



**ภาคผนวก**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ภาคผนวก ก

รายนามผู้ทรงคุณวุฒิ

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| 1. นายสิทธิชัย อำนางศิริสุข | นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลลำปาง |
| 2. นายวิชาญ เกี่ยวการค้า    | นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ<br>กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลลำปาง      |
| 3. นางกนกวรรณ แสงสว่าง      | นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ<br>กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลลำปาง      |

## ภาคผนวก ข

### วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Coliform bacteria โดยวิธี MPN (Most Probable Number)

#### การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 1. Phosphate Buffer Solution (PBS) pH 7.2-7.4

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	กรัม
KH <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.24	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดแก้ว ขวดละ 112.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

##### 2. Single Lactose Broth (1X)

Lactose	13	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลองที่บรรจุหลอดก๊าซ (Durham) แล้วในลักษณะคว่ำ หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

##### 3. Double Lactose Broth (2X)

Lactose	26	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลองที่บรรจุหลอดก๊าซ (Durham) แล้วในลักษณะคว่ำ หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## 4. Brilliant Green Lactose Bile Broth (2% BGLB)

Peptone	10	กรัม
Oxgall	20	กรัม
Lactose	10	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลองที่บรรจุหลอดก๊าซ (Durham) แล้วในลักษณะคว่ำ หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## วิธีการเตรียมตัวอย่างอาหาร

1. ชั่งอาหาร 112.5 กรัม ใส่ในถุงปราศจากเชื้อ
2. เท PBS (Phosphate Buffer Solution) ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ pH 7.2 ปริมาณ 112.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างอาหาร ข้อ 1 (อาหารจะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1: 10) นำไปตีให้เข้าด้วยกันนาน 1 นาที

## วิธีการตรวจวิเคราะห์ Coliform bacteria

ขั้นตอนการตรวจสอบครั้งแรก (Presumptive test)

1. คูณตัวอย่างอาหารจำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Double Lactose Broth จำนวน 5 หลอด (แถวที่ 1)
2. คูณตัวอย่างอาหารจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Single Lactose Broth จำนวน 5 หลอด (แถวที่ 2)
3. คูณตัวอย่างอาหารจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Single Lactose Broth จำนวน 5 หลอด (แถวที่ 3)
4. เขย่าหลอดทดสอบเบาๆ เพื่อให้อาหารเหลวผสมกับอาหารตัวอย่างเข้ากัน
5. นำหลอดทดลองทั้งหมด (15 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  นาน  $48 \pm 2$  ชั่วโมง
6. สังเกตหลอดที่เกิดก๊าซในหลอดหมัก (Durham tube) ของแต่ละหลอด หลอดที่เกิดก๊าซให้ผลเป็นบวก ให้ทำการทดลองขั้นยืนยันต่อไป หลอดที่ไม่เกิดก๊าซให้ผลเป็นลบ

ขั้นตอนการตรวจสอบเพื่อยืนยัน (Confirmed test)

1. หลอดที่ให้ผลบวกสังเกตจากอาหารเหลวที่ใช้จะพุ่งและเกิดก๊าซเล็ก ๆ ในหลอดหมัก (Durham tube) ถ้ายเชื้อ
2. เขย่าหลอดอาหารที่ให้ผลบวก คู่ออาหารเหลวหลอดละ 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 % BGLB
3. นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิอุณหภูมิ  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  นาน  $48 \pm 2$  ชั่วโมง
4. สังเกตหลอดที่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซพุ่งให้อ่านผลเป็นบวก
5. บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก นำไปอ่านค่าในตาราง MPN (บทที่ 3)

## ภาคผนวก ค

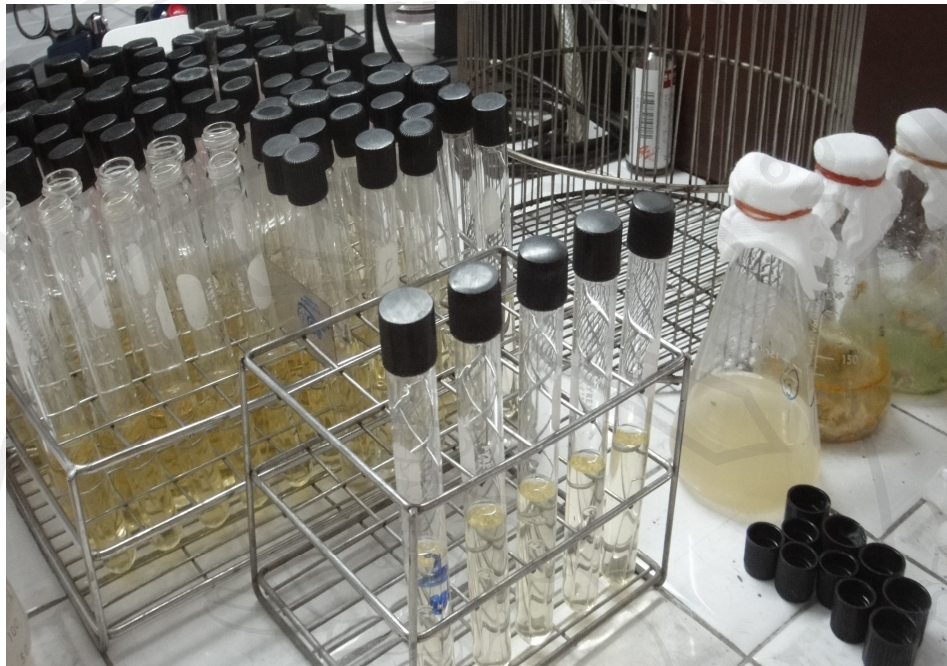
ภาพประกอบการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียในอาหาร



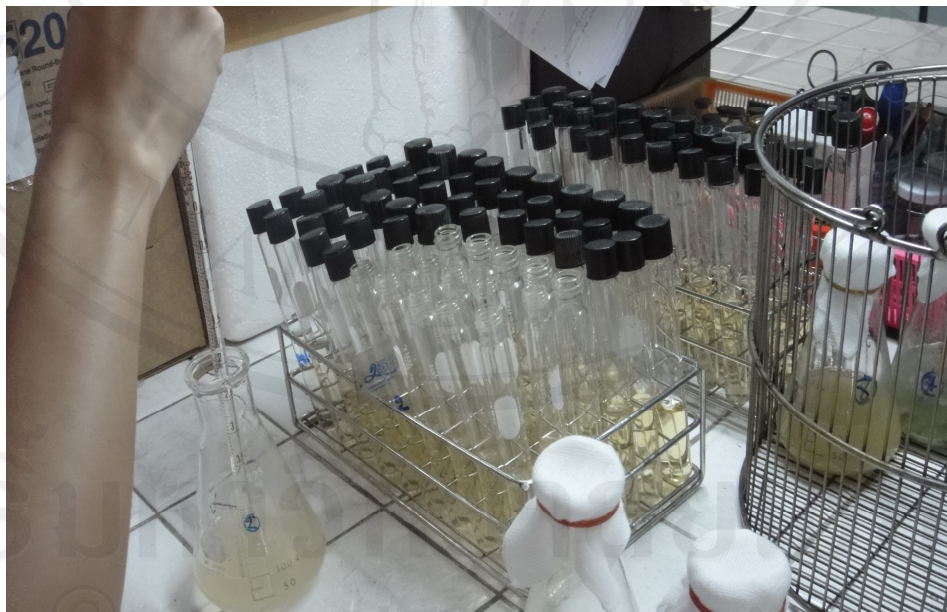
ภาพประกอบที่ 1 การซั่งตัวอย่างอาหารลงใน Phosphate Buffer Solution (PBS)



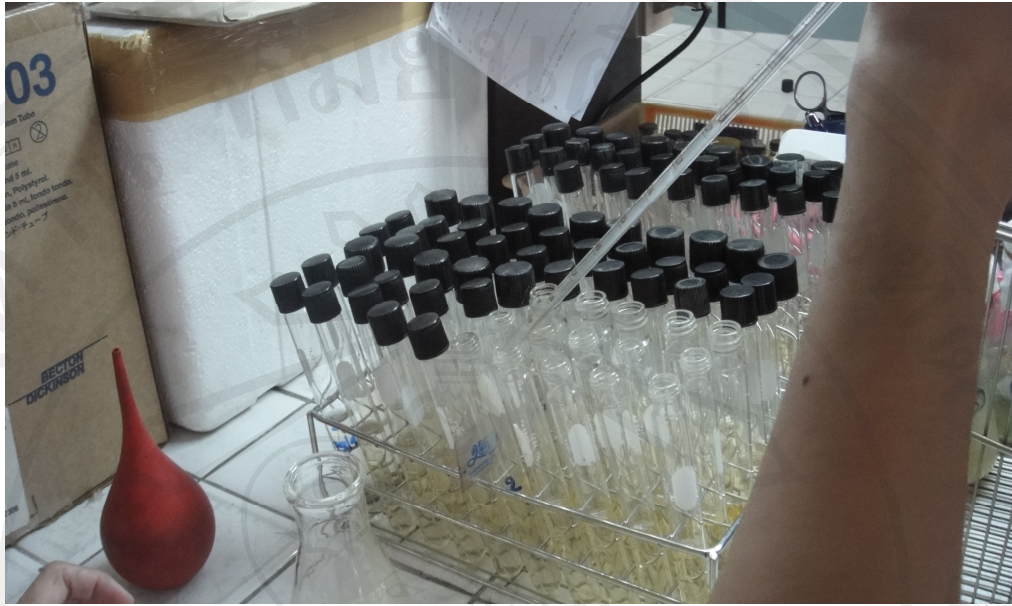
ภาพประกอบที่ 2 ตัวอย่างอาหารที่ละลายใน Phosphate Buffer Solution (PBS) ตีให้เข้ากัน



ภาพประกอบที่ 3 การเตรียมหลอดอาหาร Lactose Broth



ภาพประกอบที่ 4 การดูตัวอย่างที่ดีให้เป็นเนื้อเดียวกันใน Phosphate Buffer Solution

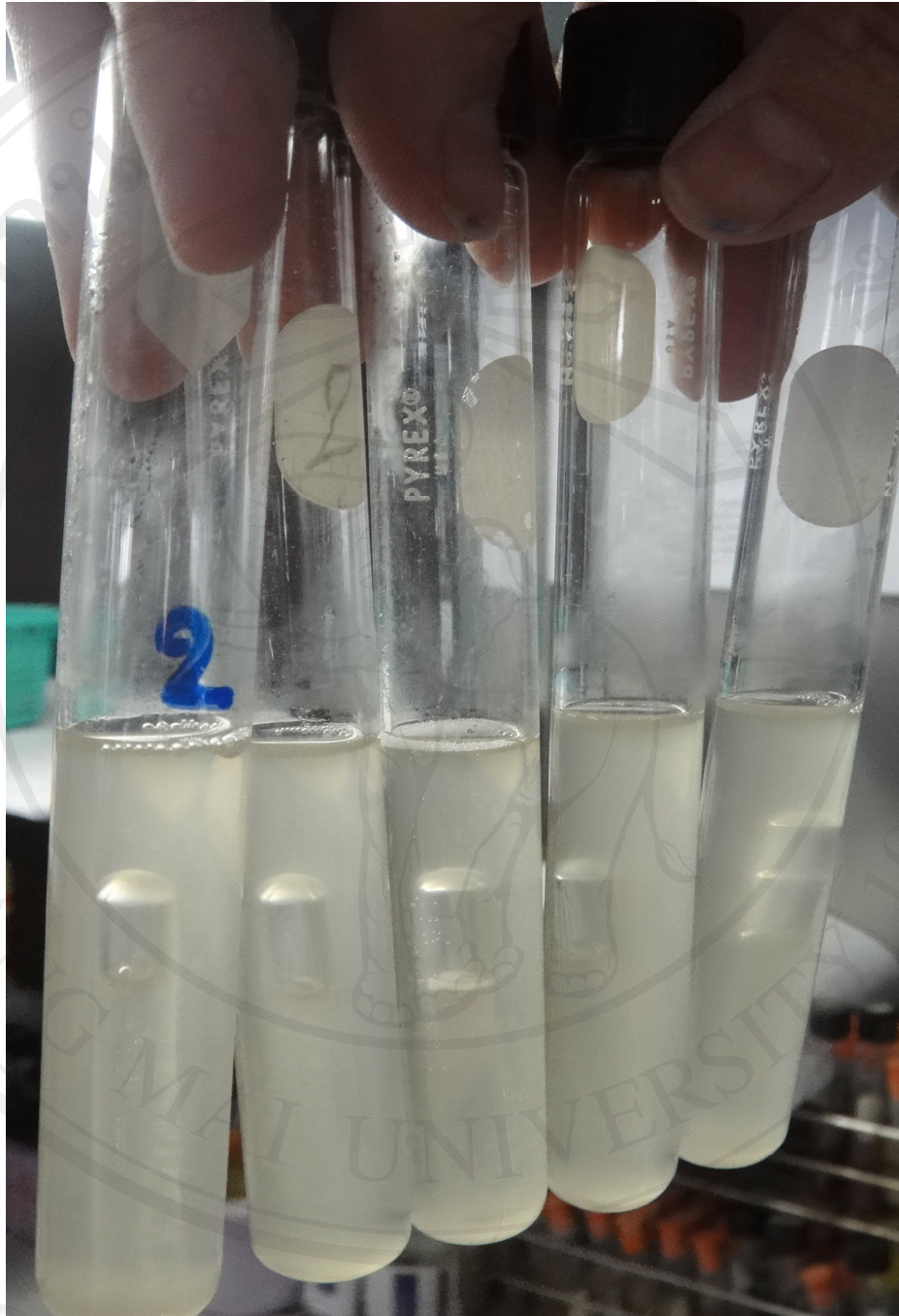


ภาพประกอบที่ 5 การใส่อาหารที่ดูดลงในหลอดอาหาร Lactose Broth



ภาพประกอบที่ 6 อาหาร Lactose Broth ที่เติมอาหารตัวอย่างแล้วใส่ในตู้ Incubator





ภาพประกอบที่ 7 หลอดอาหาร Lactose Broth ให้ผลบวกทั้ง 5 หลอด



ภาพประกอบที่ 8 หลอดอาหาร Brilliant Green Bile Broth (BGBB)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved



ภาพประกอบที่ 9 การใส่ตัวอย่างที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซ) จากขั้นตอน Presumptive test

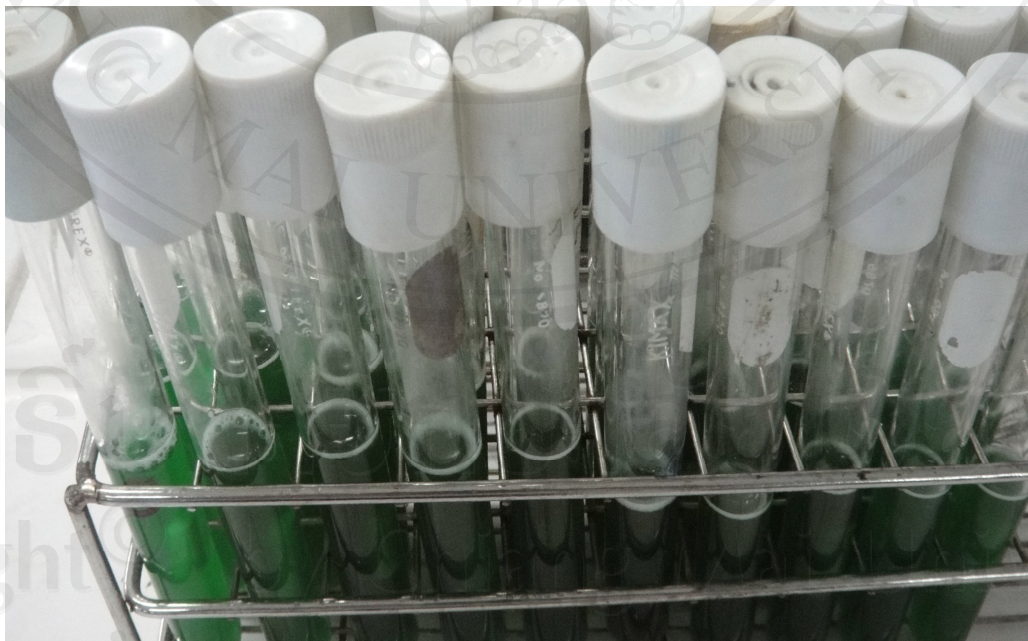
ลงในอาหาร 5% BGGB



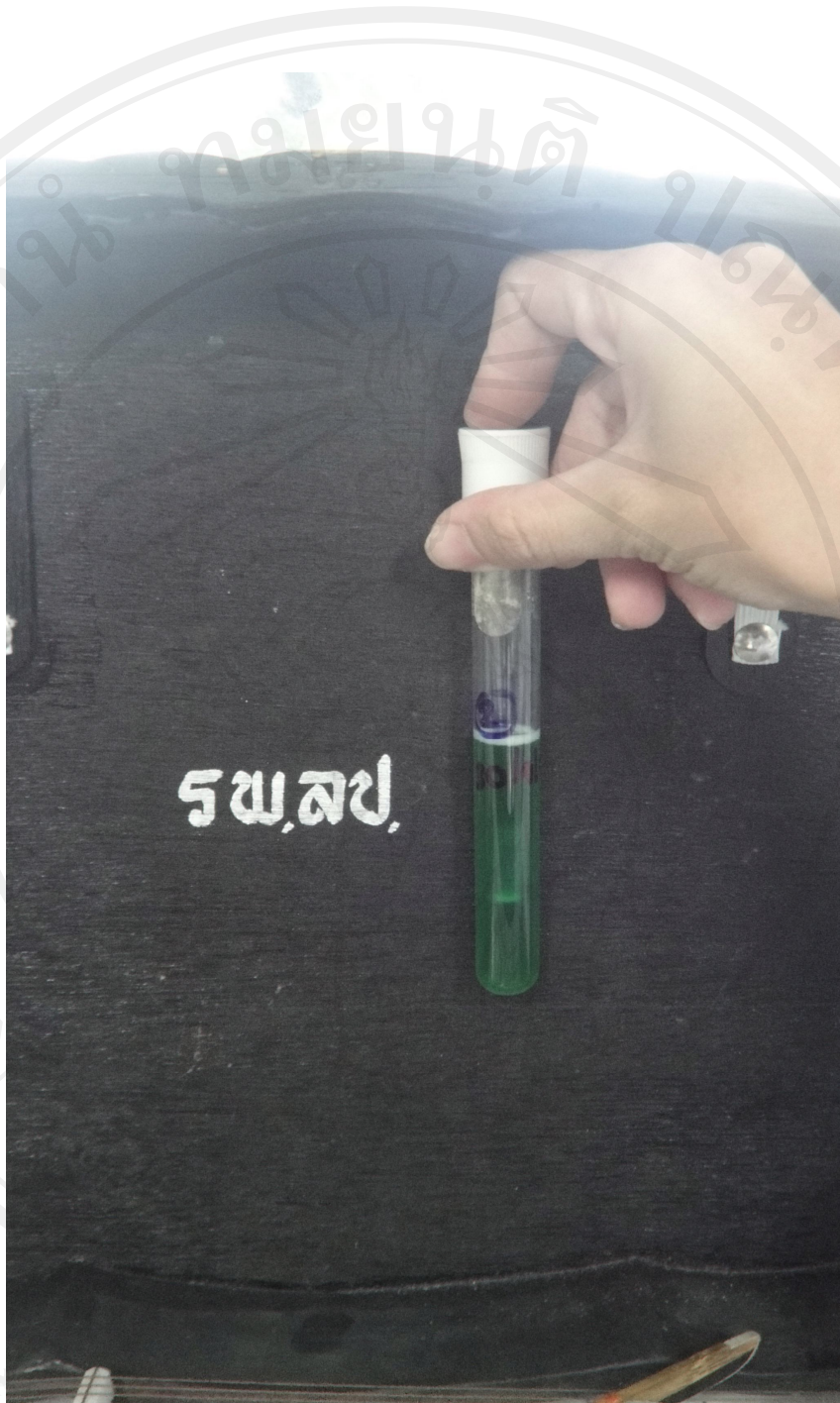
ภาพประกอบที่ 10 หลอดอาหาร 5% BGBB ที่เติมตัวอย่างอาหาร บ่มในตู้ Incubator



ภาพประกอบที่ 11 ตู้ Incubator ใช้บ่มเชื้อมีอุณหภูมิ 35° C



ภาพประกอบที่ 12 หลอดอาหารที่ผ่านการบ่มเชื้อครบ 48 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 13 หลอดอาหาร 5% BGBB ที่เกิดก๊าซ (ผลเป็นบวก)

## ภาคผนวก ง

ตารางบันทึกผลการวิเคราะห์

5-5-5 หมายความว่า ระดับความเข้มข้นที่ 1 : 10 ให้ผลบวกทั้ง 5 หลอด

ระดับความเข้มข้นที่ 1 : 100 ให้ผลบวกทั้ง 5 หลอด

ระดับความเข้มข้นที่ 1 : 1000 ให้ผลบวกทั้ง 5 หลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตาราง 1 แสดงผลการวิเคราะห์ Coliform bacteria ร้านอาหารพื้นเมืองที่ 1

ตัวอย่างอาหาร	ครั้งที่ 1			
	เวลา 08.00-09.00 น.		เวลา 12.00-13.00 น.	
	บันทึกผล	แปลผล Coliform MPN/g	บันทึกผล	แปลผล Coliform MPN/g
แกงขนุน	5/4/1	170	5/4/4	350
แกงหยวกกล้วย	5/5/5	>1600	5/5/5	>1600
แกงปลีกล้วย	0/0/0	<2	3/0/0	8
แกงแคไก่	4/0/0	13	4/1/0	17
ตำขมุน	3/1/0	11	3/1/2	17
ตำถั่วฝักยาว	4/4/1	40	5/5/5	>1600
น้ำพริกปลาร้า	5/4/4	350	5/5/4	1600
น้ำพริกตาแดง	3/0/0	8	5/1/0	30
น้ำพริกหนุ่ม	4/0/0	13	5/2/2	90
น้ำพริกปลานิล	5/5/5	>1600	5/5/5	>1600
ยำถั่วแปบ	3/3/0	17	5/3/0	80
ยำหน่อไม้ดอง	0/0/0	<2	3/0/0	8
ลาบหมูคั่ว	1/0/0	2	3/0/0	8
ลาบปลา	4/4/3	300	5/5/5	>1600
หมูเอ๋ป	2/0/0	4	4/0/0	13



ตาราง 2 แสดงผลการวิเคราะห์ Coliform bacteria ร้านอาหารพื้นเมืองที่ 1

ตัวอย่างอาหาร	ครั้งที่ 2			
	เวลา 08.00-09.00 น.		เวลา 12.00-13.00 น.	
	บันทึกผล	แปลผล Coliform MPN/g	บันทึกผล	แปลผล Coliform MPN/g
แกงขนุน	3/0/0	8	5/5/4	1600
แกงหยวกกล้วย	3/0/0	8	5/3/2	140
แกงปลีกล้วย	0/0/0	<2	0/0/1	2
แกงแคไก่	2/1/0	7	5/4/5	425
ตำขมุน	5/4/4	350	5/5/4	1600
ตำถั่วฝักยาว	5/2/2	90	5/2/3	120
น้ำพริกปลาร้า	5/4/5	425	5/5/3	900
น้ำพริกตาแดง	3/0/0	8	5/0/0	23
น้ำพริกหนุ่ม	4/5/1	50	5/5/4	1600
น้ำพริกปลานิล	3/1/1	14	3/4/1	25
ยำถั่วแปบ	5/4/2	220	5/4/2	220
ยำหน่อไม้ดอง	2/0/0	4	4/0/0	13
ลาบหมูคั่ว	0/0/0	<2	1/0/0	2
ลาบปลา	0/1/0	2	2/1/0	7
หมูแฮ๊ป	0/0/0	<2	0/0/0	<2

ตาราง 3 แสดงผลการวิเคราะห์ Coliform bacteria ร้านอาหารพื้นเมืองที่ 2

ตัวอย่างอาหาร	ครั้งที่ 1			
	เวลา 08.00-09.00 น.		เวลา 12.00-13.00 น.	
	บันทึกผล	แปลผล	บันทึกผล	แปลผล
	Coliform MPN/g		Coliform MPN/g	
แกงขนุน	1/1/0	4	1/3/1	10
แกงหยวกกล้วย	0/0/0	<2	3/2/0	14
แกงปลีกล้วย	5/2/1	70	5/2/1	70
แกงแคไก่	4/0/0	13	5/0/1	30
ตำขมุน	5/3/1	110	5/3/3	170
ตำถั่วฝักยาว	5/5/5	>1600	5/5/5	>1600
น้ำพริกปลาร้า	0/1/0	2	0/2/1	6
น้ำพริกตาแดง	0/2/1	6	1/2/2	10
น้ำพริกหนุ่ม	2/0/0	4	3/0/0	8
น้ำพริกปลานิล	5/3/3	170	5/5/5	>1600
ยำถั่วแปบ	4/1/0	17	4/2/0	22
ยำหน่อไม้คอง	5/5/5	>1600	5/5/5	>1600
ลาบหมูคั่ว	0/0/0	<2	2/0/0	4
ลาบปลา	5/5/5	>1600	5/5/5	>1600
หมูเด้ง	1/0/0	2	2/0/0	4

ตาราง 4 แสดงผลการวิเคราะห์ Coliform bacteria ร้านอาหารพื้นเมืองที่ 2

ตัวอย่างอาหาร	ครั้งที่ 2			
	เวลา 08.00-09.00 น.		เวลา 12.00-13.00 น.	
	บันทึกผล	แปลผล	บันทึกผล	แปลผล
	Coliform MPN/g		Coliform MPN/g	
แกงขนุน	4/2/0	22	5/2/0	50
แกงหยวกกล้วย	0/0/0	<2	0/0/0	<2
แกงปลีกล้วย	0/0/0	<2	3/0/0	8
แกงแคไก่	4/2/0	22	5/2/0	50
ตำขมุน	0/0/2	4	4/2/2	30
ตำถั่วฝักยาว	4/0/0	13	5/5/0	240
น้ำพริกปลาร้า	5/5/1	300	5/5/5	>1600
น้ำพริกตาแดง	0/0/0	<2	1/0/0	2
น้ำพริกหนุ่ม	4/2/0	22	5/2/0	50
น้ำพริกปลานิล	0/0/2	4	4/2/2	30
ข้าั่วแปบ	0/1/0	2	0/2/0	4
ข้าหน่อไม้ดอง	3/1/1	14	4/1/1	21
ลาบหมกั่ว	5/2/2	90	5/5/5	>1600
ลาบปลา	1/0/0	2	4/5/2	55
หมูเฝือก	0/0/0	<2	0/0/2	4

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล

นางสาวปานวลี ฉันทเจริญโรจน์

วัน เดือน ปีเกิด

11 มิถุนายน 2507

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2521-2523

การศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น  
โรงเรียนห้างฉัตรวิทยา

พ.ศ. 2524-2527

การศึกษาระดับประกาศนียบัตร  
ตอนต้น

พ.ศ. 2528 -2531

วิทยาลัยอาชีวศึกษาลำปาง  
ปริญญาตรี คหกรรมศาสตรบัณฑิต  
(อาหารและโภชนาการ)  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล  
กรุงเทพมหานคร

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2531 -2533

โภชนากร โรงพยาบาลเชียงราย  
ประชานุเคราะห์

พ.ศ. 2533 -2535

โภชนากร โรงพยาบาลลำปาง

พ.ศ. 2535 -2538

นักโภชนาการ โรงพยาบาลพิจิตร

พ.ศ. 2538 – ปัจจุบัน

นักโภชนาการชำนาญการ

โรงพยาบาลลำปาง