การวิเคราะห์จำนวนนับเซลล์แบคทีเรียจาก Hemacytometer ด้วยวิธีการเชิงสถิติ

The Analysis of the Bacterial Cell Counts from Hemacytometer Using Statistical Procedures

อุทัยทิพย์ ทนเถื่อน สุดารัตน์ สุวรรณชัย และวีรานันท์ พงศาภักดี*

ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

ถนนราชมรรคาใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

วิโรจน์ กนกศิลปธรรม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

ถนนราชมรรคาใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย และวิเคราะห์จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer เพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ ในอาหาร 480G, pH7.0, 0.05% NaCl ด้วยวิธีวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยข้อมูลที่ใช้ในการทำวิจัยเป็นข้อมูลที่ได้จากการทดลองนับเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (2552-2553) โดยมีปัจจัยจำแนกประเภท (categorical variables) 4 ตัวแปร คือ จำนวนนับเซลล์แบคทีเรีย (cell count) จำแนกเป็น 2 กลุ่ม อุณหภูมิ (temperature) จำแนกเป็น 8 กลุ่ม ชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (hour) จำแนกเป็น 5 กลุ่ม พื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย (area) จำแนกเป็น 2 กลุ่ม ผลการวิจัยพบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่เริ่มต้น เช่น A, B, C และ D มีค่าค่าเฉลี่ยน้อยกว่า 80 เซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.01$ ($P = 0.0001$) ดังนั้นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่เริ่มต้น เมื่อพบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับน้อยกว่า 80 เซลล์ ($\bar{x} = 31$) อาจเปลี่ยนไปนับในพื้นที่เล็กลง เช่น 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อไป สำหรับปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียจากการสร้างตัวแบบล็อกลิเนียร์ที่เหมาะสม ได้แก่ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย อุณหภูมิ ชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย และพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย ที่ $\alpha = 0.01$ ($P < 0.0001$) ส่วนการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียระหว่างอุณหภูมิระดับต่างๆ พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$ และการเปรียบเทียบจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.01$

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** veeranun@su.ac.th

และพบว่าจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 12 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียมากที่สุด

คำสำคัญ : ตัวแบบล็อกลิเนียร์ ตัวแปรจำแนกประเภท การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม การทดสอบครัสคัลวาริส

Abstract

This research aims to identify factors affecting the rate growth of bacterial cells and analyze the number of bacterial cells that are counted using Hemacytometer under 480G, pH 7.0, 0.05% NaCl. The experimental data from the department of microbiology, faculty of science Silpakorn University (2552-2553) consist of 4 variables: cell count (the number of bacterial cells) classified into 2 groups, Temperature classified into 8 groups, hour (hours incubation before counting the bacterial cells) classified into 5 groups, and area classified into 2 groups. The research results are divided into 4 parts: (1) The average number of bacterial cells that are counted before further study is found significantly less than 80, at $\alpha = 0.01$ ($P = 0.0001$). Therefore, the number of cell counts obtained from the area A, B, C and D may well be reduced from 80 to 31 cells ($\bar{x} = 31$) before further study in smaller area. (2) From the loglinear model, it is shown significantly at $\alpha = 0.01$ ($P < 0.0001$) that the factors affecting the rate growth of bacterial cells are group of cell count, temperature, hour, and area. (3) The mean of bacteria cell counts differ significantly between the temperature levels at $\alpha = 0.05$. (4) The median of bacteria cell counts differ significantly between hours of incubation in counting the bacteria cells at $\alpha = 0.1$ ($P = 0.0001$) and that the incubation period that gives the maximum cell counts is 12 hours.

Keywords: loglinear model, categorical variables, ANCOVA, Kruskal Wallis test

1. บทนำ

จุลินทรีย์ (microorganism) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงจำเป็นต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ แบคทีเรีย ราอาร์เคีย และยีสต์ โดยทั่วไปเราสามารถพบจุลินทรีย์ได้ทุกสภาวะแวดล้อม แม้แต่ในสภาวะแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตอื่นๆ อยู่ไม่ได้ แต่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถปรับตัวอาศัยอยู่ได้ เช่น ในน้ำพุร้อนบริเวณใกล้ภูเขาไฟใต้ทะเลลึก หรือภูเขาไฟธรรมดา ใต้มหาสมุทรที่มีความกดดันของน้ำสูงๆ และในน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิเย็นจัด ตลอดจนบริเวณที่มีสภาพความ เป็นกรดด่างสูง หรือแม้กระทั่งในบริเวณที่ไม่มีออกซิเจน [1] ในบรรดาสิ่งมีชีวิตทั้งหมดนั้น อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก กล่าวคือ มีความหลากหลายของสปีชีส์ หรือความหลากหลายของชนิดพันธุ์ จำนวนจุลินทรีย์ในโลกนี้มีอยู่ประมาณ 5 แสนชนิด แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 5 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย สาหร่าย ไวรัส โพรโทซัว และราชนิดต่างๆ [2]

จุลินทรีย์จำนวนมากที่มีความสำคัญในการผลิตสารต่างๆ ที่มีประโยชน์และช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการต่างๆ มีดังต่อไปนี้

การผลิตอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดที่เกิดจากการกระทำของจุลินทรีย์ ซึ่งมนุษย์เราได้ใช้ประโยชน์มาเป็นเวลานานแล้ว อาหารที่เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์เรียกว่าอาหารหมัก (fermented food) เช่น กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง ไส้กรอก เกิดจากการกระทำของแบคทีเรียที่สร้างกรดแล็กติกเป็นส่วนใหญ่ แบคทีเรียเหล่านี้อาจมีอยู่ตามธรรมชาติบนอาหารหรือเราตั้งใจใส่เชื้อนั้นลงในอาหาร ผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมหลายชนิดที่เกิดจากการกระทำของแบคทีเรีย ได้แก่ การผลิตกรดแล็กติกที่ใช้รักษาโรคขาดแคลเซียมและรักษาโรคโลหิตจาง การผลิตกรดอะมิโน โดยมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนจากสารประกอบไนโตรเจนซึ่งอาจสังเคราะห์ได้มากเกินความต้องการ จนผลิตเป็นการค้าได้ เช่น แอล-ไลซีน (L-lysine) ผลิตโดยเชื้อ *Enterobacter aerogenes* กรดแอล-กลูตามิก (L-glutamic acid) โดยแบคทีเรีย *Micrococus* หรือ *Arthrobacter* เป็นต้น

การผลิตทางการเกษตร จุลินทรีย์ในดินพวกแบคทีเรียและเห็ดราชนิดต่างๆ ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์จากซากสิ่งมีชีวิตให้เป็นสารอนินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ได้สารอาหารจากซากเหล่านั้น และนำไปใช้ประโยชน์ ขณะเดียวกันสารอินทรีย์ที่สลายเป็นสารอนินทรีย์ก็เป็นสารอาหารของพืชที่ดูดซึมไปสร้างเนื้อเยื่อพืชได้ ดังนั้นถ้าขาดจุลินทรีย์ในดินจะทำให้ดินขาดสารอาหาร และพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จุลินทรีย์ในดิน จึงเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของสารต่างๆ ในธรรมชาติ เช่น วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรซัลเฟอร์ เป็นต้น

จุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนแล้วเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนีย และพืชนำไปใช้เปลี่ยนเป็นโปรตีนในพืช [3] และจากคุณค่าและความสำคัญของจุลินทรีย์ทางด้านอาหารเกษตรและอุตสาหกรรมดังกล่าวแล้ว จะเห็นว่าจุลินทรีย์เป็นทรัพยากรที่สำคัญต่อความเป็นอยู่และความมีสุขภาพดีของมนุษย์ ซึ่งสมควรจะอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ของจุลินทรีย์ไว้มิให้สูญหาย ในธรรมชาติก็มีจุลินทรีย์ อีกมากที่ยังไม่ได้ศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ จึงควรส่งเสริมให้มีนักอนุกรมวิธานทางด้านจุลินทรีย์มากขึ้นเพื่อให้มีการสำรวจและคัดแยก (isolate) จุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ จากธรรมชาติ เก็บรวบรวมจุลินทรีย์เหล่านั้นและเก็บรักษาไว้ไม่ให้สูญหาย โดยไม่ให้มีการปนเปื้อนกับเชื้ออื่น ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรม และเชื้อนั้นยังมีชีวิตรอดอยู่ได้โดยยังคงสมบัติดั้งเดิมของเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ การเก็บรักษาจุลินทรีย์ไว้มีวัตถุประสงค์ เพื่อนำมาใช้ในการเรียนการสอนทางด้านจุลชีววิทยา ใช้ในอุตสาหกรรม ใช้ในการผลิต หรือเก็บเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์เฉพาะที่ให้ผลผลิตสูง ส่วนนักอนุกรมวิธานเก็บรักษาเชื้อที่ได้จากการคัดแยกใหม่และรวบรวมจากแหล่งอื่นๆ เพื่อนำมาเปรียบเทียบ [4]

จากความสำคัญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทั้งทางด้านอาหาร เกษตร และอุตสาหกรรม ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ว่าปัจจัยใดมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บ้าง และตรวจสอบเกณฑ์หรือวิธีการนับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลเซลล์แบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อนฝาง อุทยานแห่งชาติดอยผ้าห่มปก จังหวัดเชียงใหม่ ที่นับโดย Hemacytometer จากภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (2552-2553) สำหรับการวิเคราะห์และศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ระดับของอุณหภูมิ จำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรีย และพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย รวมถึงการวิเคราะห์ความ

แตกต่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ระหว่างระดับของอุณหภูมิต่างๆ และระหว่างพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปจะนับในพื้นที่เริ่มต้น A, B, C และ D ก่อน เมื่อพบจำนวนเซลล์แบคทีเรียในพื้นที่เริ่มต้นมากพอ เช่น 80 เซลล์ จึงจะนับในพื้นที่ที่เล็กลง 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อไป สรุปเป็น 4 ข้อ คือ

1. ศึกษาค่าเฉลี่ยจำนวนนับเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer ในพื้นที่เริ่มต้นว่าน้อยกว่า 80 เซลล์ ได้

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

3. เปรียบเทียบระดับต่างๆ ของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย

4. เปรียบเทียบจำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

การวิเคราะห์ข้อมูล ผู้วิจัยได้ตรวจสอบลักษณะข้อมูล และหาสารสนเทศจากสถิติพรรณนา การทดสอบสมมติฐานเชิงสถิติทั้งแบบใช้พารามิเตอร์และแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ และการสร้างตัวแบบล็อกลิเนียร์ (Loglinear modeling) [5, 6]

2. วิธีการและขอบเขตของการวิจัย

2.1 ข้อมูลที่ใช้ในการทำวิจัย เป็นข้อมูลที่ได้จากการทดลองการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วย Hemacytometer ซึ่งในการทดลองได้วัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ ในอาหาร 480G, pH 7.0, 0.05% NaCl

2.2 ตัวแปรที่ใช้ศึกษาประกอบด้วย

2.2.1 จำนวนเซลล์แบคทีเรีย จำแนกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย (1) น้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (ให้เป็นกลุ่ม 1) และ (2) มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml (ให้เป็นกลุ่ม 2)

2.2.2 อุณหภูมิ จำแนกเป็น 8 กลุ่ม ประกอบด้วย

- อุณหภูมิที่ 65^0C (ให้เป็นกลุ่ม 1)
- อุณหภูมิที่ 70^0C (ให้เป็นกลุ่ม 2)
- อุณหภูมิที่ 75^0C (ให้เป็นกลุ่ม 3)
- อุณหภูมิที่ 78^0C (ให้เป็นกลุ่ม 4)
- อุณหภูมิที่ 80^0C (ให้เป็นกลุ่ม 5)
- อุณหภูมิที่ 85^0C (ให้เป็นกลุ่ม 6)
- อุณหภูมิที่ 88^0C (ให้เป็นกลุ่ม 7)
- อุณหภูมิที่ 90^0C (ให้เป็นกลุ่ม 8)

2.2.3 ชั่วโมงที่นับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย จำแนกเป็น 5 กลุ่ม ประกอบด้วย

- ชั่วโมงที่ 0 (ให้เป็นกลุ่ม 1)
- ชั่วโมงที่ 3 (ให้เป็นกลุ่ม 2)
- ชั่วโมงที่ 6 (ให้เป็นกลุ่ม 3)
- ชั่วโมงที่ 9 (ให้เป็นกลุ่ม 4)
- ชั่วโมงที่ 12 (ให้เป็นกลุ่ม 5)

2.2.4 พื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย จำแนกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย

- A, B, C และ D (ให้เป็นกลุ่ม 1)
- 1, 2, 3, 4 และ 5 (ให้เป็นกลุ่ม 2)

2.3 นิยามคำศัพท์เฉพาะ

2.3.1 Hemacytometer เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในปริมาตรที่ทราบ ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียที่มีชีวิต (viable bacteria) และแบคทีเรียที่ตายแล้ว (nonviable)

2.3.2 จำนวนนับของเซลล์แบคทีเรีย หมายถึง จำนวนนับของเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer

2.3.3 จำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรีย หมายถึง เวลาเริ่มต้นของการนับเป็น 0, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง

2.3.4 พื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย หมายถึง พื้นที่ที่ใช้นับเซลล์แบคทีเรียซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ พื้นที่เริ่มต้น A, B, C และ D โดยทั่วไป เมื่อพบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่เริ่มต้นให้มากพอก่อน แล้วจึงไปนับในพื้นที่เล็กลง 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

มี 4 ตอน ดังนี้

2.4.1 ตอนที่ 1 : การวิเคราะห์เพื่อศึกษาเกณฑ์การนับเซลล์แบคทีเรียด้วย Hemacytometer ในพื้นที่ A, B, C และ D ว่าควรจะน้อยกว่า 80 เซลล์หรือไม่ โดยใช้ตัวสถิติ t-test

2.4.2 ตอนที่ 2 : การวิเคราะห์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย และการหาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย โดยตรวจสอบด้วยตัวแบบล็อกลิเนียร์ที่เหมาะสมกับข้อมูล

2.4.3 ตอนที่ 3 : การเปรียบเทียบเพื่อศึกษาระดับต่างๆ ของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย ส่วนการศึกษาว่าระดับต่างๆ ของอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียหรือไม่นั้น ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (ANCOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย จำแนกตามระดับของอุณหภูมิ

2.4.4 ตอนที่ 4 : การเปรียบเทียบจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับเซลล์แบคทีเรียที่ว่ามีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียหรือไม่นั้น ใช้ Kruskal Wallis test ทดสอบมัธยฐานจำนวนเซลล์แบคทีเรียระหว่างจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์

3. ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ SAS version 9.1 แบ่งเป็น 4 ตอน ตามลำดับของวัตถุประสงค์การวิจัย ดังนี้

3.1 ตอนที่ 1 การวิเคราะห์เพื่อศึกษาวิธีการนับเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer

การทดสอบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่กลุ่มแรก คือ A, B, C และ D ว่าน้อยกว่า 80 เซลล์หรือไม่ โดยใช้ตัวสถิติ t-test ดังตาราง 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่ A, B, C และ D น้อยกว่า 80

ค่าสถิติจากข้อมูลที่สมบูรณ์ในพื้นที่เริ่มต้น	องศาอิสระ	ค่าสถิติ t	ค่า p-value
ผลลัพธ์การทดสอบ	398	-56.14	0.0001

จากตาราง 1 พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่กลุ่มแรก A, B, C และ D น้อยกว่า 80 เซลล์ อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.01 โดยพิจารณาจาก p-value หรือค่า Sig. (แบบทางเดียว) ที่เท่ากับ 0.0001/2 = 0.00005 ซึ่งน้อยกว่าค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01

3.2 ตอนที่ 2 การวิเคราะห์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย

จากการสร้างตัวแบบล็อกลิเนียร์ต่างๆ ทั้งหมดที่เป็นไปได้ โดยนำตัวแปรที่สนใจศึกษาและตัวแปรจำนวนเซลล์แบคทีเรียมาวิเคราะห์ พบว่าสามารถเลือกตัวแบบล็อกลิเนียร์ที่เหมาะสมกับข้อมูล

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 จำนวน 2 ตัวแบบ (นอกนั้นตัวแบบไม่เหมาะสม) คือ

$$\log(m_{ijk}) = u + u_i^{cell\ count} + u_j^{temp} + u_k^{hour} + u_l^{area} + u_{ij}^{cell\ count*temp} + u_{ik}^{cell\ count*hour} + u_{il}^{cell\ count*area} + u_{jk}^{temp*hour} + u_{jl}^{temp*area} + u_{kl}^{hour*area} + u_{ijk}^{cell\ count*temp*hour} + u_{ijl}^{cell\ count*temp*area} + u_{jkl}^{temp*hour*area} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

$$\log(m_{ijk}) = u + u_i^{cell\ count} + u_j^{temp} + u_k^{hour} + u_l^{area} + u_{ij}^{cell\ count*temp} + u_{ik}^{cell\ count*hour} + u_{il}^{cell\ count*area} + u_{jk}^{temp*hour} + u_{jl}^{temp*area} + u_{kl}^{hour*area} + u_{ijk}^{cell\ count*temp*hour} + u_{ijl}^{cell\ count*temp*area} + u_{jkl}^{temp*hour*area} + u_{ikl}^{cell\ count*hour*area} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

เมื่อ i =1, 2

j = 1, 2, 3, …, 8

k = 1, 2, 3, 4, 5

l = 1, 2

โดย m_{ijkl} แทน ความถี่ของค่าคาดหมายของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i อุณหภูมิกลุ่มที่ j ชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k และพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ l

u แทนค่าเฉลี่ยทั้งหมดของ log (m_{ijkl})

$u_i^{cell\ count}$ แทนอิทธิพลของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i

u_j^{temp} แทนอิทธิพลของอุณหภูมิกลุ่มที่ j

u_k^{hour} แทนอิทธิพลของชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k

u_l^{area} แทนอิทธิพลของพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ 1

$u_{ij}^{cell\ count*temp}$ แทนอิทธิพลร่วมของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i กับอุณหภูมิกลุ่มที่ j

$u_{ik}^{cell\ count*hour}$ แทนอิทธิพลร่วมของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i กับชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k

$u_{il}^{cell\ count*area}$ แทนอิทธิพลร่วมของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i กับพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ l

$u_{jk}^{temp*hour}$ แทนอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิกลุ่มที่ j กับชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k

$u_{jl}^{temp*area}$ แทนอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิกลุ่มที่ j กับพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ l

$u_{kl}^{hour*area}$ แทนอิทธิพลร่วมของชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k กับพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ l

$u_{ijk}^{cell\ count*temp*hour}$ แทนอิทธิพลร่วมของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ I อุณหภูมิกลุ่มที่ j และชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k

$u_{ijl}^{cell\ count*temp*area}$ แทนอิทธิพลร่วมของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i อุณหภูมิกลุ่มที่ j และพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ l

$u_{ikl}^{cell\ count*hour*area}$ แทนอิทธิพลร่วมของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ i ชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ k และพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรียกลุ่มที่ l

การตรวจสอบภาวะสารูปดี (goodness of fit) ของตัวแบบล็อกลิเนียร์ (1) และ (2) ดังตาราง 2

ตาราง 2 ค่า Deviance ของตัวแบบล็อกลิเนียร์

ตัวแบบ	DF	ค่า Deviance
ตัวแบบ (1)	32	677.1851
ตัวแบบ (2)	28	341.1862

จากตาราง 2 ค่าผลต่างของ Deviance (Δ Dev) ของตัวแบบ (1) และ (2) เท่ากับ 677.1851-341.1862 = 335.9989 ซึ่งมากกว่า $\chi^2_{4,0.01}$ = 13.2767 จึงปฏิเสธ H_0 หรือตัวแบบ (1) และเลือกตัวแบบ (2) ที่มีความเหมาะสมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 เมื่อนำตัวแบบ (2) มาหาค่าประมาณของพารามิเตอร์ ซึ่งให้ส่วนหนึ่งของผลลัพธ์ของตัวประมาณพารามิเตอร์ของตัวแบบล็อกลิเนียร์ ดังตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนหนึ่งของค่าประมาณพารามิเตอร์และตัวสถิติที่เกี่ยวข้องของตัวแบบล็อกลิเนียร์

Parameter	i	j	k	l	DF	Estimate	Standard Error	Likelihood Ratio 95% Confidence Limits		Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept				1	1	0.0038	0.9981	-1.9525	1.9600	0.00	0.9970
cellcount*temp	1	1			1	-38.2913	5.2213	-48.5248	-28.0577	53.78	<.0001
cellcount*temp	1	2			1	-38.4128	3.2516	-44.7859	-32.0398	139.56	<.0001
cellcount*temp	1	3			1	-38.5957	3.6873	-45.8227	-31.3688	109.56	<.0001
cellcount*temp	1	4			1	-38.4273	4.5537	-47.3523	-29.5022	71.21	<.0001
cellcount*temp	1	5			1	-40.3587	11.0909	-62.0964	-18.6210	13.24	0.0003
cellcount*temp	1	6			1	-39.4861	5.6266	-50.5140	-28.4582	49.25	<.0001
cellcount*temp	1	7			1	-18.3883	0.9981	-20.3446	-16.4320	339.41	<.0001
cellcount*hour	1		4		1	-17.5396	0.9981	-19.4958	-15.5833	308.80	<.0001

จากตาราง 3 ปัจจัยต่างๆ ของตัวแบบที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 ($P < 0.01$) สามารถตีความผลลัพธ์เกี่ยวกับค่าของ Odds ratios ต่างๆ ได้ดังนี้

จาก cellcount *temp (1,1) = log odds ratio = -38.2913 ดังนั้น Odds ratio = 2.35×10^{-17} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 65^{0}C จะเป็น 2.35×10^{-17} เท่าของที่อุณหภูมิ 70^{0}C

จาก cellcount *temp (1,2) = log odds ratio = -38.4128 ดังนั้น Odds ratio = 2.08×10^{-17} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 70^{0}C จะเป็น 2.08×10^{-17} เท่าของที่อุณหภูมิ 75^{0}C

จาก cellcount *temp (1,3) = log odds ratio = -38.5957 ดังนั้น Odds ratio = 1.73×10^{-17} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์

แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 75^{0}C จะเป็น 1.73×10^{-17} เท่าของที่อุณหภูมิ 78^{0}C

จาก cell*temp (1,4) = log odds ratio = -38.4273 ดังนั้น Odds ratio = 2.05×10^{-17} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 78^{0}C จะเป็น 2.05×10^{-17} เท่าของที่อุณหภูมิ 80^{0}C

จาก cellcount *temp (1,5) = log odds ratio = -40.3587 ดังนั้น Odds ratio = 2.97×10^{-18} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 80^{0}C จะเป็น 2.97×10^{-18} เท่าของที่อุณหภูมิ 85^{0}C

จาก cellcount *temp (1,6) = log odds ratio = -39.4861 ดังนั้น Odds ratio = 7.10×10^{-18} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 85^{0}C จะเป็น 7.10×10^{-18} เท่าของที่อุณหภูมิ 88^{0}C

จาก cellcount *temp (1,7) = log odds ratio = -18.3883 ดังนั้น Odds ratio = 1.03×10^{-8} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่กลุ่มน้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) ที่อุณหภูมิ 88^{0}C จะเป็น 1.03×10^{-8} เท่าของที่อุณหภูมิ 90^{0}C

จาก cellcount *hour (1,4) = log odds ratio = -17.5396 ดังนั้น Odds ratio = 2.41×10^{-8} หมายความว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่น้อยกว่า 13,800,000 เซลล์/ml (เมื่อเทียบกับกลุ่ม จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มากกว่าหรือเท่ากับ 13,800,000 เซลล์/ml) เมื่อนับชั่วโมงที่ 9 จะเป็น 2.41×10^{-8} เท่าของเมื่อนับชั่วโมงที่ 12

3.3 ตอนที่ 3 การวิเคราะห์เพื่อศึกษาระดับต่างๆ ของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย

3.3.1 ขั้นตอน 3.1 เป็นการตรวจสอบการแจกแจงปกติของข้อมูลจำนวนเซลล์แบคทีเรีย โดยพิจารณาจากสถิติทดสอบ Kolmogorov-Smirnor test พบว่าค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov เท่ากับ 0.187 และให้ค่า p-value 0.011 > 0.01 หมายความว่าข้อมูลจำนวนเซลล์อาจไม่มีการแจกแจงปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 จึงแปลงข้อมูลในขั้นตอน 3.2 ต่อไป

3.3.2 ขั้นตอน 3.2 จากขั้นตอน 3.1 ที่พบว่าข้อมูลไม่ได้มีการแจกแจงปกติ จึงอาจแปลงข้อมูลโดยใช้ natural log แล้วตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลใหม่ โดยพิจารณาจากสถิติ Kolmogorov-Smirnor test อีกครั้งหนึ่ง ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov เท่ากับ 0.116 และค่า p-value เท่ากับ 0.010 ซึ่งเท่ากับระดับนัยสำคัญ 0.01 ดังนั้นข้อมูลจำนวนเซลล์แบคทีเรียเมื่อแปลงด้วย natural log มีการแจกแจงโดยประมาณแบบปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ซึ่งสอดคล้องกับข้อสมมติทางทฤษฎีของวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (ANCOVA) ต่อไปในขั้นตอน 3.3

3.3.3 ขั้นตอน 3.3 จากขั้นตอน 3.2 เมื่อพบว่าข้อมูลจำนวนเซลล์แบคทีเรียเมื่อแปลงข้อมูลด้วย natural log มีการแจกแจงปกติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้

การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่แปลงข้อมูลด้วย natural log จำแนกตามระดับของอุณหภูมิโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (ANCOVA) โดยใช้ตัวแปรร่วมคือจำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเป็นตัวแปรที่ส่งผลกระทบหรือมีความเกี่ยวพันกับจำนวนเซลล์แบคทีเรียดังที่ได้พบจากตัวแบบล็อกลิเนียร์ ผลการวิเคราะห์พบว่ามีค่า p-value เท่ากับ 0.018 ซึ่งน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 นั้นหมายความว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียเมื่อแปลงข้อมูลด้วย natural log จำแนกตามระดับของอุณหภูมิมีค่าแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

3.4 ตอนที่ 4 การวิเคราะห์เพื่อศึกษาจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย

จากการตรวจสอบการแจกแจงปกติของข้อมูลดิบ คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยสถิติ Kolmogorov-Smirnor test ในขั้นตอนที่ 3.1 พบว่าข้อมูลจำนวนเซลล์แบคทีเรียอาจไม่มีการแจกแจงปกติเช่นนี้ ทางเลือกในการวิเคราะห์เพื่อศึกษาจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียหรือไม่ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้การทดสอบสมมติฐานเชิงสถิติแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่ามัธยฐานของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย จำแนกตามจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า ที่จำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียเมื่อเวลาเริ่มต้นของการนับเป็น 12 ให้ค่าเฉลี่ยของอันดับสูงที่สุด คือ 131.47 รองลงมาคือที่จำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียเมื่อเวลาเริ่มต้นของการนับเป็น 9 เท่ากับ 116.77 และจำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียเมื่อเวลาเริ่มต้นของการนับเป็น 0 ให้ค่าเฉลี่ยของอันดับต่ำที่สุด เท่ากับ 24.55 และผลการทดสอบความแตกต่างระหว่างมัธยฐานของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย จำแนกตามจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วย Kruskal Wallis test พบว่ามีค่า p-value 0.0001 < 0.01 นั้นหมายความว่า มัธยฐานของจำนวนเซลล์แบคทีเรียจำแนกตามจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียมีค่าแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ดังนั้นจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อจึงมีผลต่อจำนวนเซลล์แบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยสรุปได้ 4 ประเด็น คือ

4.1 ในการตรวจสอบวิธีการนับเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer ด้วยสถิติ t-test ว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยเฉลี่ยที่นับในพื้นที่ A, B, C และ D น้อยกว่า 80 เซลล์หรือไม่ พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่ A, B, C และ D มีค่า 31.15 เซลล์ หรือมีค่าน้อยกว่า 80 เซลล์ อย่างมีนัยสำคัญที่ α = 0.01 ดังนั้นเมื่อพบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่ A, B, C และ D มากกว่า 31 เซลล์ อาจเปลี่ยนไปนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียในพื้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อไป

4.2 ในการตรวจสอบว่าปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียมีปัจจัยใดบ้างด้วยตัวแบบล็อกลิเนียร์ พบว่าปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วยอิทธิพลหลักได้แก่ กลุ่มของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (cell count) อุณหภูมิ (temp) จำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรีย (hour) และพื้นที่ที่นับเซลล์แบคทีเรีย (area) และอิทธิพลร่วมต่างๆ ได้แก่ (cell count)(temp), (cell count)(hour), (cell count)(area), (temp)(hour),

(temp)(area), (hour)(area), (cell count)(temp)(hour), (cell count)(temp)(area) และ (temp)(hour)(area) โดยตัวแบบมีความเหมาะสมกับข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01

4.3 การเปรียบเทียบระดับต่างๆ ของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียเมื่อแปลงข้อมูลด้วย natural log จำแนกตามระดับของอุณหภูมิมีค่าแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

4.4 การเปรียบเทียบผลระหว่างจำนวนชั่วโมงที่ใช้บ่มเชื้อก่อนนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียด้วยสถิติแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ พบว่ามัธยฐานของจำนวนเซลล์แบคทีเรียเมื่อแปลงข้อมูลด้วย natural log มีค่าแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 โดยจำนวนชั่วโมงที่นับเซลล์แบคทีเรียเมื่อเวลาเริ่มต้นของการนับเป็น 12 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียมากที่สุด

5. ข้อเสนอแนะจากงานวิจัย

จากผลการวิจัยนี้ ข้อมูลการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับโดย Hemacytometer ถ้ามีข้อมูลทดลองที่สมบูรณ์ไม่มากพอ ในทุกตัวแปรการเปรียบเทียบอาจใช้สถิติแบบใช้พารามิเตอร์ทั้งหมด แต่ถ้ามีข้อมูลทดลองที่สมบูรณ์มากพอของทุกตัวแปรหรือมากขึ้นกว่าเดิม อาจเลือกวิธีวิเคราะห์ข้อมูลภายใต้การแจกแจงปกติได้ ส่วนการนับเซลล์แบคทีเรียในพื้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 อาจนับเมื่อพบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับในพื้นที่ A, B, C และ D มีค่าน้อยกว่า 80 เซลล์ โดยจำนวนที่นับได้อาจมากกว่า 31 เซลล์

6. เอกสารอ้างอิง

[1] บริษัท พีซีเอส พรอส จำกัด, 2552, จุลินทรีย์, แหล่งที่มา : http://gagabionano.igetweb.com, 14 มีนาคม 2554.

[2] โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหนังสือและโฮมเพจ, ชุดพัฒนาสังคมตามแนวพระราชดำริ ศูนย์ศึกษาตามแนวพระราชดำริ, 2543. การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของจุลินทรีย์, แหล่งที่มา : http://www.swu.ac.th/royal/book2/b2c11t3.html, 14 มีนาคม 2554.

[3] โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหนังสือและโฮมเพจ, ชุดพัฒนาสังคมตามแนวพระราชดำริ ศูนย์ศึกษาตามแนวพระราชดำริ, 2543. ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์, แหล่งที่มา : http://www.swu.ac.th/royal/book2/b2c11t1.html, 14 มีนาคม 2554.

[4] โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหนังสือและโฮมเพจ, ชุดพัฒนาสังคมตามแนวพระราชดำริ ศูนย์ศึกษาตามแนวพระราชดำริ, 2543. ความสำคัญของจุลินทรีย์, แหล่งที่มา : http://www.swu.ac.th/royal/book2/b2c11t2.html, 14 มีนาคม 2554.

[5] Agresti, A., 2002, Categorical Data Analysis, 2nd Ed, John Wiley & Sons, Inc., New York. 710 p.

[6] วีรานันท์ พงศาภักดี, 2544, การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงกลุ่ม: ทฤษฎีและการประยุกต์ (กับ GLIM และ SPSS/FW), พิมพ์ครั้งที่ 2, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม, 311 น.