

## RESEARCH ARTICLE

## Effects of Storage Temperature and Time on Concentration of *Bacillus cereus* in Pasteurized Milk

Supap Meechok<sup>1</sup>, Piyawat Saipan<sup>1\*</sup>, Polson Mahakhan<sup>2</sup>

### Abstract

**Objective** — The present study was designed to evaluate the concentration of *B. cereus* in pasteurized milk at several storage times and temperatures.

**Materials and Methods** — The pasteurized milk samples were taken from the 4 manufactories in 4 provinces of the Northeast. One hundred and twelve samples from total of 16 batches were collected between November 2009 and July 2010. Samples of commercially processed pasteurized milk were taken immediately after packaging and were kept in ice box during their transportation to the laboratory. In laboratory, the samples were subsequently stored at 4 and 8°C for 4, 7 and 10 days. Bacteria counts were determined by following the U.S. FDA's of Bacteriological analysis manual: *Bacillus cereus*. Data were analyzed by ANOVA and Duncan's New Multiple Test procedure.

**Results** — The initial counts of *B. cereus* in pasteurized milk were the range of 3.0 to 7.0x10<sup>3</sup> cells/ml. After storage at 4°C for 4 to 10 days, the contamination levels ranged from 3.0x10<sup>3</sup> to 6.4x10<sup>4</sup> cells/ml. At the 8°C, the counts of *B. cereus* varied from 4.0x10<sup>3</sup> to 1.5x10<sup>5</sup> cells/ml after storage for 4 to 10 days. Significant difference in mean count of *B. cereus* was observed between the storage temperature at 4°C for 4 and 10 days (p-value < 0.05). The mean count of *B. cereus* was significantly higher in milk after storage at 8°C for 10 day than 4 and 7 days (p-value < 0.05) and significant differences was stored at 4°C and 8°C for 10 day (p-value < 0.05).

**Conclusion** — The temperatures and times of storage had effect on an increase of *B. cereus* concentration in pasteurized milk.

KKU Vet J. 2010;20(2):199-207

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**Keywords:** *Bacillus cereus*; Pasteurized milk; Storage time; Storage temperature

<sup>1</sup>Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

\*Corresponding author: spiyaw@kku.ac.th

# ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณเชื้อ บาซิลลัส ซีเรียส ในนมพาสเจอร์ไรส์

สุภาพ มีโชค<sup>1</sup>, ปิยวัฒน์ สายพันธ์<sup>1\*</sup>, พลสันต์ มหาจันทร์<sup>2</sup>

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** การศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินผลของอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์ที่ต่างกันต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus*

**วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ** เก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์จาก 4 แหล่งผลิตใน 4 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงกรกฎาคม 2553 ได้นมทั้งหมด 112 ตัวอย่างจาก 16 ชุดการผลิต เก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ทันทีที่ผลิตเสร็จ บรรจุในกล่องน้ำแข็งและขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ จากนั้นจัดแบ่งตัวอย่างนมเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 8°C เป็นเวลา 4, 7 และ 10 วันตรวจหาปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามวิธีอ้างอิงขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Bacteriological analysis manual: *Bacillus cereus*) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ Duncan's New Multiple Test

**ผลการศึกษา** ปริมาณเริ่มต้นของเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างนมที่เก็บจากโรงงานมีค่าระหว่าง  $3.0$  ถึง  $7.0 \times 10^3$  เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ถึง 10 วัน พบเชื้อมีปริมาณตั้งแต่  $3.0 \times 10^3$  ถึง  $6.4 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8°C ในเวลา 4 ถึง 10 วันพบเชื้อมีปริมาณ  $4.0 \times 10^3$  ถึง  $1.5 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 และ 10 วันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8°C เป็นเวลา 10 วันปริมาณเชื้อสูงกว่าการเก็บรักษา 4 และ 7 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) ในขณะที่การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C และ 8°C ทำให้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05)

**ข้อสรุป** อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษา มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(2):199-207

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**คำสำคัญ** : บาซิลลัส ซีเรียส นมพาสเจอร์ไรส์ ระยะเวลาเก็บรักษา อุณหภูมิเก็บรักษา

<sup>1</sup>ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

\*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: spiyaw@kku.ac.th

## บทนำ

บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นท่อนตรงอยู่เป็นสายเคลื่อนที่ได้และสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนและสามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำกว่า  $5^{\circ}\text{C}$  พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมของฟาร์มปศุสัตว์และปนเปื้อนเข้ามาสู่น้ำนมดิบได้ เมื่อผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมด [1] Lin และคณะ [2] พบว่าในน้ำนมดิบที่ตรวจพบ *B. cereus* ร้อยละ 10 ของตัวอย่างทั้งหมด เมื่อผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์แล้วสามารถพบ *B. cereus* ได้ถึงร้อยละ 80 และมีปริมาณสูงถึง  $1.1 \times 10^5$  โคโลนี/มิลลิลิตร ESR [1] รายงานว่าการพาสเจอร์ไรส์โดยใช้อุณหภูมิ  $63^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาทีและ  $80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 วินาที ไม่สามารถทำลาย *B. cereus* ในตัวอย่างน้ำนมได้ทั้งหมด โดยพบว่าที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวยังมี *B. cereus* มีชีวิตรอดได้ถึงร้อยละ 54 และ 61 ตามลำดับ ดังนั้นถ้าเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์หลังการผลิตที่ระยะเวลาและอุณหภูมิไม่เหมาะสม เชื้อสามารถแบ่งตัวและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว บางรายงานพบว่าที่อุณหภูมิ  $7^{\circ}\text{C}$  เชื้อ *B. cereus* สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นหนึ่งเท่าภายในระยะเวลาเพียง 8 - 9 ชั่วโมงเท่านั้น [1, 3] การก่อโรคของเชื้อ *B. cereus* เนื่องมาจากการผลิตสารพิษชนิดเอนเทอโรทอกซินที่ทำให้เกิดการอาเจียน (emetic enterotoxin) และท้องเสีย (diarrhoeogenic enterotoxin) ซึ่งพบว่าถ้ามีจำนวนเชื้อถึง  $10^5$  เซลล์/กรัมหรือมิลลิลิตรของอาหาร จะตรวจพบสารพิษในปริมาณที่เป็นอันตรายได้ [1, 4]

จากการทบทวนเอกสารพบว่าข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องกับปริมาณเชื้อ *B. cereus* ระยะเวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแตกต่างกันตามสภาพภูมิประเทศและมาตรฐานอาหารของแต่ละประเทศ Te Giffels และคณะ [5] เก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์จากตู้เย็นตามครัวเรือนของชาวเนเธอร์แลนด์จำนวน 133 ตัวอย่างตรวจพบ *B. cereus* ได้ถึง 50 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.59) ในขณะที่ Larsen และ Jorgensen [6] ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ร้อยละ 46.69 ของตัวอย่างทั้งหมดมีปริมาณระหว่าง  $10^3 - 3 \times 10^5$  โคโลนี/มิลลิลิตร Notermans และคณะ [7] พบว่า การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่  $6 - 12^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 - 12 วันตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณมากกว่า  $10^4$  โคโลนี/มิลลิลิตรถึงร้อยละ 12 ของตัวอย่างทั้งหมด และแนะนำว่าควรเก็บนมไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ไม่เกิน  $7^{\circ}\text{C}$  ในเวลาไม่เกิน 7 วัน เป็นต้น ในขณะที่ประเทศไทยไม่ได้กำหนดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในน้ำนมไว้เป็นการเฉพาะ เป็นเพียงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (total bacteria) โดยกำหนดให้น้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ 1 มิลลิลิตรต้องตรวจพบแบคทีเรียได้ไม่เกิน 10,000 เซลล์ ณ แหล่งผลิตและไม่เกิน 50,000 เซลล์ ตลอดระยะเวลาเมื่อออกจากแหล่งผลิตจนถึงวันหมดอายุการบริโภคที่ระบุบนฉลาก [8] เวณิกา และคณะ [9] รายงานว่าพบเชื้อบาซิลลัสในนมพาสเจอร์ไรส์ที่ผลิตเพื่อใช้สำหรับโครงการนมโรงเรียนถึงร้อยละ 21 ในขณะที่รายงานจากคณะกรรมการอาหารและยา [10] ที่ได้จากโครงการพัฒนามาตรฐานนมพร้อมดื่มแบบยี่เย็นระหว่างปี 2546 - 2548 พบว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่ไม่ผ่านมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนถึงร้อยละ 57.1 - 72.92 และพรเพชร [11] รายงานว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่ผลิตในประเทศไทยร้อยละ 47.62 ไม่ผ่านเกณฑ์

มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่กำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุขเมื่อใช้ระยะเวลาเก็บรักษาถึง 10 วัน ดังนั้นจะเห็นว่ามี ความแตกต่างกันตามระบบผลิตและคุณภาพนมในแต่ละท้องถิ่น อย่างไรก็ตามเป็นที่ยอมรับว่าเชื้อ *B. cereus* มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพนมพาสเจอร์ไรส์เนื่องจาก ลักษณะของเชื้อมีความทนทานต่ออุณหภูมิขณะพาสเจอร์ไรส์ และสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 5 °C [1] ในประเทศไทยมีความพยายามจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจัดทำร่างมาตรฐานของ เชื้อ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ และอยู่ระหว่างการรวบรวมข้อมูลเพิ่มเติมจากนักวิจัย ผู้ผลิตและ ผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องอื่นๆ ก่อนที่จะกำหนดเป็นมาตรฐานในลำดับต่อไป การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นส่วนหนึ่ง ในการระบุปัญหาของ *B. cereus* ที่อาจพบในทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเก็บตัวอย่างจาก โรงงานผลิตที่มีอยู่ในท้องถิ่น และนำนมพาสเจอร์ไรส์นั้นมาทดสอบในห้องปฏิบัติการถึงผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษาที่แตกต่างกันต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus*

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### ตัวอย่าง และการออกแบบการทดลอง

เก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์จากแหล่งผลิตจำนวน 4 แห่งที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี มหาสารคาม และจังหวัดสุรินทร์ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงกรกฎาคม 2553 จำนวน 16 ชุด การผลิต (batches) รวมตัวอย่างทั้งหมด 112 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างนม 5 ถูกลงผสมรวมกันคิดเป็น 1 ตัวอย่าง (รวมตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ทั้งหมด 560 ถู) โดยเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ทันทีที่ผลิตเสร็จ (day 0) ครั้งละ 35 ถูหรือกล่องต่อชุดการผลิต บรรจุในกล่องน้ำแข็ง ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการทันที วิเคราะห์ปริมาณ *B. cereus* ของตัวอย่างนม day 0 จากนั้นจัดแบ่งตัวอย่างนมที่เหลือตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่กำหนด คือ อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C โดยใช้ระยะเวลาการเก็บรักษาในแต่ละ อุณหภูมิจำนวน 4 วัน, 7 วันและ 10 วัน ตรวจหาปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ ตามวิธีอ้างอิงขององค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (U.S. FDA) Bacteriological analysis manual: *Bacillus cereus* [4] ดังนี้ ปิเปิดนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับบัปเฟอร์ฟอสเฟต ที่ปรับความเป็นกรดต่าง 7.2 (pH 7.2) ในปริมาณ 450 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นทำการ เจือจาง (dilution) กับบัปเฟอร์ฟอสเฟตให้ได้ที่ระดับ 1:10000, 1:100000, และ 1:1000000 แล้ว นำตัวอย่างที่เจือจางเติมลงใน Trypticase Soy-Polymyxin Broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร, 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 หลอด ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จึงอ่านผลการทดลองโดยการสังเกตจากลักษณะขุ่นที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อที่ พบเขี่ย (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) agar plates นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีชมพู (eosin pink) จำนวน 3-5 โคโลนี ไปตรวจยืนยันด้วย 4 วิธีการคือ Modified Voges-Proskauer test (+), Motility test (+), Nitrate reduction test (+) และ Tyrosine decomposed test (+) นับปริมาณเชื้อ *B. cereus* โดยการประมาณตามวิธี MPN method [4].

### การวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานปริมาณที่ตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยสถิติเชิงพรรณนา ส่วนวิธีทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างของอุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี ANOVA และ Duncan's New Multiple test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0

## ผลการศึกษา

นมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บตัวอย่างในวันแรกที่ผลิตแล้วเสร็จ (day 0) จากแหล่งผลิตในเขตจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี และจังหวัดสุรินทร์ ตรวจพบ *B. cereus* ในปริมาณระหว่าง  $3.0-7.0 \times 10^3$  เซลล์/มิลลิลิตร (เฉลี่ย  $3.56 \pm 1.08 \times 10^3$ ) และเมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  ในเวลา 4, 7 และ 10 วัน พบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ระหว่าง  $3.0 \times 10^3$  ถึง  $1.5 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร  $3.0 \times 10^3$  ถึง  $4.3 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร และ  $4.0 \times 10^3$  to  $6.4 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่  $8^\circ\text{C}$  พบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตั้งแต่  $4.0 \times 10^3$  ถึง  $2.8 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร  $9.0 \times 10^3$  ถึง  $6.4 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร และ  $1.4 \times 10^4$  ถึง  $1.5 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 4, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ (Table 1)

**Table 1.** The Concentration of *B. cereus* in Pasteurized Milk\*

Storage time (days)	Storage temperature	
	$4^\circ\text{C}$	$8^\circ\text{C}$
0	$3.56 \pm 1.08 \times 10^3$ ( $3.0 - 7.0 \times 10^3$ )	-
4	$7.37 \pm 4.42 \times 10^3$ ( $0.3 - 1.5 \times 10^4$ )	$1.19 \pm 0.65 \times 10^4$ ( $0.4 - 2.8 \times 10^4$ )
7	$1.91 \pm 1.48 \times 10^4$ ( $0.3 - 4.3 \times 10^4$ )	$2.76 \pm 1.69 \times 10^4$ ( $0.9 - 6.4 \times 10^4$ ) [1]
10	$2.86 \pm 1.88 \times 10^4$ ( $0.4 - 6.4 \times 10^4$ ) [2]	$7.06 \pm 4.98 \times 10^4$ ( $0.1 - 1.5 \times 10^5$ ) [8]

\*Mean $\pm$ SD; (x) = range; [x] = the number of batch samples (from total of 16 batches) have *B. cereus* more than  $5 \times 10^4$  cells/ml.

ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  และ  $8^\circ\text{C}$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) และนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4 และ 10 วันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $8^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 วันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเวลาเก็บรักษา 4 และ 7 วัน ( $p\text{-value} < 0.05$ ) ในขณะที่การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  และ  $8^\circ\text{C}$  ทำให้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) (Table 2)

**Table 2.** Statistical Results of Storage Temperature, Time and *B. cereus* ( $\times 10^4$  cells/ml)

Storage time (days)	Storage temperature	
	4 °C	8 °C
0	0.36 ± 0.11 <sup>a</sup>	-
4	0.74 ± 0.44 <sup>ab</sup>	1.19 ± 0.65 <sup>bc</sup>
7	1.91 ± 1.48 <sup>bcd</sup>	2.76 ± 1.69 <sup>cd</sup>
10	2.86 ± 1.88 <sup>d</sup>	7.06 ± 4.98 <sup>e</sup>

a, b, c, d, e Difference letters indicate significant difference (p-value < 0.05)

## วิจารณ์

ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์จากแหล่งผลิตในเขต 4 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ผลิตเสร็จในวันแรก (day 0) ตรวจพบ *B. cereus* ระหว่าง  $3.0-7.0 \times 10^3$  เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 265 เรื่อง นมโค พ.ศ. 2545 [8] ที่กำหนดให้นมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ 1 มิลลิลิตรต้องตรวจพบแบคทีเรียได้ไม่เกิน 10,000 เซลล์/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามประกาศกระทรวงฉบับนี้ยังไม่ได้ระบุว่าเป็นเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะและกำหนดเพิ่มเติมว่าในนมพาสเจอร์ไรส์นั้นต้องตรวจพบแบคทีเรียได้ไม่เกิน 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร ตลอดระยะเวลาเมื่อออกจากแหล่งผลิตจนถึงวันหมดอายุการบริโภคที่ระบุบนฉลาก เมื่อใช้เกณฑ์มาตรฐานนี้เปรียบเทียบกับผลการทดลอง พบว่า การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 วันมีตัวอย่างนมจำนวน 2 จาก 16 ชุดการผลิต (ร้อยละ 12.5) ที่มีปริมาณเชื้อมากกว่า 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 °C มีจำนวน 9 จาก 16 ชุดการผลิต (ร้อยละ 56.25) (Table 1) สอดคล้องกับรายงานจากคณะกรรมการอาหารและยา [10] ในโครงการพัฒนามาตรฐานนมพร้อมดื่มแบบยี่เย็นระหว่างปี 2546 - 2548 พบว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่ไม่ผ่านมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนถึงร้อยละ 57.1 - 72.92 พรเพชร [11] รายงานว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่ผลิตในประเทศไทยร้อยละ 47.62 ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่กำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุขเมื่อใช้ระยะเวลาเก็บรักษาถึง 10 วัน ในขณะที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม [12] ทำการสำรวจนมโรงเรียนในระหว่างปี 2548 จาก 8 จังหวัด ได้แก่ ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม พบตัวอย่างที่ไม่ได้มาตรฐานเนื่องจากเชื้อ *B. cereus* ร้อยละ 54.66 และในปี 2550 วราภาและจิราภา [13] สำรวจปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บตัวอย่างจากจากสหกรณ์โคนมจังหวัด นครปฐมและสหกรณ์โคนมกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ร้อยละ 38 ของตัวอย่างทั้งหมด ดังนั้นจะเห็นว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่ผลิตในแต่ละภูมิภาคของประเทศยังมีปัญหาการปนเปื้อน *B. cereus* อย่างต่อเนื่อง และสอดคล้องกับรายงานของ ESR [1] ที่พบว่าการพาสเจอร์ไรส์โดยใช้อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 30 นาทีและ 80 °C เป็นเวลา 10 วินาที ไม่สามารถทำลายเชื้อ

*B. cereus* ในตัวอย่างน้ำนมได้ทั้งหมด โดยพบว่าที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวยังมี *B. cereus* มีชีวิตรอดได้ถึง 54% และ 61% ตามลำดับ ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรพิจารณากำหนดปริมาณการปนเปื้อนที่เฉพาะสำหรับเชื้อ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ เนื่องจากเป็นอาหารที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่เป็นเด็กและมีโอกาสเจ็บป่วยได้ง่ายกว่าผู้ใหญ่จากการบริโภคนมที่มีการปนเปื้อนในระดับที่ไม่สูงมากนัก ข้อมูลการศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* พบว่าปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นและระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นโดยนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 และ 10 วันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8°C เป็นเวลา 10 วันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเวลาเก็บรักษา 4 และ 7 วัน ( $p$ -value < 0.05) ในขณะที่การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C และ 8°C ทำให้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) (Table 2) โดยมีปริมาณสูงสุดที่ตรวจพบคือ  $1.5 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตรและมีตัวอย่างจำนวน 4 ใน 16 ชุดการผลิตเมื่อนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8°C เป็นเวลา 10 วันที่มีปริมาณถึง  $10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับที่เชื้อสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายกับผู้บริโภคได้ [1, 4] Larsen และ Jorgensen [14] ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* โดยใช้นมพาสเจอร์ไรส์นำมาเก็บที่อุณหภูมิ  $7 \pm 0.5^\circ\text{C}$  นาน 9 วัน พบว่า ในวันที่ 9 ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ที่มากกว่า  $10^3$  โคโลนี/มิลลิลิตร ถึงร้อยละ 87.5 ขณะที่ Notermans และคณะ [15] พบว่า การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 6 - 12°C เป็นเวลา 2 - 12 วันตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณมากกว่า  $10^4$  โคโลนี/มิลลิลิตรถึง 12% ของตัวอย่างทั้งหมดและแนะนำว่าควรเก็บนมไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 7°C ในเวลาไม่เกิน 7 วัน สอดคล้องกับ Valik และคณะ [16] ใช้ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5, 7, 9, 11 และ 13°C เพื่อทำนายระยะเวลาการเก็บรักษาที่เชื้อ *B. cereus* ไม่เกิน  $10^5$  โคโลนี/มิลลิลิตร พบว่าที่อุณหภูมิ 7°C สามารถเก็บรักษาได้ไม่เกิน 9 วัน จากข้อมูลการวิจัยครั้งนี้แนะนำว่าควรเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 7 วัน และ 8°C ในระยะเวลาไม่เกิน 4 วัน เพื่อป้องกันไม่ให้ *B. cereus* มีปริมาณสูงเกินกว่า 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร ตามมาตรฐานในประกาศของกระทรวงสาธารณสุข [8] หรือถ้าใช้การพบเชื้อ *B. cereus* ปริมาณ  $10^5$  เซลล์/มิลลิลิตรเป็นเกณฑ์กำหนด พบว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ได้ถึง 10 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 8°C ได้น้อยกว่า 10 วัน อย่างไรก็ตามการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนในระดับใดควรนำข้อมูลการศึกษาทางระบาดวิทยาที่เกิดจากการได้รับเชื้อชนิดนั้นในอาหารที่เกิดขึ้นจริงกับผู้บริโภคมาพิจารณาร่วมด้วย ซึ่งรายงานการเน่าเสียของนมหรือเด็กนักเรียนเกิดเจ็บป่วยจากการบริโภคนมยังพบมีรายงานในประเทศไทย ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องหรือนักวิจัยควรศึกษาและเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเก็บรวบรวมข้อมูลให้สมบูรณ์เพื่อนำไปใช้ในการประเมินปริมาณการได้รับแล้วก่อให้เกิดอันตรายกับผู้บริโภคที่เป็นคนไทยเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากขึ้น และยังเป็นส่วนสำคัญเพื่อใช้ประกอบการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนได้อย่างเหมาะสมอีกด้วย

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากกองทุนส่งเสริมและพัฒนาการผลิต  
บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ และบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## เอกสารอ้างอิง

1. Institute of Environmental Science and Research Limited (ESR). Risk profile: *Bacillus* spp. Institute of Environmental Science and Research Limited, Christchurch Science Centre, New Zealand Food Safety Authority, New Zealand. 2004.
2. Lin S, Schraft H, Odumer JA, Griffiths MW. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol.* 1998;43:159-171.
3. Dufrenne JB, Soentoro P, Tatini S, Notermans S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *Int J Food Microbiol.* 1994;23:99-109.
4. U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA). Bacteriological analysis manual online: *Bacillus cereus*. 2001[cited 2001, January]. Available from: <http://www.cfsan.fds.gov/~ebam/bam-14.html>
5. Te Giffel MC, Beumer RR, Granum PE, Rombouts FM. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerations in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 1997;34:307-318.
6. Larsen HD, Jorgensen K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *J Food Microbiol.* 1997;34:179-186
7. Notermans S, Dufrenne J, Teunis P, Beumer R, Te Giffel MC, Peeters WP. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.* 1997;14:143-151.
8. Ministry of Public Health, Thailand. Acts number 265: Daily milk standard. Ministry of Public Health, Thailand. 2002.
9. Benjapong V, Tawichatwittayakul R, Pinprapai N, Karnpanit V, Sirorattanawat J. Final report: the monitoring of the safety status of a school milk at the storage and transportation processes. Institute of Nutrition, Mahidol University. 2005.
10. Food and Drug Administration Thailand. Final report: the development of standard for ready to eat of milk. Food and Drug Administration, Ministry of Public Health, Thailand. 2006.
11. Suksirichaisil P. The study of storage time of pasteurized milk at 8°C and risk status of pasteurized milk in the demonstration manufactory [Thesis]. Kasetsart University; 2003.
12. Regional Medical Sciences Center: Samutsongkhram. The annual report of food-borne pathogen from drinking water and food. Regional Medical Sciences Center: Samutsongkhram, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand. 2005.
13. Mahakarnjanakul V, Wongwattanachot J. Report of *Bacillus cereus* in pasteurized milk: case study of school milk. Kasetsart University; 2007.



14. Larsen HD, Jorgensen K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *Int J Food Microbiol.* 1999;46:173-176.
15. Notermans S, Batt CA. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. *J Appl Microbiol.* 1998;84:51-61.
16. Valik L, Gorner F, Laukova D. Growth dynamics of *Bacillus cereus* and shelf-life of pasteurized milk. *Czech J Food.* 2003;2:195-202.

