนยแข็ง 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเนยแข็งชนิดอ่อนนุ่ม จำนวน 9 ตัวอย่าง เนยแข็งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว จำนวน 2 ตัวอย่าง และเนยแข็งชนิดแข็ง จำนวน 19 ตัวอย่างโดยตัวอย่างดังกล่าวสุ่มมาในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2548 ถึง เดือนมกราคม 2549 เพื่อนำมาศึกษาในครั้งนี้

2. แบคทีเรียอ้างอิง

แบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้คือ *Escherichia coli* ATTC 39423, *Salmonela* Enteritidis DMST 15676, *Staphylococcus aureus* A7CC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Listeria monocytogenes* DMST 17303

3. การตรวจหาเชื้อ

1. การนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี Pour plate technique (AOAC,1990)

ชั่งตัวอย่างนมผงและเนยแข็งอย่างละ 50 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Butterfield's phosphate-buffer 450 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นเจือจางเป็นลำดับจนได้ตัวอย่างความเจือจางที่ต้องการ หลังจากนั้นนำแต่ละความเจือจางมา pour plate ด้วย Plate count agar (PCA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณค่า CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง

2. ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *E. coli* โดยวิธี MPN (AOAC,1990)

2.1 การทดสอบขั้นต้น

ชั่งตัวอย่างนมผงและเนยแข็งตัวอย่างละ 50 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Butterfield's phosphate-buffer 450 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นเจือจางเป็นลำดับจนได้ตัวอย่างความเจือจางที่ต้องการ และนำมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร Lauryl tryptose broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซจำนวน 3 หลอด บ่มหลอด Lauryl tryptose broth ที่มีตัวอย่าง (รวมทั้งหมด 9 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลการทดลอง โดยสังเกตการขุ่นและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ (หลอดที่ให้ผลบวก ต้องเกิดที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1/10 ของปริมาตรหลอดดักก๊าซ) บันทึกจำนวนหลอดที่เป็นผลบวก และนำค่าหลอดผลบวกไปอ่านค่าโคลิฟอร์มขั้นต้นจากตารางเอ็มพีเอ็น ส่วนหลอดที่ไม่ให้ผลบวกก็ให้บ่มต่อไปอีกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง

2.2 การทดสอบขั้นยืนยัน

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายตัวอย่างที่เป็นผลบวกจากหลอด Lauryl tryptose broth ลงในอาหาร BGLB broth และอาหาร EC broth ทำเช่นเดียวกันจนครบทุกหลอดของผลบวก โดยบ่มหลอด BGLB broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบ่มหลอด EC broth ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลการทดลอง โดยหลอดที่ให้ผลบวกอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น และมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ บันทึกหลอดที่เป็นผลบวก โดยหลอด BGLB broth ที่เป็นผลบวก นำไปอ่านค่าโคลิฟอร์มจากตารางเอ็มพีเอ็นในขั้นยืนยัน ส่วนหลอด EC broth ที่เป็นผลบวก นำไปอ่านค่าฟีคัลโคลิฟอร์มจากตารางเอ็มพีเอ็น

2.3 การทดสอบขั้นสมบูรณ์ สำหรับ E. coli

นำหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกแต่ละหลอดมาขีดแยกเชื้อลงบนอาหารแข็ง EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* บน EMB agar (โคโลนีแบน ไม่เยิ้ม มีจุดสีเข้ม มีเงาโลหะ) ซึ่งถือว่าเป็นผลบวก นำไปทดสอบด้วยชุดการทดสอบ IMVIC นำจำนวนหลอดที่ให้ผลการทดสอบ IMVIC เป็น + + - - ไปอ่านค่าปริมาณ *E. coli* ไปอ่านค่าเอ็มพีเอ็น รายงานผลปริมาณ *E. coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม

3. การตรวจหา *S. aureus* ตามวิธีของ BAM Online (Bennett & Weaver, 2001)

ชั่งตัวอย่างนมผงและเนยแข็งตัวอย่างละ 50 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลาย Butterfield's phosphate-buffer dilution water (BF) 450 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหารเป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นเจือจางเป็นลำดับจนได้ตัวอย่างความเจือจางที่ต้องการ หลังจากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจางลงในหลอด trypticase soy broth ที่มี NaCl เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ sodium pyruvate เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาก็นำมาขีดแยกเชื้อบนอาหาร Baird-Parker egg-yolk tellurite agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และขีดแยกเชื้อ *S.aureus* อ้างอิงเพื่อเปรียบเทียบ เลือกลักษณะเฉพาะของ *S.aureus* (ผิวเรียบ นูน ขอบเรียบ สีดำน้ำตาลหรือเทาเข้ม มีวงขุ่นรอบโคโลนี และ/หรือมีวงใสใต้วงขุ่น) เปรียบเทียบกับโคโลนีอ้างอิง 2-3 โคโลนี มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และ เอนไซม์โคแอคกูเลส

4. การตรวจหา *Salmonella* ตามวิธีของ BAM Online (Andrews & Hammack, 2001)

1. การเตรียมตัวอย่าง

แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 วิธีตามชนิดของตัวอย่างได้แก่

1.1 นมผงสูตรสำหรับเด็กทารก (Infant Formula) และเนยแข็ง

ชั่งตัวอย่างนมผงและเนยแข็ง 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติม Lactose broth 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

1.2 นมผงพร่องมันเนย (Nonfat dry milk) และ นมผงธรรมดา (Dry whole milk)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชั่งตัวอย่างนมผง 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติม Brilliant green water 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

2. ขั้นตอนการตรวจสอบ

ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายตัวอย่างจากข้อ 1 มา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth (RVS) 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร ลงใน Tetrathionate broth (TT) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ RVS บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TT บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

3. ขั้นตอนการตรวจสอบยืนยันผล

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขนาด 3 มิลลิเมตร ถ่ายเชื้อจากหลอด (TT) และ (RVS) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ Bismuth sulfite (BS) agar, Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar และ Hektoen enteric (HE) agar พร้อมทั้งลง *S. Enteritidis* เป็นเชื้ออ้างอิง บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง เลือกลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีอ้างอิงมา 2-3 โคโลนี ขีดแยกเชื้อลงบนอาหาร (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยเพาะเชื้อลงอาหาร TSI agar, LIA, Urea agar, Simmon Citrate agar, Motile medium และ Indole test

5. การตรวจหา *L. monocytogenes* ตามวิธีของ BAM Online (Hitchins, 2003)

1. การเพาะเชื้อ (enrichment)

ชั่งตัวอย่างนมผงและเนยแข็งตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติม Listeria enrichment broth 225 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2. การแยกเชื้อ

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจาก enrichment culture ขีดลงบน Oxford agar และ Palcam agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เลือกลักษณะเฉพาะของ *L. monocytogenes* มา (ลักษณะโคโลนีบน Oxford agar มีขนาดเล็ก สีเทา-ดำ มี metallic sheen สีดำทิ้งไว้นาน 48 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะนูนตรงกลางโคโลนี และเนื่องจาก Palcam agar เป็น double indicator system คือ esculin และ ferrous iron, Mannitol และ phenol red โดยลักษณะโคโลนีของ *L. monocytogenes* บนอาหารจะมีขนาดเล็ก สีเทา-ดำ มี metallic sheen สีดำ ทิ้งไว้นาน 48 ชั่วโมง) โดยเลือกโคโลนีจากตัวอย่าง 2-3 โคโลนี นำโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *L. monocytogenes* มาขีดแยกเชื้อลงบนอาหาร Trypticase soy agar+0.6% Yeast Exteact (TSA-YE) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis), Catalase test, Motility test (อุณหภูมิ 25, 37 องศาเซลเซียส), Triple Sugar Iron Agar, Carbohydrate fermentation

6. การตรวจหา *Bacillus cereus* ตามวิธีของ BAM Online (Rhodehamel & Harmon, 2001)

ชั่งตัวอย่างนมผงและเนยแข็งตัวอย่างละ 50 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลาย Butterfield's phosphate-buffer dilution water (BF) 450 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหารเป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นเจือจางเป็นลำดับจนได้ตัวอย่างความเจือจางที่ต้องการ และใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจางลงในหลอด Trypticase soy-polymyxin broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 3 หลอด ๆละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ขีดแยกเชื้อลงบนอาหาร MYP agar และขีดเชื้อ *B. cereus* อ้างอิง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* เปรียบเทียบกับโคโลนีอ้างอิงมา 2-3 โคโลนี ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis), Catalase test, Nitrate reduction, Motility test, Rhizoid growth

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

ในตัวอย่างนมผงทั้งหมด 30 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นนมผงสำหรับช่วงอายุแรกเกิดถึง 1 ปี 11 ตัวอย่าง พบปริมาณแบคทีเรียสูงสุดเท่ากับ $(4.58\pm2.74)\times10^{3}$ CFU/g และค่าต่ำสุดเท่ากับ $(0.3\pm0.58)\times10^{1}$ CFU/g นอกจากนี้นมผงสำหรับช่วงอายุ 6 เดือนถึง 3 ปี 8 ตัวอย่าง และ ช่วงอายุ 1 ปีขึ้นไป 5 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าต่ำสุดเท่ากับ $(0.67\pm1.15)\times10^{1}$ CFU/g และค่าสูงสุดเท่ากับ $(1.73\pm0.85)\times10^{2}$ CFU/g ส่วนนมผงสำหรับผู้ใหญ่ค่าสูงสุดเท่ากับ $(5.2\pm1.1)\times10^{2}$ CFU/g โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในนมผงทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $(1.22\pm4.9)\times10^{1}$ CFU/g (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในนมผงทั้ง 30 ตัวอย่างจะอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10^{2} CFU/g

Burapha University

คิดเป็น 76.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมามีค่ามากกว่า 10^2-10^3 CFU/g เท่ากับ 10^2 CFU/g และมากกว่า 10^3 CFU/g คิดเป็น 16.67, 3.33 และ 3.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งเปรียบเทียบกับการรายงานของ Iversent and Forsythe (2004) ที่ได้ทำการจำแนกเชื้อ *Enterobacter sakazakii* และแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae จากนมผงสูตรสำหรับเด็กทารกและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ตัวอย่างนมผงสูตรสำหรับเด็กทารก 82 ตัวอย่าง ในการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 10^2 CFU/g คิดเป็น 56 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 10^2 CFU/g คิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 10^2- 10^3 CFU/g คิดเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ และมีค่ามากกว่า 10^3 CFU/g คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนนมผงมีทั้งหมด 72 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 10^2 CFU/g คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 10^2 - 10^3 CFU/g คิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 10^3-10^4 CFU/g คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าจากการทดลองนี้จะให้ผลแตกต่างจากการรายงานของ Iversent and Forsythe (2004) แต่จะพบเปอร์เซ็นต์สูงสุดของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10^2 CFU/g เช่นเดียวกัน โดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในนมผงนี้แสดงให้เห็นว่านมผง 30 ตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบเป็นไปตามมาตรฐานกำหนดเรื่องปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 156 และ 265 ที่ได้กำหนดว่านมผงสูตรสำหรับเด็กทารกต้องมีแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน $1x10^4$ CFU/g และในนมผงต้องมีแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน $5x10^4$ CFU/g สำหรับการพบปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในนมผงนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการให้ความร้อน การปนเปื้อนและการเจริญในระหว่างการเก็บไว้ในถังเก็บนมและท่อส่งนม (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) ซึ่งหากนมดิบที่นำมาผลิตนมผงมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณมากก็จะทำให้มีการหลงเหลือของจุลินทรีย์ในนมผงปริมาณมากด้วยเช่นกัน (Fernandes de Oliveira *et al.*, 2000) เนื่องจากความร้อนที่ให้ในกระบวนการผลิตสามารถทำลายเชื้อได้ แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปก็มีโอกาสที่จะเกิดการรอดชีวิตของเชื้อได้มากขึ้น รวมทั้งวิธีการทำให้แห้งและการปนเปื้อนจากอากาศก็มีผลต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในเนยแข็งพบว่ามีตัวอย่างเนยแข็งที่ไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียมี 3 ตัวอย่างคือ ในตัวอย่างที่ 8, 19 และ 25 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำนมดิบที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งผ่านการพาสเจอร์ไรซ์และการกำจัดแบคทีเรียออก ซึ่งพบว่าการพาสเจอร์ไรซ์ในระบบ HTST โดยใช้อุณหภูมิ 71-72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ และการกำจัดแบคทีเรียที่ปนอยู่ในน้ำนมออกโดยระบบการปั่น (centrifuge) โดยการปั่นโดยวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูง ทำให้สปอร์หรือแบคทีเรียถูกปั่นออกไปถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (นรินทร์, 2531) รวมถึงในขั้นตอนการใส่โซเดียมคลอไรด์ลงไปในเคิร์ด เพื่อทำให้ได้เนยแข็งที่มีกลิ่นหอมและรสกลมกล่อมดี ก็ช่วยทำลายเชื้อที่ทำให้อาหารเสียและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536) สำหรับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในเนยแข็งนั้น พบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 10^2 CFU/g คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ พบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่ามากกว่า 10^2-10^3 CFU/g คิดเป็น 13.34 เปอร์เซ็นต์ และพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่ามากกว่า 10^3 CFU/g คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบปริมาณแบคทีเรียที่มีค่าเท่ากับ 10^2 CFU/g (ตารางที่ 1) สำหรับตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียมากมี 4 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด คือ $(2.34\pm15.95)x10^5$, $(2.91\pm18.08)x10^5$, $(2.87\pm26.58)x10^5$ และ $(1.22\pm33.08)x10^5$ CFU/g ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยเนยแข็งที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด เป็นเนยแข็งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว 1 ตัวอย่าง จาก 2 ตัวอย่าง และเนยแข็งชนิดแข็ง 3 ตัวอย่างจาก 19 ตัวอย่าง จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมดน้อยกว่ารายงานของ Iurlina and Fritz (2004) ที่ได้ศึกษาคุณภาพของเนยแข็ง Post Salut Argentino ในประเทศอาร์เจนตินา ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาในระหว่าง 10 วัน หลังจากบ่ม ที่มีการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส รวมกันนาน 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดพบระหว่าง 10^4 และ 10^7 CFU /g และในรายงานของ Aygun *et al.*, (2005) ซึ่งศึกษาคุณภาพของเนยแข็ง Carra ในแอนติอ็อก (Antioch) ประเทศตุรกี โดยทำการสุ่มตัวอย่างของเนยแข็ง Carra เนยแข็งที่ผลิตจากนมสด จำนวน 50 ตัวอย่าง มาทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.87 ± 10^8 CFU/g และในรายงานของ Ashenati (1990) ที่ได้ศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนยแข็ง Ayib (cottage cheese) ที่นำมาจากตลาด Awassa จำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 10^8 CFU/g การที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในเนยแข็ง อาจเนื่องมาจากสุขลักษณะในขั้นตอนการผลิตเนยแข็ง มีการปนเปื้อนในน้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต นมที่ส่งออกจากฟาร์มไปยังโรงงานอาจเกิดการปนเปื้อน ขณะอยู่ในถังเก็บรวบรวมนม ในท่อส่งนม รวมทั้งอาจมีการปนเปื้อนจากเครื่องมือต่าง ๆ ในโรงงาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เช่น ภาชนะที่ใช้ในการบรรจุต่างๆ การปนเปื้อนอาจจะมีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับวิธีการทำความสะอาดและสุขาภิบาลของโรงงาน คนงานอาจเป็นพาหะนำเชื้อโรคเข้ามาปนเปื้อนน้ำนมได้ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) นอกจากนี้การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเนยแข็งนั้น อาจยังหลงเหลืออยู่ภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536)

ตารางที่ 1 *เปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างนมผงและเนยแข็ง*

ตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)			
	$<10^2$	10^2	$>10^2$-10^3	$>10^3$
นมผงสำหรับช่วงอายุแรกเกิดถึง 1 ปี (11)	81.80	0	9.1	9.1
นมผงสำหรับช่วงอายุ 6 เดือนถึง 3 ปี (8)	75	0	25	0
นมผงสำหรับช่วงอายุ 1 ปี ขึ้นไป (5)	80	20	0	0
นมผงสำหรับผู้ใหญ่ (6)	66.67	0	33.33	0
นมผงทั้งหมด (30)	**76.67**	**3.33**	**16.67**	**3.33**
เนยแข็งชนิดอ่อน (9)	66.66	11.11	11.11	11.11
เนยแข็งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (2)	50.00	0	0	50
เนยแข็งชนิดแข็ง (19)	68.42	0	15.79	15.79
เนยแข็งทั้งหมด (30)	**66.67**	**3.34**	**13.34**	**16.67**

หมายเหตุ : ( ) = จำนวนตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *E. coli*

การตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ในนมผงนั้นพบว่าตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ทุกตัวอย่าง แสดงว่านมผงที่นำมาทดสอบทั้งหมดมีความปลอดภัยและการสุขาภิบาลที่ดีในกระบวนการผลิต เนื่องจาก *E. coli* เป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและเป็นดรรชนีชี้บ่งความปลอดภัยของการสุขาภิบาลอาหารในโรงงานผลิตนม (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) เนื่องมาจากในลำไส้ของมนุษย์จะมี *E. coli* อยู่เป็นจำนวนมาก และจะออกจากร่างกายโดยปนมากับอุจจาระเช่นเดียวกับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอุจจาระร่วง ดังนั้นจึงใช้ *E. coli* เป็นดัชนีแสดงความสะอาดของอาหาร โดยในอาหารที่มี *E. coli* ปนเปื้อนอยู่จำนวนมากแสดงว่าอาหารนั้นไม่ค่อยสะอาดและอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงอีกด้วย (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) ดังนั้นสาเหตุที่ไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* ก็อาจเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตนมผงจะทำนมให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบสเปรย์หรือแบบดรัม ซึ่งนมที่นำมาทำนมผงจะต้องมีการให้ความร้อนมาก่อนเช่นเดียวกับนมระเหยน้ำแล้วจึงนำมาทำแห้ง ถ้าทำแห้งแบบสเปรย์ต้องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 68.8-93.3 องศาเซลเซียส แต่ถ้าทำแห้งแบบดรัม ต้องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65-85 องศาเซลเซียส (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) ซึ่งสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* ได้ เพราะโดยทั่วไปแล้ว *E. coli* ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน เช่นอุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) สำหรับการสำรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในเนยแข็งนั้นพบว่าส่วนใหญ่พบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ E. coli น้อยกว่า 3 MPN/g มีเพียงตัวอย่างเดียวที่พบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม โดยพบในเนยแข็งตัวอย่างที่ 26 ซึ่งเป็นเนยแข็งชนิดแข็ง โดยมีปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มเท่ากับ 460 MPN/g คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด โดยให้ผลที่แตกต่างกับการรายงานของ Ashenati (1990) ที่ได้ศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนยแข็ง Ayib (cottage cheese) ที่นำมาจากตลาด Awassa จำนวน 100 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม 55 เปอร์เซ็นต์ และต่างจากรายงานของ Mor-Mur *el al.*, (1992) ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเนยแข็งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว ในระหว่างการผลิตจำนวน 42 ตัวอย่าง ที่พบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม 25 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด และรายงานของ Tekinsen and Ozdemir (2006) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ในประเทศตุรกี โดยทำการสำรวจเนยแข็งที่ไม่ได้บ่มจำนวน 50 ตัวอย่าง ในร้านค้าขายปลีก Van

และร้าน Hakkari โดยพบ *E. coli* 62 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด การที่พบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในตัวอย่างเนยแข็งชนิดนี้มากที่สุด อาจเนื่องมาจากในโรงงานผลิตเนยแข็งชนิดนี้ มีกรรมวิธีในการผลิตที่อาจไม่ถูกสุขลักษณะหรือมีการปนเปื้อนจากน้ำนมที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตเนยแข็ง (เนาวรัตน์ ปานแจ่ม และคณะ, 2543) เครื่องมือ เครื่องใช้ต่าง ๆ ในการเก็บนม เช่น เครื่องรีดนม ซึ่งประกอบด้วย ตัวดูด หัวนม ท่อน้ำนม และถังรองรับนม ถ้าทำความสะอาดไม่เพียงพอหลังการใช้และไม่ตากแห้ง ก็อาจทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มได้ โดยการใช้เศษนมที่เหลือตกค้างอยู่แล้วไปรวมกับนมที่รีดมาใหม่ เมื่อนำมาใช้อีกครั้งหนึ่ง (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) หรืออาจจะเกิดจากการปนเปื้อนในขั้นตอนของการเก็บรักษาเนยแข็งได้ (Ceylan *et al.*, 2003) การปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มในเนยแข็งปริมาณมาก เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะไม่ดีในการผลิตเนยแข็ง

3. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในอาหารในนมผงได้แก่ *B. cereus, L. monocytogenes, S. aureus* และ *Salmonella* นั้นพบ *B. cereus* 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Marth and Steele (2001) ที่ได้รวบรวมไว้คือ พบ *B. cereus* จำนวนระหว่าง 13-43 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างนมผงขาดมันเนย และนมผงสูตรสำหรับเด็กทารก จากทิศตะวันตกของประเทศเยอรมนี และพบ 17 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างนมผงสูตรสำหรับเด็กทารกในกลุ่มประเทศสหราชอาณาจักร รวมทั้งได้มีรายงานการพบ *B. cereus* 5 ตัวอย่างจากนมผง 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 62.5 เปอร์เซ็นต์ ในประเทศแคลิฟอร์เนีย สาเหตุของการปนเปื้อนของ *B. cereus* เนื่องมาจาก *B. cereus* จะปนเปื้อนในนมผงอยู่ในรูปของสปอร์ซึ่งสามารถจะทนความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตได้ หลังจากนั้นหากได้รับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ สปอร์จะมีการงอกและพัฒนาเป็นเซลล์ปกติ (Rückert *et al.*, 2004) นอกจากนี้ในการทดลองได้ทำการตรวจหา *L. monocytogenes* แต่ไม่พบในตัวอย่างนมผงทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Pak *et al.*, (2002) ที่ได้รายงานการศึกษาถึงอันตรายที่มีปัจจัยมาจากการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์นม ของประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ในปี 1990-1999 โดยในการศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหาการแพร่กระจายของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์นมของประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ซึ่งตลอดระยะเวลา 10 ปีในการศึกษาที่ผ่านมาไม่พบการปนเปื้อนของ *L monocytogenes* ในตัวอย่างนมผง

จากการทดลองไม่พบ *L. monocytogenes* ในนมผงแต่พบการปนเปื้อนของ *Listeria* sp. คิดเป็น 6.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งการปนเปื้อนของ *Listeria* sp. อาจเกิดจากขั้นตอนการบรรจุ เนื่องจากในกระบวนการผลิตจะมีการให้ความร้อน ซึ่ง *Listeria* sp. สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส (Marth & Steele, 2001) เพราะฉะนั้นในกระบวนการผลิตอุณหภูมิที่ใช้ 65-93.3 องศาเซลเซียส จึงน่าจะสามารถกำจัดเชื้อลงได้ ดังนั้นการปนเปื้อนน่าจะเกิดขึ้นหลังจากกระบวนการให้ความร้อน สำหรับการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในนมผงไม่พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Iversent and Forsythe (2004) ที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* ในนมผงสูตรสำหรับเด็กทารกและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องจากนมผง 72 ตัวอย่าง และนมผงสูตรสำหรับเด็กทารก 82 ตัวอย่าง รวมทั้งสอดคล้องกับการรายงานของ Carneiro *et al.*, (2003) ที่ตรวจไม่พบ *S. aureus* และ *Salmonella* sp. จากนมผงสูตรสำหรับเด็กทารก 90 ตัวอย่าง จากการที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* และ *S. aureus* อาจเนื่องมาจาก เชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* ถูกทำลายในขั้นตอนการให้ความร้อนของกระบวนการผลิตหากมีการปนเปื้อนของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มาในนมดิบที่ใช้ผลิตนมผง เนื่องจาก *S. aureus* และ *Salmonella* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส เท่านั้น รวมทั้งในนมผงจะมีน้ำที่อยู่ในนมผงไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ (เสาวลักษณ์ ภูมิวสนะ, 2539) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญต่อการเจริญของเชื้อ โดย *Salmonella* สามารถเจริญได้ที่ค่า a_w มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 และ *S. auerus* เจริญได้ที่ค่า a_w เท่ากับ 0.84 (Marth & Steele, 2001)

การนำผลิตภัณฑ์เนยแข็งจำนวน 30 ตัวอย่าง มาตรวจหาแบคทีเรียก่อโรค พบว่าตัวอย่างเนยแข็งทุกตัวอย่างไม่มีแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus, Salmonella* sp,. *B. cereus* และ *L. monocytogenes* (ตารางที่ 2) ซึ่งจากมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 209) พ.ศ. 2543 ได้กำหนดมาตรฐานไว้ว่าต้องไม่พบเชื้อก่อโรคทุกชนิด แสดงว่าผลิตภัณฑ์เนยแข็งมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดทุกตัวอย่าง การไม่พบแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนยแข็งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Iurlina and Fritz (2004) ที่ได้ศึกษาคุณภาพของเนยแข็ง Post Salut Argentino ในประเทศอาร์เจนตินา ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาในระหว่าง 10 วัน หลังจากบ่ม ที่มีการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส รวมกันนาน 12 ชั่วโมง พบว่าไม่พบ *Listeria* spp. และ *Salmonella* spp.

ทั้ง 2 อุณหภูมิ และในรายงานของ Aygun *et al.*, (2005) ได้ศึกษาคุณภาพของเนยแข็ง Carra ในแอนติอ็อก (Antioch) ประเทศตุรกี โดยทำการสุ่มตัวอย่างของเนยแข็ง Carra เนยแข็งที่ผลิตจากนมสด จำนวน 50 ตัวอย่าง มาทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าไม่พบ *Salmonella* spp. ในทุก ๆ ตัวอย่างเช่นเดียวกัน ส่วนในรายงานของ Luca *et al.*, (1997) พบว่าให้ผลที่แตกต่างกัน โดยศึกษาการปนเปื้อนของ *Staphylococcus* spp. โดยเฉพาะ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์นมที่ขายในพื้นที่ Bologna พบว่าสามารถตรวจพบ *S. aureus* 16.30 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างเนยแข็ง 135 ตัวอย่าง และในรายงานของ Iurlina and Fritz (2004) พบ *B. cereus* 50 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างเนยแข็งทั้งหมด จากการทดลองนี้ที่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมดอาจจะเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตเนยแข็งจะมีการใช้หัวเชื้อเริ่มต้นแลคติกเติมลงไปในนม เพื่อให้เกิดการสร้างกรดแลคติกที่ช่วยเสริมให้นมตกตะกอนได้ดีขึ้นเมื่อใส่สารจับก้อน (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536) โดยหัวเชื้อแลคติกที่ใช้ได้แก่ *Streptococcus lactis, Leuconostoc cremoris, S. thermophilus, Lactobacillus helveticus, L. bulgaricus, L. lactis* และ *L. acidophiius* (Vanderzant & Splittatoesser, 1992) ซึ่งผลของการใช้หัวเชื้อแลคติกนั้นนอกจากจะช่วยให้นมตกตะกอนแล้วยังจะช่วยทำให้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ โดยหัวเชื้อจะผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารปฏิชีวนะ เช่น ไนซิน ซึ่งสารเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและ enterotoxin ได้ เมื่อหัวเชื้อผลิตกรดหรือสารต่างๆ ที่กล่าวมาไม่เพียงพอเนื่องจากการปนเปื้อนของฟาจและสารปฏิชีวนะ หรือใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้ช้า Staphylococci และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่น ๆ จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็นผลให้เนยแข็งเกิดอันตรายจากเชื้อที่ทำให้อาหารเป็นพิษ และเกิดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะได้ อย่างไรก็ตามแม้จะอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมของกรดที่เหมาะสมการเพิ่มและอัตราการตายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ก็มีอิทธิพลทำให้หัวเชื้อที่ใช้บางสายพันธุ์ มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้ (Robinson, 1990) นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตเนยแข็งมีการควบคุมการเน่าเสียของเนยแข็ง โดยการนำสปอร์แบคทีเรียออกจากน้ำนมในโรงงานผลิตเนยแข็งหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเนยแข็ง โดยจำนวนของแบคทีเรียสร้างสปอร์สามารถลดลงในน้ำนมได้โดยการปั่นเหวี่ยงออก การงอกของสปอร์ในเนยแข็งสามารถยับยั้งได้ โดยการเติม nitrate หรือ lysozyme ซึ่ง nitrate ที่อยู่ในเนยแข็งเป็นสารปรุงแต่งที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และ lysozyme ก็ให้การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เช่นเดียวกัน แต่จะไม่ให้การยับยั้งที่สมบูรณ์นัก ส่วน Bacteriocins ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกก็ให้การยับยั้งที่จำเพาะเจาะจงอย่างสูงต่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ได้เช่นเดียวกัน (Doyle *et al.*, 1997) หรือการใส่โซเดียมคลอไรด์ปริมาณเล็กน้อยลงไปในเคิร์ด ก็ช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและแบคทีเรียก่อโรคได้ (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536) ดังนั้นจึงทำให้ไม่พบแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าว

ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของนมผงและเนยแข็ง พบว่านมผงที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่ได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 156 และ 265 ยกเว้นนมผงจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบแบคทีเรียก่อโรค โดยพบ *B. cereus* ซึ่ง *B. cereus* สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้จึงทำให้ป้องกันการปนเปื้อนได้ยาก ดังนั้นผู้บริโภคนมผงควรดื่มนมให้หมดในทันทีไม่ควรเหลือทิ้งไว้เนื่องจากสปอร์ *B. cereus* สามารถจะเจริญและเพิ่มจำนวนจนกระทั่งสามารถก่อโรคได้ ในด้านผู้ผลิตควรตรวจสอบและป้องกันการปนเปื้อนจาก *B. cereus* ให้มากยิ่งขึ้นโดยการเลือกนมดิบที่มีคุณภาพดีและควรทำความสะอาดถังเก็บนมดิบอยู่เป็นประจำ สำหรับผลิตภัณฑ์เนยแข็งทั้งหมดนั้นได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 209) พ.ศ. 2543 ในด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค แต่ในด้านแบคทีเรียโคลิฟอร์ม มี 1 ตัวอย่างที่พบจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มมาก รวมทั้งพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนมาก 4 ตัวอย่าง แต่ก็ยังอยู่ในมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขในด้านอาหารปรุงสุกทั่วไป โดยสาเหตุหลักในการพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียโคลิฟอร์มมากน่าจะมาจากสุขลักษณะที่ไม่ดีในโรงงานผลิตเนยแข็ง มีการปนเปื้อนจากน้ำนมที่เป็นวัตถุดิบ อุปกรณ์ภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้ ที่เกี่ยวกับการรีดนมที่สกปรกหรือแบคทีเรียที่ติดไปจากมือที่ไม่สะอาดของคนที่รีดนม ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มได้ (นรินทร์ ทองศิริ, 2531) ดังนั้นผู้ผลิตควรให้ความสำคัญในเรื่องการปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตสุขลักษณะในโรงงานผลิต ผู้ปฏิบัติงานควรมีสุขภาพดี การเตรียมการบรรจุ ต้องถูกสุขลักษณะ ไม่เกิดการปนเปื้อนของผู้ปฏิบัติงาน ผู้ขายปลีกควรมีความรู้ ความเข้าใจในเรื่องของการควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เก็บผลิตภัณฑ์ ให้ความเหมาะสมในขณะที่มีการเก็บรักษา และการวางจำหน่าย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 *การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในนมผง*

ตัวอย่างนมผง	จำนวนตัวอย่าง	แบคทีเรียก่อโรค			
		S. aureus	*B. cereus*	*Salmonella* sp.	*Listeria* sp.
สำหรับช่วงอายุแรกเกิดถึง 1 ปี	11	0	1	0	1
สำหรับช่วงอายุ 6 เดือนถึง 3 ปี	8	0	0	0	0
สำหรับช่วงอายุ 1 ปีขึ้นไป	5	0	1	0	0
สำหรับผู้ใหญ่	6	0	1	0	1
รวม	30	0	3	0	2
เปอร์เซ็นต์	**100**	**0**	**10**	**0**	**6.67**

สรุป

จากการตรวจสอบคุณภาพนมผงและเนยแข็งที่มีจำหน่ายตามห้างสรรพสินค้า 2 แห่งในจังหวัดชลบุรี พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในนมผงมีปริมาณต่ำสุดคือ $(0.3\pm0.58)\times10^1$ CFU/g และปริมาณสูงสุดเท่ากับ $(4.58\pm2.74)\times10^3$ CFU/g ในตัวอย่างนมผงช่วงอายุแรกเกิดถึง 1 ปี ซึ่งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในนมผงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $(1.22\pm4.9)\times10^1$ CFU/g โดยปริมาณทั้งหมดจะอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10^2 CFU/g คิดเป็น 76.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมามีค่ามากกว่า 10^2-10^3 CFU/g เท่ากับ 10^2 CFU/g และมากกว่า 10^3-10^4 CFU/g คิดเป็น 16.67, 3.33 และ 3.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับในเนยแข็งพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่มีค่าน้อยกว่า 10^2 CFU/g คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ โดยพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 10^2, มากกว่า 10^2-10^3 และมากกว่า 10^3 CFU/g คิดเป็น 3.34, 13.34 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด ตามลำดับ พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม 1 ตัวอย่างในเนยแข็ง โดยพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มเท่ากับ 460 MPN/g คิดเป็นร้อยละ 3.33 ของตัวอย่างเนยแข็งทั้งหมด ส่วนในนมผงและเนยแข็งที่เหลือทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 3 MPN/g จากการสำรวจแบคทีเรียก่อโรคในนมผงและเนยแข็งนั้นจะพบเพียง *B. cereus* จำนวน 3 ตัวอย่าง ในตัวอย่างนมผงเท่านั้น ซึ่งคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างนมผงทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบ *Listeria* sp. 2 ตัวอย่าง ในตัวอย่างนมผง คิดเป็น 6.67 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างนมผงทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2536). *เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร*. วันที่ค้นข้อมูล 20 มีนาคม 2549, เข้าถึงได้จาก http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/varity/law.htm

กลุ่มวิจัยและพัฒนาสินค้าและบริการ กรมส่งเสริมสหกรณ์. (2547). *คู่มือการผลิตสินค้าชุมชน หมวดอาหารและเครื่องดื่มที่ได้มาตรฐาน*. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมสหกรณ์.

นรินทร์ ทองศิริ. (2531). *เทคโนโลยีอาหารนม*. เชียงใหม่ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์*. กรุงเทพ ฯ : โอเดียนสโตร์.

เนาวรัตน์ ปานแจ่ม, ธาริยา เสาวรัญ และธีระศักดิ์ สุภาไชยกิจ. (2543). คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเครื่องดื่มทำจากผักและผลไม้ใน 6 จังหวัดชายแดนภาคใต้ พ. ศ. 2535-2540. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 42*(3), 240-248.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. (2536). *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม: จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรมอาหาร*. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

เสาวลักษณ์ ภูมิวสนะ. (2539). *นมผงและผลิตภัณฑ์นม*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2541). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ : ชัยเจริญ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุวิมล กีรติพิบูล. (2545). *ระบบประกันคุณภาพด้านความปลอดภัยของอาหาร*. กรุงเทพ ฯ : ส.ส.ท.

Andrews, W.H., & Hammack, T.S. (2001). *Salmonella. Bacteriological Analytical Manual Online*. Retrieved October 20, 2005, from http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html

AOAC. (1990). *Official methods of analysis*. (15th ed.). Arlington,Virginia : The association of official analytical chemists.

Ashenati, M. (1990). Microbiological quality of ayib, a traditional ethiopian cottage Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 263-268.

Aygun, O., Aslantas, O., & Oner, S. (2005). A survey on the microbiological quality of carra, a traditional turkish Cheese. *Journal of Food Engineering, 66*, 401-404.

Bennett, R.W., & Weaver, R.E. (2001). *Staphylococcus aureus. Bacteriological Analytical Manual Online.* Retrieved October 20, 2005, from http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html

Carneiro, L.A.M., Silva, A.P.S., Merquior, V.L.C., & Queiroz, M.L.P. (2003). Antimicrobail resistance in Gram-negative bacilli isolated from infant formulas. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 175-179.

Ceylan, Z. G., Turkoglu, H., & Dayisoylu, K. S. (2003). The microbiological and chemical quality of Sikma Cheese Produced in Turkey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 95-97.

Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T.J. (1997). *Food microbiology : fundamentals and frontiers.* Washington, DC : ASM Press.

Fernandes de Oliveira, C.A., Mestieri, L., Santos, M.V., Moreno, J.F.G., Spers, A., & Germano, P.M.L. (2000). Effect of Microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. *Brazillian Journal of Microbiology, 31*, 95-98.

Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (1978). *Food microbiology.* (3rd ed.). New York : McGraw-Hill.

Hitchins, A.D. (2003). *Listeria monocytogenes. Bacteriological nalytical Manual Online.* Retrieved October 20, 2005, from http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html

Iurlina, M. O., & Fritz, R. (2004). Microbiological quality of Port Salut Argentino cheese stored at two temperature treatments. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 37*, 739-748.

Iversent, C., & Forsythe, S. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formular milk and related products. *Food Microbiology, 21*, 771-777.

Luca, G. D., Zanetti, F., & Stampi, S. (1997). *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. *International Journal of Food Microbiology, 35*, 267-270.

Marth, E.H.,& Steele, J.L. (2001). *Applied Dairy Microbiology.* New York : Marcel Dekker, Ink.

Mor-Mur, M., Carretero, C., Pla, R., & Guamis, B. (1992). A survey on the microbiological quality of a semi-soft on-farm manufactured goat cheese. *Food Microbiology*, 9, 345-352.

Pak, S-I1., Spahr, U., Jemmi, T., & Salman, M.D. (2002). Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Preventive Veterinary Medicine, 53*, 55-65.

Rhodehamel, E.J., & Harmon, S.M. (2001). *Bacillus cereus. Bacteriological Analytical Manual Online.* Retrieved October 20, 2005, from http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html

Robinson, R. K., (1990). *Dairy Microbiology.* (2nd ed.). London : Elsevier Applied Science.

Rückert, A., Ronimus, R.S., & Morgan, H.W. (2004). A RAPD-based survey of thermophilic Bacilli in milk powder form different counties. *International Journal of Food Microbiology, 96*, 263-272.

Sherris, J.C. (1991). *Medical microbiology : an introduction to infections diseases.* (2nd ed.). New York : Elsevier Science.

Svensson, B., Monthan, A., Shaheen,R., Andersson, M.A, Salkinoja-Salonen, M., & Christiansson, A. (2006). Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal, 16*, 740-749.

Tekinsen, K. K., & Ozdemir, Z. (2006). Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. *Food Control, 17*, 707-711.

Vanderzant, C., & Splittatoesser, D. F. (1992). *Compendium of method for the microbiological examination of foods.* Washington DC. : American Public Health Association.

Burapha University