การศึกษาความเหมือนทางพันธุกรรมของ*Bacillus cereus*ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบด้วยเทคนิค RAPD-PCR

Study on Genetic Similarityof *Bacillus cereus* Isolated from Raw Milk and Factors Associatedwith Raw Milk Productionby RAPD-PCR Technique

ธรรมรัตน์ ชนประเสริฐ[1,2*], ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง [3]และศศิธร นาคทอง[4,5]
Thammarat Chonprasert[1,2], Praphruk Tangmankong[3]and Sasitorn Nakthong[4,5]

Abstract

The study on genetic similarity of *B. cereus* (39 isolates) isolated from raw milk and factors associated with raw milk production wereanalysed using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) technique with random primer BcRAPD-1 and BcRAPD-2. The DNA bands of 250-1,300 bpin size (171 DNA bands) were produced. The similarity genetic index was calculated with NTSYS-PC version 2.20f and displayed by dendrogram. The result indicated the similarity coefficient of 0.73,*B. cereus* were classified in 5 groups, each group had 11, 7, 8, 11 and 2 isolates.

Keyword: *B. cereus*; Genetic Similarity; RAPD-PCR

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhonpathom 73140, Thailand.

[2] ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE)

[3] ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม 73140
Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhonpathom 73140, Thailand.

[4] ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ (สพวป) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม 73140
Animal Produce Research and Development Center, Suwanvajokkasikit Animal Research and Development Institute (SARDI), Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhonpathom 73140, Thailand.

[5] ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Animal Science, Faculty of Agricultural at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kampaengsaen Campus, Nakhonpathom 73140, Thailand.

รับเรื่อง : พฤศจิกายน 2555

[*]Corresponding author : agrsas@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ศึกษาความเหมือนทางพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus*ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบ จำนวน 39 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ BcRAPD-1และ BcRAPD-2 สังเคราะห์ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 250-1,300 คู่เบส ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 171 แถบ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยการคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS-PC version 2.20f จัดกลุ่มและแสดงผลในรูปของ dendrogram พบว่าที่ค่าสหสัมพันธ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) 0.73 สามารถจำแนกเชื้อ *B. cereus*ทั้ง 39 ไอโซเลต ออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเชื้อจำนวน11, 7, 8, 11 และ 2 ไอโซเลต

คำนำ

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนตรง เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารในคน โดยมีอาการ2 ลักษณะคือ อาการคลื่นไส้ อาเจียน ครั่นเนื้อครั่นตัว ภายหลังจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไป 30 นาที ถึง 6 ชั่วโมงและอาการปวดท้องร่วมกับอุจจาระร่วงเป็นน้ำ ภายหลังจากการรับประทานอาหาร 8 ถึง 16 ชั่วโมง (Granum and Lund, 1997; National food institute. 2004) จึงเป็นปัญหาสำคัญทางความปลอดภัยของอาหารด้านชีวภาพในหลายประเทศ จากรายงานการศึกษาโครงการพัฒนามาตรฐานนมพร้อมดื่ม แบบยั่งยืนระหว่างปี 2546-2548 ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พบว่ามีปัญหาหลักด้านจุลินทรีย์มากกว่าด้านเคมี โดยเฉพาะในปี 2548 พบนมพร้อมดื่มตกมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ชนิด *B. cereus* ร้อยละ 77.92 (Food and Drug Administration. 2006) และผลการวิเคราะห์นมโรงเรียนในจังหวัดราชบุรีปี 2548-2550 พบนมตกมาตรฐานทางจุลินทรีย์ร้อยละ 82.1, 60.0 และ 40.0 ตามลำดับ โดยมีสาเหตุมาจาก *B. cereus* ร้อยละ 57.1, 60.0 และ 0.0 ตามลำดับ ในปี 2549-2550 เกิดอุบัติการณ์นักเรียนในจังหวัดนครปฐม 226 คน และจังหวัดราชบุรี 67 คน ป่วยด้วยอาการท้องร่วงหลังจากดื่มนมโรงเรียนชนิดพาสเจอร์ไรส์จากแหล่งผลิตในจังหวัดนครปฐม และจังหวัดราชบุรี ผลการตรวจวิเคราะห์พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคชนิด *B. cereus* (Dept. of Consumer Protection. 2008) ซึ่งตามมาตรฐานแล้ว ต้องตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์นม*B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไป ในสิ่งแวดล้อมของฟาร์ม เช่น ดิน แหล่งน้ำ อาหาร มูล และฝุ่นละออง ดังนั้นจึงสามารถปนเปื้อนในน้ำนมดิบได้ง่าย(TeGiffel*et al*., 1997) ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะระบุแหล่งที่มาของเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ วิธีการตรวจสอบทางชีวเคมีไม่สามารถหาความแตกต่างของเชื้อได้อย่างชัดเจน วิธีทางอณูวิทยาเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง ในการตรวจหาความแตกต่างของเชื้อระดับดีเอ็นเอ และได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) ได้เข้ามามีบทบาทในการจำแนกสายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์จีนัส และสปีชีส์ โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยอาศัยหลักการทำงานของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาดสั้น ประมาณ 10 เบส ซึ่งไม่จำเพาะต่อยีน (Williams *et al*., 1990) ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความเหมือนทางพันธุกรรมของ *B. cereus* ที่แยกได้จากน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบ ในจังหวัดนครปฐม ด้วยเทคนิค RAPD-PCR เพื่อตรวจหาแหล่งที่มาของเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ และเป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกันและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของ *B. cereus* จากปัจจัยการผลิตน้ำนมดิบสู่น้ำนมดิบต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งที่มาของตัวอย่างเชื้อ*B. cereus*

B. cereus ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยการผลิตน้ำนมดิบ (น้ำ, อาหารข้น, อาหารหยาบ, พื้นคอก, เต้านมโค, เครื่องรีดนม, ผ้ากรองน้ำนมดิบ และถังรวมน้ำนมดิบ)จำนวน 39 ไอโซเลตจากฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐมตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2552(ตารางที่1)

ตารางที่ 1แหล่งที่มาของตัวอย่างเชื้อ *B. cereus* ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	แหล่งของเชื้อ	ที่มา
1	RM_1	น้ำนมดิบ ฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
2	WT_1	น้ำใช้ในฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
3	CF_1	อาหารข้นฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
4	RF_1	อาหารหยาบฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
5	UD_1	ผิวเต้านมโคฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
6	BD_1	พื้นคอกบริเวณที่โคนอนฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
7	MM_1	เครื่องรีดนมฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
8	MT_1	ถังรวมน้ำนมดิบฟาร์มที่ 1 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
9	RM_2	น้ำนมดิบ ฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
10	WT_2	น้ำใช้ในฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
11	CF_2	อาหารข้นฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
12	RF_2	อาหารหยาบฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
13	UD_2	ผิวเต้านมโคฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
14	BD_2	พื้นคอกบริเวณที่โคนอนฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
15	MM_2	เครื่องรีดนมฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
16	MT_2	ถังรวมน้ำนมดิบฟาร์มที่ 2 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
17	RM_3	น้ำนมดิบ ฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
18	WT_3	น้ำใช้ในฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
19	CF_3	อาหารข้นฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
20	RF_3	อาหารหยาบฟาร์มที่ 3 สมาชิกสหกรณ์โคนมในจังหวัดนครปฐม
21	UD_3	ผิวเต้านมโคฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
22	BD_3	พื้นคอกบริเวณที่โคนอนฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
23	NF_3	ผ้ากรองน้ำนมดิบฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
24	MT_3	ถังรวมน้ำนมดิบฟาร์มที่ 3 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
25	RM_4	น้ำนมดิบ ฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
26	WT_4	น้ำใช้ในฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
27	CF_4	อาหารข้นฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
28	RF_4	อาหารหยาบฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
29	UD_4	ผิวเต้านมโคฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
30	BD_4	พื้นคอกบริเวณที่โคนอนฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
31	MM_4	เครื่องรีดนมฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
32	NF_4	ผ้ากรองน้ำนมดิบฟาร์มที่ 4 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
33	RM_5	น้ำนมดิบ ฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
34	WT_5	น้ำใช้ในฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
35	CF_5	อาหารข้นฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของตัวอย่างเชื้อ *B. cereus* ที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งของเชื้อ	ที่มา
36	RF_5	อาหารหยาบฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
37	UD_5	ผิวเต้านมโคฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
38	BD_5	พื้นคอกบริเวณที่โคนอนฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม
39	MT_5	ถังรวมน้ำนมดิบฟาร์มที่ 5 ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดนครปฐม

การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Hansen and Hendriksen (2001) เริ่มจากเลี้ยง *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 1 คืนเขี่ยเชื้อโคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 ml จำนวน 3 โคโลนี ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มี TE buffer 1.5 mlนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายผนังเซลล์ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g นาน 5 นาที เพื่อแยกผนังเซลล์ออกดูดสารละลายใสที่อยู่ส่วนบน ไปใส่ในหลอด microcentrifuge นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ºC ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ RAPD-PCR ต่อไป

ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *B. cereus* (ดัดแปลงจากวิธีของ Nilsson *et al*., 1998) โดยใช้ RAPD primers ที่ปริมาณมี G และ C เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 60-70 % คือ ชุดไพรเมอร์BcRAPD-1: 5'-CCG AGT CCA-3'และ BcRAPD-2: 5'-ACG CGC CCT-3'เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยมีปริมาตรรวม 30 µl โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของ*B. cereus*แต่ละตัวอย่างปริมาตร 3 µl, reaction buffer (10x) ปริมาตร 3 µl, DreamTaq™ DNA polymerase (5u/ µl) ปริมาตร 1.5 µl, สารละลาย dNTP mix (2.5mM each) ปริมาตร 3 µl, ไพรเมอร์ (100 µM/µl) ปริมาตร 0.6 µl และเติมน้ำ milliQ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตรครบ 30 µl ผสมสารให้เข้ากันบ่มหลอดในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Biometra® รุ่น T gradient thermoblock serial 2209129) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในแต่ละรอบดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ºC 3 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ºC 45 วินาที, annealingที่อุณหภูมิ 30 ºC 2 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC 1 นาที ทำปฏิกิริยาเป็นวงลูกโซ่ทั้งหมด 10 รอบ และ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ºC 45 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 36 ºC 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC 2 นาที ทำปฏิกิริยาเป็นวงลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบและ final extension ที่อุณหภูมิ 75 ºC 10 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 ºC ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยแบ่งส่วนผสมมา 10 µl ผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย 0.025% bromophenol blue, 40% w/v glycerol) จำนวน 2 µl แยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส(agarose gel eletrophoresis) บน 3% อะกาโรสในบัฟเฟอร์ 1X TAE (50X stock solution ประกอบด้วย 0.5M EDTA 100 ml, pH 8.0, Tris base 242 g, gracial acetic acid 57.1 ml) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลเจลโดยทำการบันทึกแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band ในรูป binary data โดยให้ค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 1 และการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 0 นำข้อมูลไปวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) และสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method with averages) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) – PC เวอร์ชั่น 2.20f

ผลและวิจารณ์

จากข้อมูลที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR เมื่อนำข้อมูลของขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 171 แถบ ที่แสดงความแตกต่างในสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบ ทั้ง 39 ไอโซเลต เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของการปรากฏของดีเอ็นเอโดยใช้สัญลักษณ์ “1” และเมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันโดยให้สัญลักษณ์ “0” นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-PC version 2.20f เพื่อคำนวณค่าความเหมือนและความแตกต่างของเชื้อ *B. cereus*ทีละคู่สลับกันจนครบ 39 ไอโซเลต แล้วนำมาสร้างเป็นตารางดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการสร้าง dendrogram ที่เหมาะสม เพื่อสร้างความสัมพันธ์ของเชื้อ *B. cereus*ทั้ง 39 ไอโซเลต โดยแสดงใน dendrogram (ภาพที่ 1) พบว่าที่ค่าสหสัมพันธ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) 0.73 สามารถจำแนกเชื้อ *B. cereus* ออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวน 11, 7, 8, 11 และ 2 ไอโซเลต ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ทั้งหมด 11 ไอโซเลต ได้แก่ RM1, MM1, RF1, RM2, UD2, CF2, BD2, RF2, NF3, MM4 และ WT5 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ทั้งหมด 7 ไอโซเลต ได้แก่ RM3, CF3, UD3, CF4, UD5, BD3 และ CF5 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ทั้งหมด 8 ไอโซเลต ได้แก่ MM2, MT3, MT5, NF4, BD4, RF5, RM5 และ BD5 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ทั้งหมด 11 ไอโซเลต ได้แก่ WT1, UD1, UD4, RF3, MT2, BD1, MT1, WT2, WT3, WT4 และ CF1 กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ RM4 และ RF4

เมื่อวิเคราะห์หาแหล่งที่มาของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนสู่น้ำนมดิบโดยการสร้าง dendrogram ที่เหมาะสม พบว่าที่ค่าสหสัมพันธ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) 1.00 (ฟาร์มที่ 3) พบว่าเชื้อแหล่งของเชื้อ *B. cereus* ที่มีความคล้ายกับเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากน้ำนมดิบคือ เชื้อที่แยกได้จากอาหารข้น ลำดับต่อมาคือตัวอย่างผิวเต้านม และพื้นคอกบริเวณที่โคนอน ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ Thammarat*et al.* (2010) ซึ่งรายงานว่ามีโอกาสตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างอาหารข้น 100% และปริมาณของเชื้อที่ตรวจพบมีระดับสูง (110->110 MPN/g) รองลงมาคือ พื้นคอกบริเวณที่โคนอน เครื่องรีดนม และถังรวมน้ำนมดิบ ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Magnusson (2007) ซึ่งทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* จากอาหารโคสู่น้ำนมดิบ พบว่าเมื่อทำการให้อาหารปริมาณ 30 กิโลกรัมที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อน $3x10^5$ spore/g จะพบการปนเปื้อนในมูลโคมากกว่า 10^4 spore/g และเมื่อในมูลโคมีปริมาณของเชื้อ *B. cereus* มากกว่า 10^4-10^5 spore/g จะพบการปนเปื้อนในน้ำนมดิบประมาณ 10^2 spore/l สอดคล้องกับรายงานของ Visser*et al*. (2007) ที่สรุปว่าแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบมาจาก 3 ส่วน คือ 1) การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกเต้านม 2) การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากภายในเต้านม และ 3) การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากอุปกรณ์ โดยการปนเปื้อนจากภายนอกเต้านมเริ่มต้นจากอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนไปสู่มูลโค พื้นคอกบริเวณที่โคนอน และปนเปื้อนไปสู่น้ำนมดิบในที่สุด อีกทั้งเครื่องรีดนมและถังรวมน้ำนมดิบก็เป็นแหล่งที่มาของเชื้อได้จากการตรวจหาเชื้อ *B. cereus* ในสิ่งแวดล้อมฟาร์มและในน้ำนมดิบ ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้ โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ทำให้ Christianssonet *al*. (1999) สรุปว่าดินเป็นแหล่งที่มาของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบในช่วงการปล่อยแทะเล็มในแปลงหญ้า และ Magnusson *et al*. (2007) สรุปว่าอาหารเป็นแหล่งที่มาของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กันของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบแล้ว พบว่าทุกปัจจัยมีความเกี่ยวข้องกัน คือ เมื่อโคกินอาหาร และน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* เข้าไปจะถ่ายมูลที่มีเชื้อลงบนพื้นคอก ทำให้พื้นคอกมีการปนเปื้อนเชื้อ เมื่อโคนอนเต้านมจะเปื้อนมูลที่มีเชื้อทำให้ผิวเต้านมโคมีเชื้อปนเปื้อน และเมื่อทำการรีดนม หากล้างเต้านมไม่สะอาด เชื้อ *B.*

cereus สามารถปนเปื้อนสู่น้ำนมดิบได้ อีกทั้งเครื่องรีดนมและถังรวมน้ำนมดิบยังพบเชื้อปนเปื้อนอยู่ เมื่อทำการรีดนมหรือนำน้ำนมดิบใส่ในถังรวมน้ำนมดิบ เชื้อ *B. cereus* สามารถหลุดออกจากไบโอฟิล์ม และเพิ่มจำนวนทำให้น้ำนมดิบนั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อได้

สรุป

ที่ค่าความคล้ายคลึง (similarity coefficient) 0.73 เชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากน้ำนมดิบของแต่ละฟาร์มมีความเหมือนทางพันธุกรรมกับเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบของแต่ละฟาร์ม ดังนี้ ฟาร์มที่ 1 เครื่องรีดนม ฟาร์มที่ 2 ผิวเต้านม ฟาร์มที่ 3 อาหารข้น ฟาร์มที่4 พื้นคอกบริเวณที่โคนอนและถังรวมน้ำนมดิบ และฟาร์มที่ 5 อาหารหยาบและถังรวมน้ำนมดิบ ซึ่งเห็นได้ว่าแต่ละฟาร์มมีแหล่งที่มาของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต่างกัน ดังนั้นทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบในปัจจุบันมีโอกาสเป็นแหล่งปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* สู่น้ำนมดิบ

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่า ทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบมีโอกาสเป็นแหล่งที่มาของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ ซึ่งมีสาเหตุเกิดมาจากการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) การจัดการเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในน้ำนมดิบ จึงอยู่ที่การปฏิบัติงานของเกษตรกรเป็นหลัก ดังนั้นเกษตรกรจึงควรปฏิบัติตามหลักปฏิบัติด้านสุขลักษณะสำหรับน้ำนม และผลิตภัณฑ์ (TACFS. 2008) โดยสามารถแยกจัดการเป็น 3 ส่วน คือ

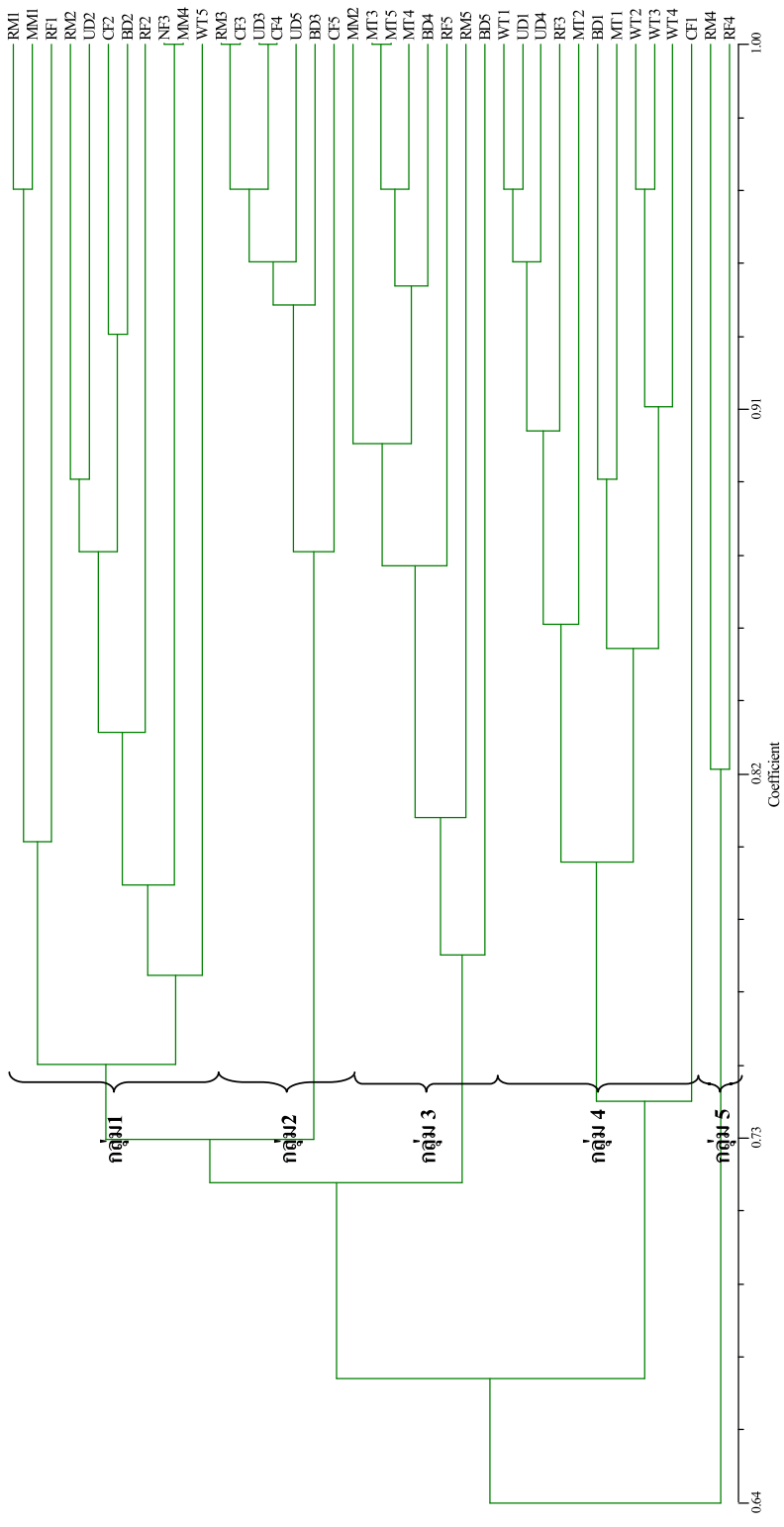
1. เชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนข้ามจากอาหาร→พื้นคอก→ผิวเต้านมโค→น้ำนมดิบ การจัดการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในส่วนนี้สามารถทำได้โดยการรักษาความสะอาดของพื้นคอกด้วยการล้างและการฆ่าเชื้อพื้นคอกเป็นประจำ ร่วมกับมีการล้างทำความสะอาดโคและเต้านมให้สะอาดก่อนทำการรีดนม

2. เชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนจากเครื่องรีดนม→น้ำนมดิบการจัดการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในส่วนนี้สามารถทำได้โดยการทำความสะอาดเครื่องรีดนมด้วยสารซักล้างและน้ำยาฆ่าเชื้อทุกครั้งก่อนและหลังการรีดนม

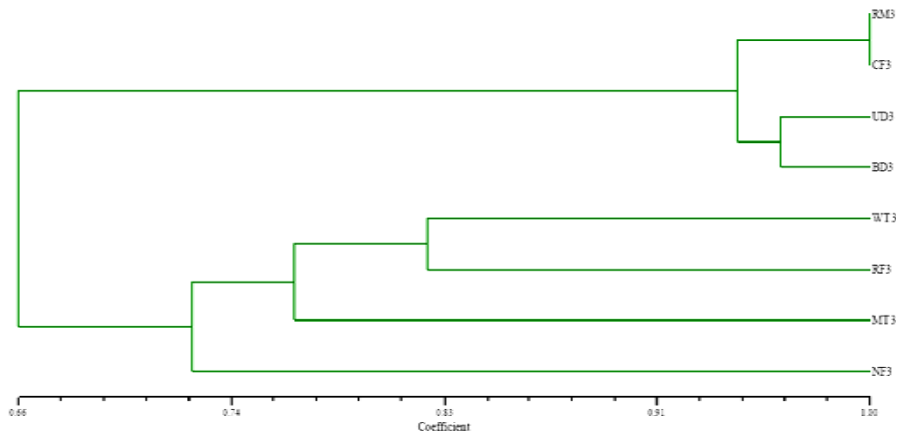
3. เชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนจากถังรวมน้ำนมดิบ→น้ำนมดิบการจัดการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในส่วนนี้สามารถทำได้โดยการทำความสะอาดถังรวมน้ำนมดิบด้วยสารซักล้างและน้ำยาฆ่าเชื้อทุกครั้งหลังจากส่งนมและคว่ำตากให้แห้ง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ



ภาพที่ 1 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus* จำนวน 39 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์BcRAPD-1 และ BcRAPD-2วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS – PC เวอร์ชัน 2.20f



ภาพที่ 2 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *B. cereus* จำนวน 8สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนมดิบของฟาร์มที่ 3 ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ BcRAPD-1 และ BcRAPD-2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS – PC เวอร์ชั่น 2.20f

เอกสารอ้างอิง

Christiansson, A., J. Bertilsson and B. Svensson. 1999. *Bacillus cereus* in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J. of dairy sci. 82: 305-314.

DepartmentofConsumer Protection. 2008. Annual report of the examination of the consumer protection division. 2004-2007. Ratchaburi provincial public health office, Thailand. (in Thai)

Food and Drug Administration. 2006. Annual report of the examination of health product 2006. Food and drug administration, Ministry of public health of Thailand. (in Thai)

Granum, P. E. and T. Lund.1997.*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Letters, 157: 223-228.

Hansen, B. M. and N. B. Hendriksen. 2001. Detection of enterotoxic*Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR analysis. Appl. Environ. Microbiol. 67(1) : 185-189.

Magnusson M. 2007. *Bacillus cereus* in the Housing Environment of Dairy Cows “Contamination Routes, Effect of Teat-Cleaning, and Measures to Improve Hygiene in the Cubicles and Alleys”. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp.47 p.

National food institute. 2004. Diaster in Food. National food institute publisher. Charansanitwong Soi 40 Charansanitwong Rd. Bangyikhan, Bangkok 10700 Thailand. 171 p. (in Thai)

Nilsson J., B. Svensson, K.Ekelund and A. Christiansson. 1998. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. Appl.Microbiol. 27:168-172

TeGiffel M. C., R. R. Beumer.,L. P. M. Langeveld and F. M. Rombouts.1997.The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. Int. J. of Dairy Tech. 50:43-47.

Thai Agricultural Commodity and Food Standard. 2008. Codeof Hygienic Practice for Milk and Milk Products Volume 2: Guidelines for The Primary Production of Milk. (in Thai)

Thammarat C., P. Tangmankong and S. Nakthong. 2010. Examination of *Bacillus cereus* in factors associated with raw milk production of farmer in NakhonPathom province. The 4th AG-BIO/PERDO Graduate Conferance on Agricultural Biotechnology and UT-KU Joint Seminar. Kasetsart University Kamphaengsaen Campus, NakhonPathom, Thailand.p.109.

Vissers, M.M.M. and F. Driehuis. 2007. On Farm Hygienic Milk Production in Milk Processing and Quality Management (ed. A.Y. Tamine), Blackwell Publishing.

_____ , M. C. Te Giffel, F. Driehuis, P. De Jong, and J. M. G. Lankveld. 2007. Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. J. Dairy Sci. 90:281–292.

Williams, J. G. K., A. E. Kubelik, K. J. Levak, J. A. Rafalski and S. C. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitary primer are useful as genetic marker. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.