บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Salmonella enterica* Weltevreden No. DMST 17375 ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแนวตั้งตรง (stab) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

* บี เอช ไอ บี (Brain Heart Infusion Broth, BHIB); Oxoid, England
* เอ็กซ์ 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
* ทริเปิล ซูการ์ ไอรอน เอการ์ (Triple Sugar Iron Agar, TSI Agar); Merck, Germany
* ยูเรีย เอการ์ (Urea Agar); Difco, USA

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

* ขวดแก้วฝาเกลียวใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ ขนาดบรรจุ 10 มิลลิลิตร
* จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่ปลอดเชื้อ (Sterile Petri dish); Millionant™, France
* ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร (Duran); Schott Duran, Germany
* หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิลิตร (Test Tube); Pyrex, USA
* อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); เชียงใหม่, ประเทศไทย
* หม้อนึ่งความดัน (Autoclave); Gallenkamp, England
* แท่งแก้วคนสาร
* เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ; Sartorius, Germany
* ช้อนตักสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

* กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
* บีกเกอร์แก้ว ขนาด 50 มิลลิลตร และ 100 มิลลิลตร (Glass Beaker); Pyrex, USA
* บีกเกอร์สแตนเลส ขนาด 2000 มิลลิลตร
* ปิเปตแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร (Glass Pipette); KIMAX, USA
* ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Termaks)

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

* ตู้เขี่ยเชื้อ
* ห่วงถ่ายเชื้อ
* Blue Tip ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
* Yellow Tip ขนาด 200 ไมโครลิตร (MERCK, Germany)
* ถุงมือยาง ; เซมเพอร์เมด, ประเทศไทย
* เอทานอล 70 % (โอ วี เคมิคอล, ประเทศไทย)
* เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH Meter, WTW pH 357, Germany)
* ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator); Termaks, Thailand
* ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (Incubator); Ranco, Thailand
* เครื่องเขย่า (Vortex); Heidolph, Germany
* แว่นขยาย
* Autopipette ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Biohit Proline, Finland)
* Autopipette ขนาด 100 ไมโครลิตร (Biohit Proline, Finland)
* ตะเกียงบุนเสน
* จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sterile Peti dish); Millionant™, France

3.1.5 เครื่องประมวลผลข้อมูลและโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลข้อมูล

* เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
* โปรแกรม SPSS version 10.0.1 (SPSS Inc, USA)
* โปรแกรม Microsoft ® Excel 2003 (Microsoft Corp, USA)
* โปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

* โปรแกรม Visual Basic ใน Microsoft ® Excel 2003 (Microsoft Corp, USA)

3.2 สารเคมี

* เปปโตน (Peptone); BD, France
* ผงวุ้น (Agar); โอ วี เคมีคอล, ประเทศไทย
* น้ำกลั่น (Distilled Water); โพล์สตาร์, ประเทศไทย
* โซเดียม ดี-แอล แลกเทต 60 % w/v (Sodium DL-Lactate 60 % w/v); Sigma, USA
* โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride); Merck, Germany
* โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide); Merck, Germany
* ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric); J. T. Baker, USA
* โมไทล อินโดล แอล-ไลซีน ดีคาร์บอกซีเลชัน (Motile Indole L-Lysine decarboxylation, MIL); Difco, USA
* โวเกส โพรสเคาเออร์ (Voges Proskauer); Merck, Germany
* เมทิล เรด (Methyl Red, MR); Merck, Germany

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 วิธีการทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ *Salmonella enterica* Weltevreden (DMST 17375) และการเตรียมสตอคเชื้อ (stock culture)

โดยนำเชื้อ *S.* Weltevreden DMST 17375 ที่ได้รับมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มาศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวเคมี ก่อนทำการเก็บสตอคเชื้อ ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ทำการถ่ายเชื้อ *S.* Weltevreden DMST 17375 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแนวตั้งตรง ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยวิธีการ ขีดเชื้อ (streak) ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ลงบนผิวหน้าอาหาร เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ (Brain Heart Infusion Agar, BHI Agar) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 โดยเลือกเอาโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อใน ข้อ 1 แล้วขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีที่ได้มาทำการถ่ายเชื้อด้วยวิธีการเดิมอีกเป็นครั้งที่ 3 เพื่อให้เชื้อฟื้นตัวและมีความสมบูรณ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากการถ่ายเชื้อใน ข้อ 2 มาทำการเกลี่ยเชื้อ (smear) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ผิวหน้าเอียง (slant) จำนวน 5 หลอด โดยแต่ละหลอดเลือกจาก 1 โคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง นี้ ไปทดสอบลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีของเชื้อดังนี้

(ก) ทดสอบการเลี้ยงเชื้อในอาหารคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ (selective media) เอ็กซ์ แอล ดี เอการ์ (Xylose Lysine Deoxycholate Agar, XLD Agar) โดยนำเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียงมาทำการขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร เอ็กซ์ แอล ดี เอการ์ จำนวน 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของ *S.* Weltevreden DMST 17375 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีลักษณะโคโลนีกลม ใส จุดกึ่งกลางของโคโลนีเป็นสีดำ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อสร้าง Ferrous sulfate และบริเวณรอบ ๆ โคโลนีเป็นสีชมพูใส

(ข) ทดสอบการเลี้ยงเชื้อในอาหาร บี พี แอล เอส เอการ์ (Brillient-Green Phenol red Lactose Sucrose Agar, BPLS Agar) โดยนำเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง มาทำการขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร บี พี แอล เอส เอการ์ จำนวน 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของ *S.* Weltevreden DMST 17375 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีสีแดงกลม ล้อมรอบด้วยโซนสีแดง

(ค) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อ ที่มีลักษณะของ *Salmonella* spp. มาเกลี่ยลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ผิวหน้าเอียง บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ง) ทำการเขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ผิวหน้าเอียง ที่ได้จากข้อ (ค) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร 4 ชนิด เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

- ทริเปิล ซูการ์ ไอรอน เอการ์ (Triple Sugar Iron Agar, TSI Agar) โดยการ แทงเชื้อตั้งตรง (stab) และเกลี่ยเชื้อบนผิวหน้าเอียงของอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม จำนวน 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- ยูเรีย เอการ์ (Urea Agar) โดยวิธีการเกลี่ยเชื้อ จำนวน 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- โมไทล อินโดล ไลซีน (Motile Indole Lysine, MIL) โดยการ แทงเชื้อตั้งตรง จำนวน 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

- เมทิล เรด-โวเกส โพรสเคาเออร์ (Methyl Red-Voges Proskauer, MR-VP) โดยการเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหารจำนวน 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

(จ) นำเชื้อจากข้อ (ค) มาทำการขีดเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

(ฉ) นำเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ (จ) มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อด้วยการย้อมสีกรัม

(ช) เมื่อผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ และการย้อมสีกรัม จากการทดลองในข้อ (ง) และ (ฉ) ถูกต้องตามคุณสมบัติของ *Salmonella* spp. จึงทำการถ่ายเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ ที่ทำไว้ในข้อ (จ) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นผิวหน้าเอียง จำนวน 15 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 แล้วนำไปเก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองเป็นสตอคเชื้อ ต่อไป โดยที่ต้องทำการถ่ายเชื้อจากสตอคเชื้อเหล่านี้ทุก 2 สัปดาห์

3.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารที่ใช้สำหรับการทดลอง

3.3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHIB) และการทดสอบการปนเปื้อน

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท (Brain Heart Infusion Broth, BHIB)

สำหรับ 1 ชุดการทดลอง จะเตรียมขวดทดลองทั้งหมด จำนวน 70 ขวด แต่ละขวดมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท 9 มิลลิลิตร โดย 54 ขวดจะเตรียมไว้สำหรับการทดลองใน 27 ช่วงเวลา ทำ 2 ซ้ำ และอีก 16 ขวด เตรียมสำหรับใช้ในการทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรอาหาร เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต เท่ากับ 1.2 % และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 2 % ดังนี้

Brain Heart Infusion Broth	23.31	กรัม
โซเดียมแลกเทต (60 % w/v)	12.6	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์	12.6	กรัม
น้ำกลั่น	630	มิลลิลิตร

ในกรณีที่ต้องการให้มีความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต เท่ากับ 2.4 % และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 4 % จะมีสูตรอาหาร ดังนี้

Brain Heart Infusion Broth	23.31	กรัม
โซเดียมแลกเทต (60 % w/v)	25.2	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์	25.2	กรัม
น้ำกลั่น	630	มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารที่เตรียมนั้นเย็นลง แล้วจึงนำเข้าเก็บในห้องเย็น อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส รอเวลาที่จะนำมาใช้ทดลอง

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเจือจางจุลินทรีย์ Maximum Recovery Diluent (MRD)

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเจือจางจุลินทรีย์ Maximum Recovery Diluent (MRD) จะเตรียมใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร

มีส่วนประกอบดังนี้

NaCl 0.85 %

Peptone 0.1 %

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารที่เตรียมนั้นเย็นลง แล้วจึงนำเข้าเก็บในห้องเย็น อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส รอเวลาที่จะนำมาใช้ทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง ของโซเดียมแลกเทต

โซเดียมแลกเทตที่ใช้นั้นมีความเข้มข้น 60 % w/v ทดสอบโดยใช้ปีเปตดูดโซเดียมแลกเทตปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากขวดบรรจุ ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่สะอาดจำนวน 3 ขวด ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสาร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที และภายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วก็ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารอีกครั้ง

3.3.2.2 การทดลองเพื่อหาปริมาณของเชื้อเบื้องต้น

1. การทดลองเพื่อหาปริมาณของเชื้อ *S.* Weltevreden DMST 17375 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดลองเพื่อหาปริมาณของเชื้อ *S.* Weltevreden DMST 17375 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีดังนี้

(ก) ถ่ายเชื้อ *S.* Weltevreden DMST 17375 จากสตอคเชื้อที่เตรียมไว้ ตามข้อ (ช) ในข้อ 3.3.1 โดยวิธีการขีดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขีดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ อีก 2 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน แล้วนำไปทำการทดลองตามลำดับ ดังนี้

(ก.1) เขี่ยเชื้อ *S. enterica* Weltevreden ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว จากจานอาหารที่ผ่านการขีดเชื้อ เป็นครั้งที่ 3 ในข้อ (ก) ลงเลี้ยงในขวดที่บรรจุ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด

(ก.2) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดิมในข้อ (ก.1) ไปทำการย้อมสีกรัม เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อ หากพบว่าเชื้อไม่บริสุทธิ์จะต้องยกเลิกการเลี้ยงเชื้อ และทำการถ่ายเชื้อจากสตอคเชื้อในหลอดใหม่ด้วยวิธีการดังข้อ (ก) และ (ก.1) อีกครั้ง แต่ถ้าพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ (เมื่อมองผ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่ความละเอียด 1000 เท่า พบว่าเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของ Carbon Fuchsin) จึงนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟิวชั่น บรอท ที่เตรียมได้ในข้อ (ก.1) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(ข) นำเชื้อที่ได้จากข้อ (ก.2) ทั้ง 2 ขวด มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) โดยทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) จนถึงความเจือจางสุดท้ายที่ 10^{-9} โดยก่อนทำการเจือจางในแต่ละครั้งต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่าเพื่อให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(ค) ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเชื้อจากหลอดทดลองที่ได้ทำการเจือจางจากข้อ (ข) และมีความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 10^{-9} จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกไร้เชื้อ จำนวน 2 จาน ต่อ 1 ความเข้มข้น จากนั้นใช้ปิเปตอันเดิมดูดสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นอันดับถัดไป คือความเข้มข้นที่ 10^{-8} และทำต่อไปจนถึงความเข้มข้นที่ 10^{-2} โดยทุกความเข้มข้นจะดูดสารละลายเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตร และทำจำนวน 2 จาน ต่อ 1 ความเข้มข้นเช่นกัน

(ง) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และมีอุณหภูมิไม่เกินประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงผสมกับสารแขวนลอยของเชื้อที่เจือจางแล้วให้กระจายเข้ากันโดยการเขย่าไปข้างบนและล่าง 5 ครั้ง เขย่าไปทางซ้ายและขวา 5 ครั้ง เขย่าหมุนในทิศตามเข็มนาฬิกาและทวนเข็มนาฬิกาอย่างละ 5 ครั้ง และในขณะเขย่าควรระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

(จ) ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ทำการคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

(ฉ) นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างจากข้อ (ก.1) เป็น cfu/ml

(ช) ทำตามข้อ (ก)-(ฉ) อีก 1 ครั้ง

2. การทดลองเพื่อศึกษาการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden DMST 17375 ในอาหารที่มีโซเดียมแลกเทต 3 ระดับ คือ 0 %, 1.2 % และ 2.4 % โดยไม่มีการเติมปัจจัยอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อที่จะใช้ในการทดลอง ให้ทำการเตรียม ดังข้อ 1.(ก) ถึง 1.(ก.2) ในข้อ 3.3.2.2 ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการทดลองนี้ ทำตามข้อ 1 ในข้อ 3.3.2.1 แต่จะไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และไม่มีการปรับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท โดยทำการทดลองดังนี้

(ก) นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้และทราบปริมาณเชื้อเบื้องต้นตาม ข้อ (ฉ) ของข้อ 1 ในข้อ 3.3.2.2 มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ คือ ที่ 10^4 เขย่าเชื้อในหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า จนเชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอแล้วใช้ปิเปตดูดเชื้อจากหลอดทดลอง ที่มีความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท 3 ชุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต 0 %, ชุดที่มีความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต 1.2 % และชุดที่มีความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต 2.4 % โดยแต่ละชุดประกอบด้วยขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จำนวน 48 ขวด สำหรับการศึกษา 24 ช่วงเวลา คือ ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 32, 48, 72, 96 (4 วัน) และ 264 (11 วัน) ทำ 2 ซ้ำ เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเหล่านี้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^3

(ข) เมื่อเติมเชื้อเสร็จสิ้น ให้ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องเวลา โดยขวดที่ถูกเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0 และทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อในขวดอื่น ๆ ตามช่วงเวลาที่กำหนดอีก 23 ช่วงเวลา

3.3.2.3 การศึกษาการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden DMST 17375 ในสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผันแปรปัจจัย 3 ปัจจัย คือ โซเดียมแลกเทต โซเดียมคลอไรด์ และความเป็น กรด-ด่าง อย่างละ 3 ระดับ

การทดลองนี้ประกอบด้วยปัจจัย 3 ปัจจัย และแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ คือ

1. โซเดียมแลกเทต ที่มีระดับความเข้มข้น เท่ากับ 0 %, 1.2 % และ 2.4 %
2. โซเดียมคลอไรด์ ที่มีระดับความเข้มข้น เท่ากับ 0 %, 2 % และ 4 %
3. ความเป็น กรด-ด่าง ที่มีค่า เท่ากับ 6.5, 7.0 และ 7.5

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 3^3 factorial in CRD เพราะแต่ละปัจจัยมีความสำคัญเท่า ๆ กัน จึงวางแผนการทดลองเป็นแบบ factorial experiment ซึ่งมีข้อดีคือสามารถศึกษาปัจจัยได้หลายปัจจัยในการทดลองเดียว รวมทั้งสามารถศึกษาถึงปฏิกิริยาสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ได้ ทำให้สามารถสรุปได้ชัดเจนมากขึ้น เพราะทุกหน่วยทดลองได้ถูกนำมาประมวลผล โดยหน่วยทดลองที่ทำการศึกษาคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

S. enterica Weltevreden (DMST 17375) ซึ่งเป็นหน่วยทดลองที่มาจากแหล่งเดียวกัน สายพันธุ์เดียวกัน เจริญเติบโตในสภาวะเดียวกันและเวลาเท่ากัน จัดเป็นหน่วยทดลองที่มีความสม่ำเสมอ โดยชุดการทดลองจะมีทั้งหมด 27 ชุด แสดงดังตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 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 เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท จะถูกปรับระดับของปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมด อย่างละ 3 ระดับ โดยโซเดียมแลกเทตและโซเดียมคลอไรด์จะทำการปรับในช่วงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะถูกปรับก่อนการทำการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท สำหรับการทดลองใน 1 ชุดการทดลอง จะเตรียมเป็นจำนวนทั้งหมด 70 ขวด โดย 54 ขวดจะเตรียมไว้สำหรับการทดลองใน 27 ช่วงเวลา คือ ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 30, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98 (วันที่ 4), 198 (วันที่ 8), 366 (วันที่ 15) และ 534 (วันที่ 22) ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ และอีก 16 ขวด เตรียมสำหรับใช้ในการทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ทำการทดลองดังขั้นตอนต่อไปนี้

ในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อที่จะใช้ในการทดลอง ให้ทำการเตรียม ดังข้อ 1.(ก) ถึง 1.(ก.2) ในข้อ 3.3.2.2 ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการทดลองนี้ ทำดังนี้

(ก) นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ที่เตรียมและเก็บในห้องเย็น ออกมาทำการแยกขวดสำหรับการทดลองจริง 54 ขวด เพื่อใช้ในการทดลองใน 27 ช่วงเวลา ช่วงเวลาละ 2 ซ้ำ และ อีก 16 ขวด สำหรับทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยจะติดหมายเลขขวดสำหรับที่ใช้ในการทดลองจริง เพื่อระบุลำดับที่ในการตรวจนับการเจริญ และวางทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อ เปิดแสง UV เพื่อฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่เตรียมไว้ภายในตู้

(ข) นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท อีก 16 ขวด ที่แยกไว้สำหรับทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง มาทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วบันทึก จากนั้นทดลองปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง ด้วย NaOH 2 N และ HCl 2 N ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จนได้ค่าตรงกับที่ต้องการของชุดทดลองนั้น จดบันทึกปริมาตรของกรด-ด่าง ที่ใช้ในการปรับทำการทดลองปรับ ซ้ำอีก 5 ครั้ง โดยเปลี่ยนขวดใหม่ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของปริมาตรกรด-ด่าง ที่ใช้ไปในการทดลองปรับ

(ค) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ทั้ง 54 ขวด ที่แยกไว้แล้วในข้อ (ก) ภายในตู้เขี่ยเชื้อ โดยใช้ปริมาตรของกรด-ด่างตามค่าเฉลี่ยที่ทดลองปรับได้ในข้อ (ข) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนนี้จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการทดลอง เพราะมีระดับของปัจจัยครบทั้ง 3 ปัจจัย

(ง) นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ คือ เจือจางครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) จนถึงความเจือจางสุดท้ายที่ 10^{-5} (จากความเข้มข้นของเชื้อเดิม เท่ากับ 10^{9}) จะได้ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการคือเท่ากับ 10^{4} และเขย่าจนเชื้อกระจายตัวภายในหลอดทดลอง ดีแล้ว จึงใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ที่ได้จากข้อ (ค) ทั้งหมด 54 ขวด โดยเชื้อในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{3}

(จ) เมื่อเติมเชื้อเสร็จ ให้รีบนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของเวลา โดยขวดที่เติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะถูกนำมาทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0 และทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อในขวดอื่น ๆ ตามช่วงเวลาที่กำหนด จนครบ 27 ช่วงเวลา

3.3.3 การตรวจนับการเจริญของเชื้อ

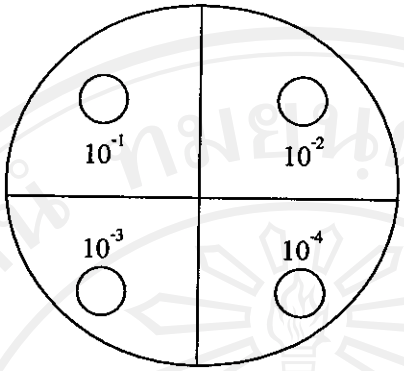
ในการทดลองนี้จะทำการตรวจนับการเจริญของเชื้อตามช่วงเวลาที่กำหนด ด้วยวิธีการ Drop Plate ดังนี้

(ก) นำเชื้อที่เลี้ยงใน เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท จากตู้บ่มอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี MRD 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับแต่ละช่วงเวลาที่ทำการตรวจนับ ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นก็ต้องทำการเจือจางเชื้อมากขึ้นด้วย เพราะว่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น หรืออาจจะสังเกตจากความขุ่นของสีอาหารเลี้ยงเชื้อ เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น บรอท ถ้าพบว่ามีความขุ่นมากก็แสดงว่ามีปริมาณเชื้อมาก จึงต้องทำการเจือจางมาก และก่อนทำการเจือจางในแต่ละครั้งจะต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า เพื่อให้เชื้อภายในหลอดทดลองกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(ข) ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเชื้อ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร จากแต่ละความเข้มข้นที่ได้จากการเจือจาง หยดลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น เอการ์ ที่แห้งแล้ว โดยผ่านการอบผิวหน้าอาหารภายในตู้บ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15-20 นาที ทำการหยดเชื้อโดยเริ่มจากที่ความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก ดังภาพ 3.1 จากแต่ละความเข้มข้นให้ทำ 2 ซ้ำ โดยการหยดลงบนจานอาหาร จำนวน 2 จาน



ภาพ 3.1 ลักษณะการหยดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Drop plate)

(ค) นำห่วงถ่ายเชื้อมาลนไฟจนร้อนแดงแล้วทิ้งให้เย็นลง มาเกลี่ยหยดเชื้อให้กระจาย

(ง) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นระหว่าง 5-50 โคโลนี คำนวณเป็นค่า log cfu/ml

(จ) นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ผ่านการตรวจนับการเจริญของเชื้อแล้ว ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วบันทึกค่าที่ได้

3.3.4 การสร้างกราฟการเจริญ และการคำนวณเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ที่ต้องการศึกษา คือ ค่า maximum growth rate (K), ค่า maximum cell population (D), ค่า lag phase duration (L) และ ค่า generation time (GT)

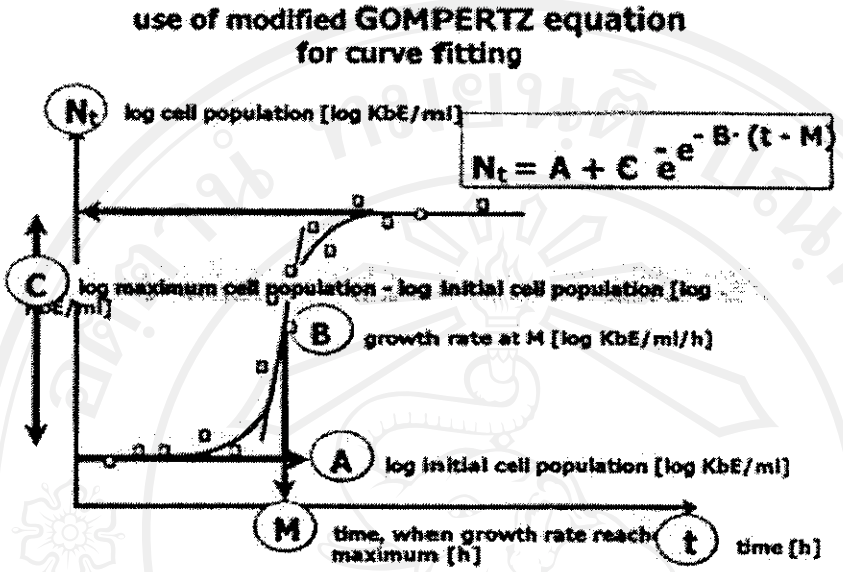
การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้จะวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป 2 โปรแกรม คือ

- โปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION
- โปรแกรม Microsoft ® Excel 2003

(ก) การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION เพื่อหาค่าของพารามิเตอร์ 4 ตัว ที่เกี่ยวข้องใน Gompertz equation โดยนำข้อมูลของปริมาณเชื้อที่ได้จากการตรวจนับการเจริญ ทั้ง 2 ซ้ำ มาวิเคราะห์ด้วย LEKSAWASDI RSS MINIMISATION ซึ่งได้กำหนดให้วิเคราะห์ด้วย Gompertz equation และกำหนดค่าของพารามิเตอร์ ที่เกี่ยวข้องพร้อม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งระบุ ช่วงต่ำสุดและสูงสุดให้แก่พารามิเตอร์แต่ละตัว ในขั้นตอนนี้จะได้ค่าของพารามิเตอร์จากการวิเคราะห์ 4 ค่า คือ A, B, C และ M



ภาพ 3.2 การหาค่าของพารามิเตอร์ A, B, C และ M ด้วย Gompertz equation

พารามิเตอร์ A และ C สามารถหาได้ด้วยวิธีการ ลากเส้นกราฟการเจริญไปตัดกับแกน Y แต่ค่าของพารามิเตอร์ B และ M ไม่สามารถหาได้ด้วยการประเมินจากกราฟ จึงใช้โปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION ในการสร้างกราฟเส้นโค้งที่สมบูรณ์ (Fitted curves) และคำนวณค่าทั้ง 4 ค่า คือ A, B, C และ M ให้

ข้อมูลที่ได้จะประกอบไปด้วยข้อมูลค่าพารามิเตอร์ A, B, C และ M ของข้อมูลทั้ง 2 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำจะมีทั้งหมด 27 ชุดข้อมูล

(ข) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft ® Excel 2003 โดยนำข้อมูลค่า A, B, C และ M ของทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งแต่ละซ้ำจะมีทั้งหมด 27 ชุดข้อมูล แต่ละชุดมาจากค่าเฉลี่ยของ 2 ซ้ำ ที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ (ก) มาสร้างสูตรคำนวณในโปรแกรม Microsoft ® Excel 2003 เพื่อให้ได้ค่า K, D, L และ GT อีก 2 ชุด และแต่ละชุดก็จะมี 27 ค่า เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรการคำนวณค่า K, D, L และ GT มีดังนี้

maximum growth rate (K) = $\frac{B*C}{e}$

maximum cell population (D) = $A + C$

lag phase duration (L) = $M - \frac{1}{B}$

generation time GT = $\frac{[\log_{10}(2)]e}{B*C}$

3.3.5 การวิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ

3.3.5.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่า K, D, L และ GT ของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ที่เจริญ ณ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS Version 10.0.1 โดยนำข้อมูลค่า K, D, L และ GT อย่างละ 2 ชุด โดยในแต่ละชุดจะมี 27 ค่า แต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ ที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.3.5 โดยประกอบด้วยการวิเคราะห์ 2 แบบ คือ

(ก) การวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างชุดข้อมูล (analysis of varience) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลของปัจจัยแต่ละตัว โดยจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน เป็นแบบ 3^3 factorial in CRD และเลือกวิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยด้วยวิธีแบบ Duncan's New Multiple Range Test

(ข) การวิเคราะห์เพื่อสร้างสมการ polynomial equation ของค่า K, D, L และ GT โดยจะทำการวิเคราะห์ multiple linear regression แบบ 3^3 factorial in CRD เพื่อให้ได้สมการ polynomial equation 4 สมการ คือ สมการของค่า K, D, L และ GT ที่แปรตาม 3 ปัจจัย คือ โซเดียมแลกเทต โซเดียมคลอไรด์ และความเป็นกรด-ด่าง แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5.2 การวิเคราะห์เพื่อสร้างสมการ polynomial equation ของค่า K, D, L และ GT จากข้อมูลการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ที่เจริญ ณ อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส

เนื่องจากมีปัจจัยเพิ่มมาอีก 1 ปัจจัย และมี 3 ระดับ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ multiple linear regression แบบ 3^4 factorial in CRD เพื่อให้ได้สมการ polynomial equation 4 สมการ คือ สมการของค่า K, D, L และ GT เพื่อทำการศึกษาขั้นต่อไป

3.3.6 การสร้างโปรแกรมทำนายการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) จากสมการ polynomial equation ของค่า K, D, L และ GT ที่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 15-35 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต 0-2.4 %, ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-2 %, ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5-7.5

ในขั้นตอนนี้จะนำสมการ polynomial equation 4 สมการ คือ สมการของค่า K, D, L และ GT ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติในข้อ 3.3.5.2 มาสร้างเป็นโปรแกรมทำนายการเจริญของ *S. enterica* Weltevreden (DMST 17375) ที่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 15-35 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต 0-2.4 %, ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-2 %, ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5-7.5 โดยการเขียนชุดคำสั่งใน Visual Basic for Application (VBA) ที่มีในโปรแกรม Microsoft® Excel 2003 วิธีการรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved