บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบในงานวิจัยประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 1 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับดังนี้

1. *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.กัญชลี เจติย์ยานนท์ อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งคัดแยกได้จาก ดินบริเวณรอบรากของผักกาดกวางตุ้ง ตำบลบึงพระ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก จากนั้นได้ส่งจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีตรวจสอบ 16S rDNA ที่ห้องปฏิบัติการวิจัย มหาวิทยาลัย Auburn รัฐ Alabama ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Prof. Kloepper

2. *Escherichai coli* สายพันธุ์ DH5α ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.คำรพ รัตนสุต อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร เป็นเชื้อที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) สำหรับการเพิ่มจำนวนพลาสมิดในงาน DNA cloning

ตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิจัย

ดินที่ใช้ทดสอบเป็นดินตะกอนท้องน้ำลำห้วยคลิตี้ ตำบลชะแล อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี ความลึกจากพื้นดินช่วง 8 – 12 เซนติเมตร จุดเก็บตัวอย่าง NU 5 เป็นตำแหน่งบริเวณหมู่บ้านคลิตี้ล่าง ใต้โรงแต่งแร่ประมาณ 12 กิโลเมตร ส่วนจุดเก็บตัวอย่าง NU 4.3 เป็นตำแหน่งบริเวณเหนือเขื่อนหินทิ้ง ใต้โรงแต่งแร่ 8 กิโลเมตร

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Atomic Absorption Spectrophotometry (GBC,Avanta PM)
2. Spectrophotometer (HACH,DR 4,000 U)
3. เครื่องเขย่าแบบหมุนวน (NESLAB, EX-600)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Biofuge)
5. เครื่องชั่งสาร ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, AG 104)

6. เครื่องวัด pH (Mettler Toledo, MPC 227)
7. หม้อนึ่งความดันไอ (Tomy, SS-325)
8. ตู้เขี่ยเชื้อ
9. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, BE 600)
10. ตู้อบอุณหภูมิสูง (Sheldon, SL 1350)
11. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (SUNTEX, 560)
12. กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS, CH-2)
13. เตาให้ความร้อน
14. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ทดลองต่างๆ เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ และหลอดทดลอง เป็นต้น
15. Micropipette 1000 และ 20 ไมโครลิตร (GILSON)
16. กระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (Ajax Finechem)
2. ตะกั่วไนเตรท ($Pb(NO_3)_2$) (Analytical Reagent Rankem)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (Lab-Scan)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Medium (Difco)
5. Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) (LOBA Chemie)
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Lab-Scan)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Lab-Scan)
8. กรดไนตริก (HNO_3) (Lab-Scan)
9. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

แผนการทดลอง

1. การทดสอบระดับความสามารถในการทนต่อพิษตะกั่ว

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* RS 91 ให้อยู่ในระยะ early log phase (ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^6 CFU/mL) ทดสอบความสามารถในการทนต่อพิษตะกั่วที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (200, 400, 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร) และที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป (1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยดูดเชื้อมาปริมาตร 120 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุ

ป
TP
245
.L4
ป45ก
2551
ท 5544009
28 ส.ค. 2554
สำนักหอสมุด

อาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่ผสมกับตะกั่วไนเตรท ($(Pb(NO_3)_2$) จนได้ระดับความเข้มข้นของตะกั่วตามที่กำหนด ปริมาตรของอาหารเหลว TSB ที่ผสมกับตะกั่วไนเตรทในแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 30 มิลลิลิตร โดยปรับ pH เท่ากับ 6 และดูดเชื้อแต่ละชนิด 120 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว TSB ที่ไม่ได้ผสมกับตะกั่วไนเตรทด้วยเพื่อเป็นตัวควบคุม จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วต่ำกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยนำเชื้อในอาหารเหลวมา cross streak plate ส่วนที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยนับจำนวนเซลล์เทียบกับชุดควบคุมด้วยวิธี drop plate method

2. **การทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย**

การทดสอบคุณสมบัติการสะสมตะกั่วภายในเซลล์เริ่มต้นจากเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 และ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ทั้งสองสายพันธุ์ให้อยู่ในระยะ early log phase ดูดเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว Luria-Bertani Medium (LB medium) เตรียมความเข้มข้นอาหาร 2 เท่า ที่ผสมกับตะกั่วไนเตรทจนได้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแต่ละความเข้มข้นนั้นทำการปรับค่า pH ที่ระดับ 5, 7 และ 8 นอกจากนี้ดูดเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงอาหารเหลว LB medium ที่ไม่ได้ผสมกับตะกั่วแต่ทำการปรับ pH ที่ระดับ 5, 7 และ 8 เช่นเดียวกันกับอาหารเหลว LB medium ที่ผสมกับตะกั่วเพื่อใช้เป็นการทดสอบควบคุม โดยก่อนที่จะลงเชื้อทดสอบเก็บตัวอย่างอาหารเหลว LB medium ที่ผสมกับตะกั่วเพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วเริ่มต้นในแต่ละระดับความเข้มข้นและระดับ pH ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่า pH และตรวจสอบจำนวนเซลล์รอดชีวิตด้วยวิธี drop plate technique แล้วทำการเก็บตัวอย่างโดยนำปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็ว 13,000*g* เวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่เหลือ จากนั้นส่วนตะกอนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ล้างด้วย 0.2 M EDTA 2 ครั้ง โดยเก็บส่วนน้ำใสแต่ละครั้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่ถูกดูดซับบริเวณผิวเซลล์ (Boyer and Hu, 1996) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง เก็บส่วนของตะกอนออกจากหลอดปั่นเหวี่ยง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตะกอนไปชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้ง (dry weight) สุดท้ายนำไปย่อยด้วยกรดร้อนผสม HNO_3: HCl (อัตราส่วน 1:3) แล้วเก็บตัวอย่างหลังการย่อยเพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่สะสมอยู่ในเซลล์ ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละขั้นตอนนำไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วยเครื่อง Atomic Absorption spectrophotometry (AAS)

3. **การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตะกั่วภายในเซลล์**

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในแต่ละขั้นตอนด้วยเครื่อง Atomic Absorption spectrophotometry (AAS) สภาวะที่พบว่ามีร้อยละการสะสมตะกั่วภายในเซลล์สูงที่สุดจะเป็นสภาวะที่ถูกนำไปใช้ในการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์จากดินตะกอนท้องน้ำในขั้นตอนต่อไป

4. **ทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์แบคทีเรียจากดินตะกอนท้องน้ำลำห้วยคลิตี้ จุดเก็บตัวอย่าง NU 5 และ NU 4.3 ที่ระดับความลึก 8-12 เซนติเมตร**

ขั้นตอนการทดสอบนั้นเตรียมตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 แบบ ที่ระดับ pH 5 และ 7.5 โดยใช้เป็นตัวทดสอบ 1 แบบ และชุดควบคุม 2 แบบ ดังนี้

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับชุดทดสอบ

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ความเข้มข้น 2 เท่า ผสมกับดินตะกอนจุดเก็บตัวอย่าง NU 5 และ NU 4.3

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับชุดควบคุมเชิงบวก

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ความเข้มข้น 2 เท่า ผสมกับตะกั่วไนเตรท (positive control)

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับชุดควบคุมเชิงลบ

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ความเข้มข้น 2 เท่า ที่ไม่ได้ผสมตะกั่ว (negative control)

ในการทดสอบดูด เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 และ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละแบบ 120 ไมโครลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำไปวัดค่า pH จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยนำปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็ว 13,000*g* เวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่เหลือ จากนั้นส่วนตะกอนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ล้างด้วย 0.2 M EDTA 2 ครั้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง เก็บส่วนของตะกอนออกจากหลอดปั่นเหวี่ยง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตะกอนไปชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้ง (dry weight) สุดท้ายนำไปย่อยด้วยกรดร้อนผสม HNO_3: HCl (อัตราส่วน 1:3) แล้วเก็บตัวอย่างจากการย่อยไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่สะสมภายในเซลล์ด้วยเครื่อง AAS

วิธีการทดลองทางเคมี

1. **การย่อยด้วยกรดร้อนผสม** HNO_3: HCl

วิธีการ ดัดแปลงจากวิธีของ Tam and Yao (1999) เติมกรดผสม HNO_3: HCl (อัตราส่วน 1:3) 10 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่างเชื้อหลังจากผ่านการอบ นำไปแช่ในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นลงแล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ปรับปริมาตรของเหลวที่กรองได้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว

2. **การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วยเครื่อง** AAS

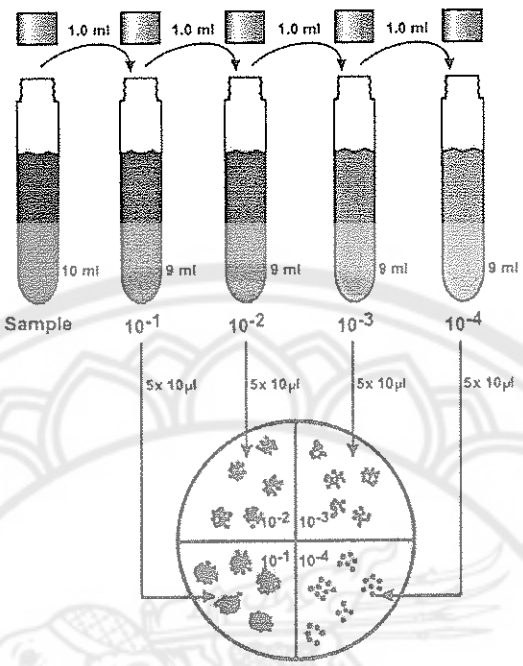
วิธีการ วัดระดับความเข้มข้นของตะกั่วของตัวอย่างด้วย เครื่อง AAS ที่ความยาวคลื่น 283.3 นาโนเมตร โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของตะกั่ว

วิธีการทดลองทางจุลินทรีย์

1. **การตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี** drop plate method

วิธีการ วิธีนี้มีหลักการเหมือนกันกับ spread plate โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนจานอาหารหนึ่งจานต่อ 5 จุด โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ตัวอย่างจะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร (ภาพ 2) ซึ่งโดยปกติจะมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของแต่ละจุดระหว่าง 1.5 ถึง 3 เซนติเมตร การนับและคำนวณจำนวนโคโลนีขึ้นอยู่กับจำนวนหยดต่อจานอาหาร จำนวนหยดต่อมิลลิลิตร และค่าการเจือจาง (dilution factor) โดยทั่วไปเมื่อบ่มจนเชื้อเจริญแล้วให้เลือกจานอาหารที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมคือมีเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารแต่ละจุดไม่เกิน 10 โคโลนี เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจางนำมาหาค่าเฉลี่ยก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมตัวอย่าง (Herigstad, Hamilton and Heersink)

วิธีคำนวณ [(ผลรวมจำนวนโคโลนี/จำนวนจุดหยด) x ส่วนกลับระดับความเจือจางที่ทำการนับ (dilution factor)] / ปริมาตรของเชื้อที่ทำการหยด (0.01 มิลลิลิตร)



ภาพ 2 แสดงวิธีการตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย drop plate method

ที่มา: Herigstad, Hamilton and Heersink, 2001

2. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมตะกั่ว**

วิธีการ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB medium ที่ใช้ในการทดสอบระดับความสามารถในการทนต่อตะกั่ว เตรียมโดยปิเปตตะกั่วไนเตรทจาก stock solution ที่ปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่ปราศจากเชื้อ) จนได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการจากการคำนวณการเจือจาง เมื่อเติมตะกั่วลงในอาหาร TSB medium แล้วจะเกิดตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น ให้นำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมตะกั่วดังกล่าวไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เพื่อให้ตกตะกอน แล้วส่วนของสารละลายจะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ซึ่งใช้ในการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ เตรียมโดยปิเปตตะกั่วไนเตรทจาก stock solution ที่ปราศจากเชื้อ ที่ความเข้มข้น 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จนได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการจากการคำนวณการเจือจาง เมื่อเติมตะกั่วลงในอาหาร LB medium แล้วจะไม่เกิดตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นเหมือนกับอาหาร TSB medium จึงสามารถนำไปใช้ในการทดสอบได้โดยไม่ต้องทำการปั่นเหวี่ยง

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ที่ใช้ในการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์แบคทีเรียจากดินตะกอนท้องน้ำลำห้วยคลิตี้ ชุดทดสอบนั้น เตรียมโดยชั่งดินตะกอนท้องน้ำปริมาณ 0.2 กรัมและ 1 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเทอาหารเหลว LB medium เตรียมความเข้มข้นอาหาร 2 เท่า ปรับ pH เท่ากับ 5 และ 7.5 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดรูปชมพู่ที่มีดินตะกอนขวดละ 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที 20 นาที (ใช้หลอด centrifuge ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ) เก็บส่วนน้ำใสของแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมาแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 30 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 ขวด โดยแยกสำหรับทดสอบกับเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 และ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α อย่างละ 3 ขวด ส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วเริ่มต้นต่อไป

สุดท้ายอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ที่ใช้ในการทดสอบการสะสมตะกั่วภายในเซลล์แบคทีเรียจากดินตะกอนท้องน้ำลำห้วยคลิตี้ สำหรับชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) เตรียมโดยชั่งอาหารเหลว LB medium เตรียมความเข้มข้นอาหาร 2 เท่า ปรับ pH เท่ากับ 5 และ 7.5 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ขวด pH 5 เติมตะกั่วไนเตรทให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนขวด pH 7.5 เติมตะกั่วไนเตรทให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (คำนวนให้มีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณตะกั่วที่วิเคราะห์ได้จากปริมาณตะกั่วเริ่มต้นในดินตะกอนที่ทดสอบ) อาหารผสมตะกั่วแต่ละ pH แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 30 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 ขวด โดยแยกสำหรับทดสอบกับเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 และ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α อย่างละ 3 ขวด ส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วเริ่มต้นต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. ทดสอบความแตกต่างของการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 และ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตัวอย่าง Independent Samples T- Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. ทดสอบความแตกต่างของการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 ที่ pH 5, 7 และ 8 โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน F-test และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ sheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ทดสอบความแตกต่างของการสะสมตะกั่วภายในเซลล์ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 ที่ระดับความเข้มข้นตะกั่วเริ่มต้น 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน F-test และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ sheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์