บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีทดลอง

3.1 วัสดุสำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

ซาลโมเนลลา เอนเทอริกา เวลเทบเรเดน (*Salmonella enterica* Weltevreden No. DMST 17375 ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแนวตั้งตรง (Stab) ; กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท (Brain Heart Infusion Broth ,BHI; Oxoid, England)

เอ๊กซ์ แอล ดี เอการ์ (Xylose Lysine Deoxycholate agar, (XLD Agar);Merck,Germany)

บี พี แอล เอส เอการ์ (Brillient- Green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (BPLS Agar) ; Merck , Germany)

3.2 สารเคมี

- โซเดียม ดี-แอล แลกเทต (Sodium DL-Lactate; Sigma, USA)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; Merck, Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; Merck, Germany)
- ไฮโดรคลอริก(Hydrochloric; J.T.Baker, USA)
- เปปโตน (Peptone; BD, France)
- ผงวุ้น (Agar; โอ วี เคมิคอล , ประเทศไทย)
- น้ำกลั่น (Distilled Water;โพล์สตาร์, ประเทศไทย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ขวดแก้วฝาเกลียวใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ ขนาดบรรจุ 10 มิลลิลิตร
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกไร้เชื้อ (Sterile Peti dish; Milliant, France)
- ขวดแก้วฝาเกลียว (Duran; Schott Duran,Germany)
- หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิลิตร (Test Tube; Pyrex, USA)
- กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์สแตนเลส ขนาด 2000 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์แก้ว ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร (Glass Beaker; Pyrex, USA)
- ปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Glass Pipette; KIMAX, USA)
- ช้อนตักสาร
- แท่งแก้วคนสาร
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave; Gallenkamp, England)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (เชียงใหม่, ประเทศไทย)

3.3.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- ตู้ เขี่ยเชื้อ
- ห่วงถ่ายเชื้อ
- Autopipette ขนาด 1000 มิลลิลิตร (Socorex, Switzerland)
- Blue Tip ขนาด 1000 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
- Autopipette ขนาด 500 มิลลิลิตร (MERCK, Germany)
- Yellow Tip ขนาด 500 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
- ถุงมือ(Glove; เซมเพอร์เมด, ประเทศไทย)
- เอทานอล 70 % (Ethanol; โอ วี เคมิคอล , ประเทศไทย)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง(pH Meter; WTW pH 357, Germany)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Incubator; แสงไทยเครื่องเย็น, เชียงใหม่ ประเทศไทย)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator; Termaks, Thailand)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องนับเชื้อ
- เครื่องเขย่า (Vortex; Lab-Line, USA)

3.3.3 เครื่องประมวลผลข้อมูล

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล

โปรแกรมสำเร็จรูป 3 โปรแกรม คือ

- โปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION
- โปรแกรม Microsoft ® Excel 2002 (Microsoft Corp, USA)
- โปรแกรม SPSS version 11.5 (SPSS Inc, USA)

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 6 ตอนดังนี้

3.4.1 การทดลองตอนที่ 1

การศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง และการเตรียมเชื้อสตอค (Stock Culture)

นำเชื้อ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375)ที่ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มาศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวเคมี ก่อนทำการเก็บเป็น Stock Culture ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ทำการถ่าย เชื้อ *S. enterica* Weltevreden จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแนวตั้งตรง ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยวิธีการ ขีด (Streak) ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ลงบนผิวหน้าอาหาร BHI Agar ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ทำการ ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารตาม ข้อ 1 ข้างบนนี้ แล้วขีด (Streak) ลงบนผิวหน้าอาหาร BHI Agar ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง ทำการบ่มเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1 แล้วนำโคโลนีที่ได้ มาถ่ายเชื้อด้วยวิธีการเดิมอีกเป็นครั้งที่ 3 เพื่อให้เชื้อฟื้นตัวและมีความสมบูรณ์ พร้อมต่อการนำไปใช้ในการทดลอง

3. โคโลนีเดี่ยวในจานอาหาร BHI Agar ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 3 ครั้งจะถูกนำไปเกลี่ย (Smear) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง (Slant) จำนวน 5 หลอด โดยแต่ละหลอดเลือกจาก 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โคโลนีเดี่ยว บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อจาก Slant นี้ ไปทดสอบทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อดังนี้

(ก) นำเชื้อจาก Slant มาทำการ ขีด (Streak) ลงบนผิวหน้าอาหาร Selective media 2 ชนิด คือ Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD Agar) และ (Brillient- Green Phenol red Lactose Sucrose Agar (BPLS Agar)

- ทดสอบ ด้วยการ เลี้ยงเชื้อใน อาหาร XLD (Xylose Lysine Deoxycholate agar) โดยทำการ ขีด(Streak) เชื้อ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD จำนวน 3 จาน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella enterica* Weltevreden ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีลักษณะโคโลนี กลม ใส จุดกึ่งกลางของ โคโลนีเป็นสีดำ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อ สร้าง Ferrous sulfate, และบริเวณ รอบ ๆ โคโลนีเป็นสีชมพูใส

- ทดสอบ ด้วยการ เลี้ยงเชื้อในอาหาร BPLS (Brillient- Green Phenol red Lactose Sucrose Agar) โดยทำการ ขีด(Streak) เชื้อ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPLS จำนวน 3 จาน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม ลักษณะโคโลนีของ *S. enterica* Weltevreden ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ จะมีลักษณะโคโลนี กลมสีแดง ล้อมรอบด้วยโซนสีแดง

(ข) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อ ที่มีลักษณะของ *Salmonella* spp. มาเกลี่ย ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง (Slant) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ค) นำ Slant จากข้อ (ข.) มาทำการทดสอบในขั้นต่อมาคือ ทำการใช้เข็มเขี่ยเชื้อในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง (Slant) จากข้อ (ข) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร 4 ชนิด เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

- TSI (Triple sugar Iron) โดยการ แทงตรง (Stab) และ เกลี่ย (Smear) จำนวน 3 หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม

- Urea Agar โดยวิธีการ เกลี่ย (Smear) จำนวน 3 หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม

- MIL (Motile Indole Lysine) โดยการ แทงตรง (Stab) จำนวน 3 หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม

- MR-VP โดยวิธีการเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหารจำนวน 3 หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ง) เชื้อจาก Slant เดิมจากข้อ (ข) ให้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ขีด (Streak) ลงบนผิวหน้าอาหาร BHI Agar ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 จาน บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 -48 ชม.

(จ) นำเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (ง) มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อด้วยการย้อมสีกรัม

(ฉ) เมื่อผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ และการย้อมสีแกรม จากการทดลองในข้อ (ค) และ (จ) ถูกต้องตามคุณสมบัติของ *Salmonella* spp. จึงทำการ ถ่ายเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ทำไว้ในข้อ (ง) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อBHI วุ้นผิวหน้าเอียง จำนวน 15 หลอดเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลอง เป็น เชื้อสตอค ต่อไป

3.4.2 การทดลองตอนที่ 2

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว , สารที่ใช้สำหรับการทดลอง และการทดสอบการปนเปื้อน

3.4.2.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว(Brain Heart Infusion Broth (BHI) และการทดสอบการปนเปื้อน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ 1 ชุดการทดลอง จะเตรียมขวดทดลองทั้งหมด จำนวน 50 ขวด แต่ละขวดมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 9 มิลลิลิตร

โดย 36 ขวด เตรียมสำหรับการทดลองใน 18 ช่วงเวลา ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ

และ 14 ขวด เตรียมสำหรับใช้ในการทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ส่วนประกอบของอาหารมีดังนี้

Brain Heart Infusion Broth	16.65	กรัม
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

ในกรณีที่มีการปรับระดับของ

โซเดียมแลกเทต (60 % w/v) เป็น 1.2 %

จะเติมโซเดียมแลกเทต	9	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในกรณีที่มีการปรับระดับของ
โซเดียมแลกเทต (60 % w/v) เป็น 2.4 %
จะเติมโซเดียมแลกเทต 18 มิลลิลิตร

ในกรณีที่มีการปรับระดับของ
โซเดียมคลอไรด์ 2 % จะเติมโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ 4 % จะเติมโซเดียมคลอไรด์ 18 กรัม

ทำการฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารที่เตรียมนั้นเย็นลง แล้วจึงนำเข้าเก็บในห้องเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอเวลาที่จะถูกนำออกมาใช้งาน

อาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ BHIB จะถูกเตรียมเพื่อใช้ในการทดลองล่วงหน้าก่อนที่จะทำการทดลอง ประมาณ 2 วัน เพราะในแต่ละชุดของการทดลองจำเป็นต้องเตรียมจำนวนขวดอาหารเหลวปริมาณมาก

ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ไปทำการทดลองจริง 1 วัน จะสุ่มขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เก็บในห้องเย็นออกมา จำนวน 3 ขวด เพื่อนำมาทดลองการปนเปื้อน ด้วยวิธีการ Pour plate หากผลการทดลองพบว่าขวดที่สุ่มออกมาเกิดการปนเปื้อน ไม่ว่าจะเกิดการปนเปื้อนจากขั้นตอนใด จะต้องทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นใหม่
ทำการทดสอบการปนเปื้อน ดังนี้

1. ใช้ปิเปต ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่สุ่มออกมา ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 2 จาน

2. ใช้เทคนิคการ Pour plate โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI Agar ซึ่งได้ฆ่าเชื้อและหลอมเหลวแล้วอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 10 -15 มล. ลงไป และผสมสารละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar ให้กระจายเข้ากันดี โดยการเขย่าไปข้างบนและข้างล่าง 5 ครั้ง เขย่าไปทาง ซ้ายและขวา 5 ครั้ง เขย่าให้หมุนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกาอย่างละ 5 ครั้ง และในขณะเขย่าควรระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ

3. ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วจึงคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเจือจางจุลินทรีย์ Maximum Recovery Diluent (MRD) และการทดสอบการปนเปื้อน

จะทำการเตรียม Maximum Recovery Diluent ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร

มีส่วนประกอบดังนี้

NaCl	0.85 %
Peptone	0.1 %

ทำการฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารที่เตรียมนั้นเย็นลง แล้วจึงนำเข้าเก็บในห้องเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอเวลาที่จะถูกนำออกมาใช้งาน

โดย Maximum Recovery Diluent จะถูกเตรียมขึ้นล่วงหน้า และเก็บรักษาด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียม BHIB และจะถูกสุ่มออกมาทำการทดสอบการปนเปื้อนด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน

ทำการสุ่มหลอดทดลองที่บรรจุสารที่ใช้ในการเจือจางจุลินทรีย์ (MRD) ที่เตรียมใช้ในการทดลองจำนวน 3 หลอดทดลอง มาทำการทดสอบการปนเปื้อนดังนี้

1. ใช้ปิเปต ดูด MRD ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากหลอดทดลองที่สุ่มออกมา ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย 1 หลอดของ MRD จะทำการดูดลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 จาน

2. ใช้เทคนิคการ Pour Plate โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI Agar ซึ่งได้ฆ่าเชื้อแล้วและหลอมเหลวแล้วอุณหภูมิ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 10-15 มล. ลงไปและผสมสารละลายของสารที่ใช้ในการเจือจางจุลินทรีย์ MRD และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar ให้กระจายเข้ากันดี โดยการเขย่าไปข้างบนและล่าง 5 ครั้ง เขย่าไปทาง ซ้ายและขวา 5 ครั้ง เขย่าให้หมุนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกาอย่างละ 5 ครั้ง และในขณะเขย่าควรระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ

3. ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ทำการคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับขั้นตอน ในข้อ 3.4.2.1 และ 3.4.2.2 เป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BHIB) และสารเจือจางจุลินทรีย์ (MRD) พร้อมวิธีการทดสอบการปนเปื้อน สำหรับ 1 ชุดการทดลอง และจะทำเช่นเดียวกันนี้ใน ทั้งหมด 27 ชุดการทดลอง

3.4.2.3 การทดสอบความเป็นกรด-ด่างของ โซเดียมแลกเทต ความเข้มข้น 60 % W/V

ใช้ปิเปตดูดโซเดียมแลกเทตปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากขวดบรรจุ ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่สะอาด จำนวน 3 ขวด แล้วทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ และหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที การทดสอบความเป็นกรด-ด่างของโซเดียมแลคเทตจะทำการทดสอบครั้งเดียว

3.4.3 การทดลองตอนที่ 3
การทดลองเพื่อหาปริมาณของเชื้อเบื้องต้น

3.4.3.1 การทดลองเพื่อหาปริมาณของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ก) ถ่ายเชื้อ *Salmonella* Typhimurium จาก สตอคเชื้อที่เตรียมไว้ ด้วยวิธีการเตรียม เช่นเดียวกับการเตรียม สตอคเชื้อของ *Salmonella enterica* Weltevreden ตามข้อ 3.4.1.3(ฉ) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar เพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการขีดเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันนี้ เป็นจำนวน 3 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน

(ข) เขี่ยเชื้อ *Salmonella* Typhimurium 1 โคโลนี จากจานอาหารที่ผ่านการ ขีดเชื้อเป็นครั้งที่ 3 ลงเลี้ยงในขวดที่บรรจุ BHI Broth 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด

(ค) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากร่องรอยของโคโลนีเดิมในข้อ (ข) ไปทำการย้อมสีกรัม เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อหากเชื้อไม่บริสุทธิ์ จะต้องยกเลิกการเลี้ยงเชื้อใน BHI Broth และต้องทำการ ถ่ายเชื้อจาก เชื้อสตอคใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ง) หากการย้อมสีกรัมเป็นที่น่าพอใจ คือพบลักษณะของโคโลนีของเชื้อ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของ Carbol Fuchsin จึงนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Broth ที่เตรียมในข้อ (ข) ไปทำการเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(จ) นำเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ (ง) ทั้ง 2 ขวด มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยการทดลองนี้ได้ทำการเจือจางจาก 10^{-1}–10^{-9} โดยก่อนทำการเจือจางในแต่ละครั้งต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่าให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(ฉ) ใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อจากหลอดทดลองที่ได้ทำการเจือจาง และมีความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 10^{-9} จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกไร้เชื้อ ทำจำนวน 2 จาน ต่อ 1 ความเข้มข้น จากนั้นใช้ปิเปตอันเดิมดูดสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นอันดับถัดไปก็คือ 10^{-8} และ 10^{-7} ไปจนถึง 10^{-2} โดยทุกความเข้มข้นจะดูดสารละลายเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตร และ ทำจำนวน 2 จานต่อ 1 ความเข้มข้นเช่นกัน

(ช) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar ซึ่งได้ฆ่าเชื้อและหลอมเหลวแล้ว (อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส) ลงผสมกับสารละลายของเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้กระจายให้เข้ากันดีโดยการเขย่าไปข้างบนและล่าง 5 ครั้ง เขย่าไปทาง ซ้ายและขวา 5 ครั้ง เขย่าให้หมุนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกาอย่างละ 5 ครั้ง และในขณะเขย่าควรระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ

(ซ) ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ทำการคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ฌ) นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น cfu/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3.2 การทดลองเพื่อศึกษาการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ในอาหารที่มี โซเดียมแลกเทต 3 ระดับ คือ 0 %, 1.2 % และ 2.4 % โดยไม่มีการเติมปัจจัยอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อที่จะใช้ในการทดลอง ให้ทำการ เตรียม ดังข้อ 3.4.3.1 (ก) ถึง ข้อ 3.4.3.1 (ง) ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการทดลองนี้ ทำตามข้อ 3.4.2.1 แต่จะไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ และไม่มีการปรับ ความเป็นกรด-ด่างในอาหาร และทำการทดลองดังนี้

(ก) นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการคือ เจือจางจาก 10^{-1} – 10^{-5} โดยก่อนทำการเจือจางในแต่ละครั้งต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า ให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(ข) เขย่าเชื้อในหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า จนเชื้อกระจายตัว อย่างสม่ำเสมอ แล้วใช้ปิเปตดูดเชื้อจากหลอดทดลองที่ผ่านการเจือจางแล้ว มีความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^{-5} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB 3 ชุดคืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB ที่มี ความเข้มข้นของ โซเดียมแลกเทต 0 % , ชุดที่มี ความเข้มข้นของ โซเดียมแลกเทต 1.2 % และ ชุดที่มี ความเข้มข้นของ โซเดียมแลกเทต 2.4 % โดยแต่ละชุดประกอบด้วยขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จำนวน 48 ขวด ทำการศึกษา 24 ช่วงเวลาคือ ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 32, 48,72, 240, 408 และ ทำ 2 ซ้ำ เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเหล่านี้จะมีความเข้มข้นที่เจือจางอีกหนึ่งความเข้มข้น นั่นคือเท่ากับ 10^{-6}

(ช) เมื่อเติมเชื้อเสร็จสิ้น ให้ทำการบ่มเชื้อ ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา โดยขวดที่ถูกเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0 และทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อในขวดอื่น ๆ ตามช่วงเวลาที่กำหนด อีก 23 ช่วงเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4 การทดลองตอนที่ 4

ผลการศึกษาการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ในสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี การผันแปรปัจจัยคือ โซเดียมแลกเทต โซเดียมคลอไรด์ และความเป็นกรด-ด่าง อย่างละ 3 ระดับ

การทดลองนี้ประกอบด้วยปัจจัยคือ โซเดียมแลกเทต , โซเดียมคลอไรด์ และความเป็นกรด-ด่าง และแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ซึ่งมีความสำคัญเท่าๆ กัน จึงวางแผนการทดลองเป็นแบบ Factorial Experiment ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถศึกษาปัจจัยได้หลายปัจจัยในการทดลองเดียว รวมทั้งสามารถศึกษาถึงปฏิกิริยาสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ได้ ทำให้สามารถสรุปได้ชัดเจนมากขึ้น เพราะทุกหน่วยทดลองถูกนำมาประมวลผล

การทดลองนี้ประกอบด้วย ปัจจัย 3 ปัจจัย และ แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ คือ

1. โซเดียมแลกเทต 0, 1.2 และ 2.4 เปอร์เซ็นต์
2. โซเดียมคลอไรด์ 0, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์
3. ความเป็นกรด-ด่าง 6.5, 7.0 และ 7.5

โดยหน่วยทดลองที่ทำการศึกษา คือ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) เป็นหน่วยทดลองมาจากแหล่งเดียวกัน สายพันธ์เดียวกัน เจริญเติบโตในสภาวะเดียวกันและเวลาเท่ากัน จัดเป็นหน่วยทดลองที่มีความสม่ำเสมอ

การทดลองนี้เป็นการวางแผนการทดลองแบบ 3^3 Factorial in CRD โดยชุดการทดลองจะมีทั้งหมด 27 ชุด และแสดงดังตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 ระดับของโซเดียมแลกเทต โซเดียมคลอไรด์ และความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดการทดลอง	โซเดียมแลกเทต(%)	โซเดียมคลอไรด์(%)	ความเป็นกรด-ด่าง
1	0	0	6.5
2	0	0	7.0
3	0	0	7.5
4	0	2	6.5
5	0	2	7.0
6	0	2	7.5
7	0	4	6.5
8	0	4	7.0
9	0	4	7.5
10	1.2	0	6.5
11	1.2	0	7.0
12	1.2	0	7.5
13	1.2	2	6.5
14	1.2	2	7.0
15	1.2	2	7.5
16	1.2	4	6.5
17	1.2	4	7.0
18	1.2	4	7.5
19	2.4	0	6.5
20	2.4	0	7.0
21	2.4	0	7.5
22	2.4	2	6.5
23	2.4	2	7.0
24	2.4	2	7.5
25	2.4	4	6.5
26	2.4	4	7.0
27	2.4	4	7.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB จะถูกปรับระดับของ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมด อย่างละ 3 ระดับ โดย โซเดียมแลกเทต และ โซเดียมคลอไรด์ จะทำการปรับในช่วงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะถูกปรับก่อนการทำการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สำหรับการทดลองใน 1 ชุดการทดลอง จะเตรียมเป็นจำนวนทั้งหมด 50 ขวด ใช้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อจำนวน 36 ขวด เพื่อตรวจนับการเจริญของเชื้อ 18 ช่วงเวลา คือชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 30, 198, 366 และ 534 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ส่วนที่เหลือ 14 ขวด ใช้สำหรับทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ทำการทดลองดังขั้นตอนต่อไปนี้

ในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อที่จะใช้ในการทดลองให้เตรียม ดังข้อ 3.4.3.1 (ก) ถึง ข้อ 3.4.3.1 (ง) ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สำหรับการทดลองนี้ ทำดังนี้

(ก) นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB ที่เตรียมและเก็บในห้องเย็น ออกมาทำการแยกขวดสำหรับทดลองจริง 36 ขวด และ ขวดสำหรับทดลองปรับความเป็นกรด-ด่าง 14 ขวด โดยขวดสำหรับใช้ในการทดลองจริง จะถูกนำไปติดหมายเลขระบุลำดับที่ในการตรวจนับการเจริญ และวางทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อ ที่เปิดแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และฆ่าเชื้อที่อาจติดมากับอุปกรณ์ที่เตรียมไว้ในตู้

(ข) ส่วนขวดอาหารเหลว 14 ขวด ที่จะใช้ในการทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จะนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละขวดด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วบันทึกค่าไว้ ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละขวดด้วย NaOH 2 N หรือ HCl 2 N ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจนได้ค่าของกรด-ด่าง ตามที่ต้องการใช้ในการทดลอง จดบันทึกปริมาตรของกรดหรือด่างที่ใช้ไป เพื่อหาค่าเฉลี่ยของกรดหรือด่าง ที่ใช้ในการปรับ จากการทดลองปรับที่ได้ค่าใกล้เคียงกับที่ต้องการเป็นจำนวน 5 ครั้ง

(ค) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB ทั้ง 36 ขวดในตู้เขี่ยเชื้อ ตามปริมาตร ที่ได้ทดลองปรับในข้อ (ข) ด้วย เทคนิคไร้เชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากขั้นตอนนี้จะเป็นอาหารที่เตรียมพร้อมสำหรับการทดลอง เพราะมีระดับของปัจจัยในการทดลองครบทั้ง 3 ปัจจัย แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ง) นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการคือ เจือจางจาก 10^{-1} – 10^{-5} โดยก่อนทำการเจือจางในแต่ละครั้งต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า ให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(จ) เขย่าเชื้อในหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า จนเชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ แล้วใช้ปิเปตดูดเชื้อจากหลอดทดลองที่ผ่านการเจือจางแล้ว มีความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^{-5} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB ที่เตรียมทั้งหมด โดยเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเหล่านี้จะมีความเข้มข้นที่เจือจางอีกหนึ่งความเข้มข้น คือเท่ากับ 10^{-6}

(ช) เมื่อเติมเชื้อเสร็จสิ้น ให้ทำการบ่มเชื้อ ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา โดยขวดที่ถูกเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0 และทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อในขวดอื่น ๆ ตามช่วงเวลาที่กำหนด อีก 17 ช่วงเวลา

3.4.4.1 การตรวจนับการเจริญของเชื้อ

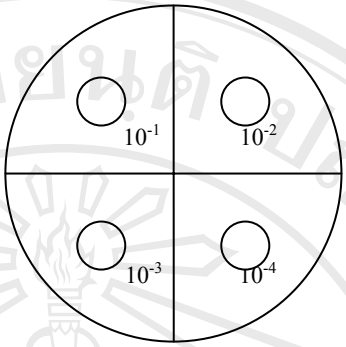
การทดลองในข้อ 3.4.3.1 และ 3.4.3.2 จะทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อตามช่วงเวลาที่กำหนด ด้วยวิธีการเดียวกันคือตรวจนับการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการ Drop Plate ดังนี้

(ก) นำเชื้อที่เลี้ยงใน BHI Broth จากตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ออกมาทำการเจือจางด้วยการใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มี MRD 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง เช่นในช่วงเวลาเริ่มแรกของการทดลอง เชื้อจะมีปริมาณน้อยจึงเจือจางน้อย แต่หากมีปริมาณช่วงเวลาเพิ่มขึ้น จะต้องทำการเจือจางมากขึ้น หรืออาจสังเกตจากสีและลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากยังคงใสแสดงว่าเชื้อยังมีปริมาณน้อย แต่หากพบว่าเริ่มขุ่น แสดงถึงการที่เชื้อจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะต้องทำการเจือจางมากขึ้น โดยก่อนทำการเจือจางในแต่ละครั้งต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า ให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(ข) ใช้ปิเปตดูดเชื้อ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรจากแต่ละความเข้มข้นที่ได้จากการเจือจางแล้วนั้น หยดลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง BHI Agar ที่ผ่านการอบผิวหน้าอาหารให้แห้งในตู้บ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 15-20 นาที โดยทำการหยดเชื้อที่มีความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้นน้อยไปหามาก ดังภาพที่ 3.1 จากแต่ละความเข้มข้นให้ทำ 2 ซ้ำ โดยการหยดลงบนอาหารจำนวน 2 จาน



ภาพที่ 3.1 ลักษณะการหยดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทำ Drop plate

(ค)ใช้ห่วงถ่ายเชื้อที่ลนไฟจนร้อนแดงแล้วทิ้งให้เย็นลง เกลี่ยหยดเชื้อให้กระจาย

(ง) บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นระหว่าง 5-50 โคโลนี คำนวณเป็น cfu/ml และเปลี่ยนค่าเป็น log cfu/ml

(จ) นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ผ่านการตรวจนับการเจริญของเชื้อแล้ว ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วบันทึกค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละขวด ของแต่ละช่วงเวลาเพื่อใช้ประกอบการศึกษาการเจริญของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.5 การทดลองตอนที่ 5

การสร้างกราฟการเจริญเติบโต และ การคำนวณเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ที่ต้องการศึกษาคือ ค่า Maximun growth rate(K) ค่า Maximum cell population (D) ค่า Lag phase Duration (L) และ ค่า Generation Time(GT)

การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป 2 โปรแกรมคือ

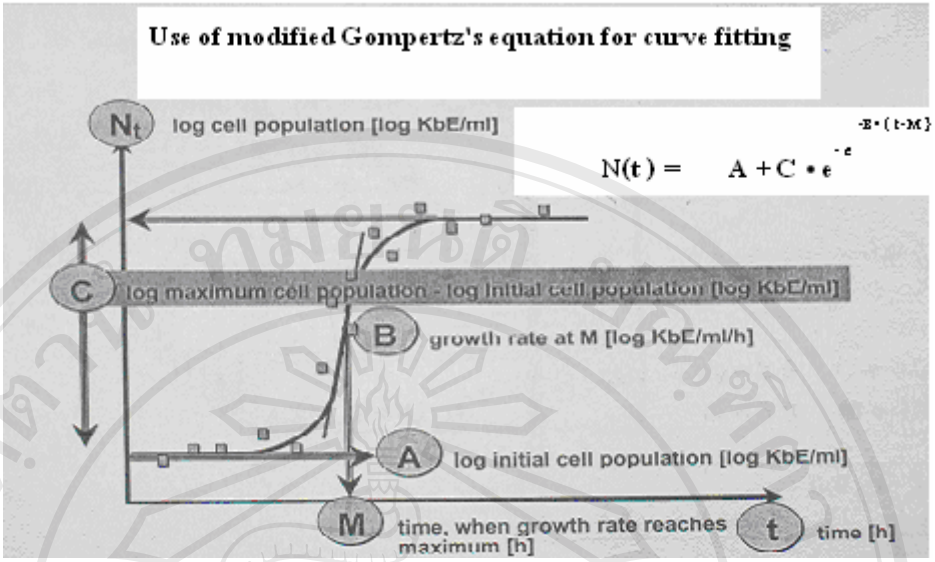
(ก) LEKSAWASDI RSS MINIMISATION

(ข) โปรแกรม Microsoft® Excel 2002

(ก) การวิเคราะห์ด้วย LEKSAWASDI RSS MINIMISATION เพื่อหาค่าของพารามิเตอร์ 4 ตัวที่เกี่ยวข้องใน Gompertz equation

นำข้อมูลของปริมาณเชื้อที่ได้จากการตรวจนับการเจริญ จากการเก็บข้อมูลการทดลอง 2 ซ้ำ มาวิเคราะห์ด้วย LEKSAWASDI RSS MINIMISATION ซึ่งได้กำหนดให้วิเคราะห์ ด้วย Gompertz equation และ กำหนดค่าของพารามิเตอร์ ที่เกี่ยวข้องพร้อมทั้งระบุ ช่วงต่ำสุดและสูงสุดให้แก่พารามิเตอร์แต่ละตัว ในขั้นตอนนี้จะได้ค่าของข้อมูลของพารามิเตอร์จากการวิเคราะห์ 4 ค่า คือ A B C และ M

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.2 การหาค่าของ A B C และ M ด้วย Gompertz equation

พารามิเตอร์ A และ C สามารถหาได้ด้วยวิธีการ ลากเส้นกราฟการเจริญไปตัดกับแกน Y แต่ค่าของพารามิเตอร์ B และ M ไม่สามารถหาได้อย่างสะดวกด้วยการประเมินจากกราฟ จึงใช้โปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION ในการสร้างกราฟเส้นโค้งที่สมบูรณ์ (Fitted curves) และคำนวณค่าของพารามิเตอร์ ทั้ง 4 ตัวคือ A B C M ให้

ข้อมูลที่ได้จะประกอบไปด้วยข้อมูลค่า A B C M ของข้อมูลใน ซ้ำที่ 1 และ ข้อมูลของซ้ำที่ 2 โดยแต่ละซ้ำจะมีทั้งหมด 27 ค่า

(ข) การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย โปรแกรม Microsoft ® Excel 2002

นำข้อมูลค่า A B C M ของข้อมูลใน ซ้ำที่ 1 และ ข้อมูลของซ้ำที่ 2 โดยแต่ละซ้ำจะมีทั้งหมด 27 ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์จากข้อ (ก) มาวิเคราะห์ในขั้นต่อมาด้วยการ สร้างสูตรคำนวณในโปรแกรม Microsoft ® Excel 2002 เพื่อให้ได้ค่าของ K, D, L, และ GT อีก 2 ชุด และแต่ละชุดก็จะมี 27 ค่า เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณค่า K, D , L และ GT จากสูตรดังต่อไปนี้

Maximum Growth Rate (K) $= \frac{B*C}{e}$

Maximum Cell Population (D) $= A + C$

Lag-Phase Duration (L) $= M - \frac{1}{B}$

GT (Generation Time) GT $= \frac{[\log_{10}(2)]\, e}{B*C}$

3.4.6 การทดลองตอนที่ 6

การวิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ

3.4.6.1 การวิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย โปรแกรม SPSS Version 11.5 For Window โดยในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลค่า K, D, L และ GT อย่างละ 2 ชุดจาก 2 ซ้ำ โดยในแต่ละชุดจะมี 27 ค่า ที่ได้จากการวิเคราะห์ในการทดลองตอนที่ 5

โดยประกอบด้วยการวิเคราะห์ 2 แบบคือ

1. การวิเคราะห์เพื่อหาความแปรปรวนระหว่างชุดข้อมูล(Analysis of varience) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล ในปัจจัยแต่ละตัว

ทำการวิเคราะห์ ANOVA เป็นแบบ 3^3 Factorial in CRD และเลือกวิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan

2. การวิเคราะห์เพื่อสร้างสมการ Polynomial equation ของ K D L และ GT ของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ที่เจริญใน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการวิเคราะห์ Multiple Linear Regression แบบ 3^3 Factorial in CRD เพื่อให้ได้ สมการ Polynomial Equation 4 สมการ คือ สมการของค่า K, D, L และ GT

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.6.2 การวิเคราะห์เพื่อสร้างสมการ Polynomial equation ของ K, D, L และ GT จากข้อมูลการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ที่เจริญในสภาวะของอาหารที่มีการเพิ่ม ระดับของอุณหภูมิอีก 1 ระดับคือ อุณหภูมิ ที่ 35 องศาเซลเซียส เข้าร่วมในการวิเคราะห์

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการวิเคราะห์ Multiple Linear Regression แบบ 3^3 x 2 Factorial in CRD เพื่อให้ได้ สมการ Polynomial Equation 4 สมการ คือ สมการของค่า K, D, L และ GT ที่จะสามารถใช้ทำนายการเจริญของเชื้อ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ที่ได้รับอิทธิพลจากอุณหภูมิ เพิ่มขึ้นอีก หนึ่งปัจจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved