



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ คุณสมบัติของโพรไบโอติกส์และการเปรียบเทียบความสามารถยับยั้งแบคทีเรีย
ก่อโรคและไม่ก่อโรคทางผิวหนังระหว่างสายพันธุ์ทางคลินิกและโพรไบโอติกส์อ้างอิง

Examination of probiotic properties and comparison of skin
anti-bacterial activities between clinical and reference probiotic isolates

ชื่อนิสิต นางสาวชลัญญา ภูมิภาค เลขประจำตัว 5832311623

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ	การตรวจสอบคุณสมบัติโทรไปโอติกส์และเปรียบเทียบการยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรคและไม่ก่อโรคทางผิวหนังระหว่างเชื้อแบคทีเรียทางคลินิกและอ้างอิง
โดย	นางสาวชัญญา ภูมิภาค รหัสนิสิต 5832311623
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ
ปีการศึกษา	2561


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาค้นคว้าหลักสุตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

 หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวานิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

 กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ชนาภัทร ปาลกะ)

 กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิดา วีรกุล)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ประจำปีการศึกษา 2561

คุณสมบัติของโพรไบโอติกส์และการเปรียบเทียบความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
และไม่ก่อโรคทางผิวหนังระหว่างสายพันธุ์ทางคลินิกและโพรไบโอติกส์อ้างอิง

ผู้ดำเนินการ

นางสาว ชลัญญา ภูมิภาค รหัสประจำตัวนิสิต 5832311623

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของ
หลักสูตรการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต
ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประจำปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ คุณสมบัติของโพรไบโอติกส์และการเปรียบเทียบความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
 และไม่ก่อโรคทางผิวหนังระหว่างสายพันธุ์ทางคลินิกและโพรไบโอติกส์อ้างอิง
 นิสิตเสนอโครงการ นางสาว ชลัญญา ภูมิภาค

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

ผิวหนังมีหน้าที่สำคัญในการรักษาอุณหภูมิและป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อม รวมทั้งจุลินทรีย์ รุกราน อย่างไรก็ตามผิวหนังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ต่างๆ โดยสังคมจุลินทรีย์บนผิวสามารถเปลี่ยนแปลงได้จากหลากหลายปัจจัย อาทิ อายุ เพศ อาหาร ภูมิอากาศ และพันธุกรรม ซึ่งการเสียดุลของ จุลินทรีย์บนผิวเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความผิดปกติบนผิวหนังและก่อให้เกิดโรคตามมา ปัจจุบันได้มีงานวิจัย รายงานว่าโพรไบโอติกส์สามารถส่งเสริมสุขภาพทางผิวหนัง เช่น ความสัมพันธ์ของโพรไบโอติกส์และการลด ระดับความรุนแรงของโรคภูมิแพ้ผิวหนังจากการตอบสนองต่อ *S. aureus* ความสามารถของโพรไบโอติกส์ ในการควบคุมการเกิดสิว ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus fermentum* รวมทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์ ซึ่งคัดแยกมาจากผิวหนังและน้ำนมแม่เพื่อนำมาพิสูจน์คุณสมบัติของ โพรไบโอติกส์ ได้แก่ ความสามารถในการทนกรด (pH 3) ทนน้ำดีและความสามารถในการเจริญที่สภาวะจริง บนผิวหนัง (pH 5) เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงรวมทั้งศึกษาลักษณะทางสัณฐาน และเปรียบเทียบความสามารถ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรคบนผิวหนัง ได้แก่ *S. epidermidis*, *S. aureus* และ *Propionibacterium acne* ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 , 10^8 และ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตรด้วยเทคนิค agar disc diffusion ผลการทดสอบการทนกรดพบว่า สายพันธุ์ทางคลินิก *Lactobacillus casei* NL 60 และสายพันธุ์ อ้างอิง *Lactobacillus acidophilus* มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 3 มากที่สุด โดยมีอัตราการอยู่รอด 95.27% และ 97.5% ตามลำดับ และ *L. casei* NL 60 และสายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* มีอัตราการอยู่รอด จากการทนน้ำดี 88.57 และ 32.94 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการรอดในการทดสอบในการเจริญที่ สภาวะผิว (pH5) ที่ร้อยละ 83.94 – 107.17 ส่วนการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียพบว่า *L. casei* lac 44, *L. rhamnosus* lac 43 และ NL58 ที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญของ *P. acne* แต่ไม่ยับยั้ง *S. epidermidis* และ *L. casei* สายพันธุ์อ้างอิงสามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* และ *P. acne* แต่ไม่ยับยั้ง *S. epidermidis* เช่นกัน ทั้งนี้การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย คาดว่าเป็นเพราะ กรดอินทรีย์ หรือ bacteriocins ที่โพรไบโอติกส์ผลิต อย่างไรก็ตามยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม และศึกษา ความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนัง เพื่ออนาคตอาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาอาการผิดปกติของผิวแทน การใช้ยาปฏิชีวนะ

TITLE	Examination of probiotic properties and comparison of skin anti-bacterial activities between clinical and reference probiotic isolates
INVESTIGATOR	Miss Chalunya Poomipak
ADVISOR	Associate Professor Dr. Naraporn somboonna
DEPARTMENT	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn university

ABSTRACT

The skin is an important organ that functions both as a physical barrier to protect body from invading pathogens and as a niche of diverse microbial diversity. Skin microbiome plays beneficial and pathogenic roles, for instances *Staphylococcus epidermidis* can inhibit attachment and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* that causes atopic dermatitis. *Propionibacterium acne* can cause acne vulgaris. Hence, maintainance of skin bacterial diversity is important when many factor, such as age, sex, diets, climate and genetics, can affect the skin bacterial diversity. Studies reported that probiotics support healthy skin activities, for examples, synthesizing bacteriocin-like inhibitors to alleviate atopic dermatitis. This project focuses on the studies of clinical isolates of bacteria of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* (total 20 isolates), first is evaluating the tolerance of bacteria under pH 3, pH5 and bile salt for 3 hr. Second is comparing anti-bacterial activity against skin non-pathogen (*S. epidermidis*) and pathogens. (*S. aureus* and *P. acne*) The results has demonstrated that 19 species of *Lactobacillus* spp. had a viability at 75.21 – 97.50 % by *L. casei* NL 60 and commercial bacteria, *L. acidophilus*, was the most pH-tolerant. *L. casei* lac 44, *L. rhamnosus* lac 43 and NL58 at 10^9 CFU/ml can significantly inhibit the growth of *P. acne* except for *S. epidermidis*. The reference, *L. casei*, showed inhibition zones against *S. aureus* and *P. acne*. The anti-bacterial ability suggests that potential use of probiotics is to control the bacterial balance on skin. On-going experiment is to evaluate *in vitro* skin cell cytotoxicity assay, and more studies about skin therapy studies are needed.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์เล่มนี้สำเร็จได้ จากการให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาลดทั้งปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ของ รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ อาจารย์ที่ปรึกษาของโครงการนี้ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจและความทุ่มเทของอาจารย์ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ นาย เตชิต แผลกสงวนศรี และ นางสาว ไอลดา ชูภารา และพี่ๆ ในห้องวิจัย 2016 ที่คอยช่วยเหลือแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมทั้งให้คำปรึกษาทั้งเรื่องงาน และการใช้ชีวิต และคอยกำลังใจสม่ำเสมอ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ในห้องวิจัย 2016 ที่คอยช่วยเหลือ ช่วยกันแก้ไขปัญหา ให้กำลังใจและรับทุกข์ด้วยกัน ขอขอบคุณเพื่อนและพี่ ห้อง 2014 ที่ให้ที่พัก แบ่งปันขนม และคอยอยู่ดีเป็นเพื่อน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การดูแลสนับสนุน และคอยให้กำลังใจในการศึกษาตลอดจนอาจารย์คณะวิชาวิทยาศาสตร์ที่คอยให้ความรู้ และสะสมประสบการณ์ ทำให้การทำโครงการนี้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชลัญญา ภูมิภาค

ผู้ดำเนินการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูป	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	16
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก	35
ภาคผนวก ข	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	คุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อผิวหนังของโพรไบโอติกส์ จากการทดสอบทางคลินิกที่เคยมีรายงานมาก่อน	10 - 11
1.2	คุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อผิวหนังของโพรไบโอติกส์ที่เคยมีรายงานมาก่อน	12 - 13
3.1	รายชื่อโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิงที่ทำการทดสอบ	19
4.1.	ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะกรด พีเอช 3	21 - 22
4.2	ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะกรด พีเอช 5	25
4.3	ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะน้ำดี เข้มข้น 0.3%	27 - 28
4.4	ลักษณะสัญญาณวิทยาของ <i>Lactobacillus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	30 - 32
4.5	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ <i>S. epidermidis</i>	33 - 35
4.6	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ <i>S. aureus</i>	37 - 39
4.7	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ <i>P. acne</i>	40 - 41

รูปที่	สารบัญรูป	หน้า
1.1	โครงสร้างของชั้นผิวหนัง	2
1.2	องค์ประกอบของผิวชั้น Horny layer	2
1.3	ปัจจัยที่เอื้อต่อการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนผิวหนังมนุษย์	4
1.4	แผนภูมิการกระจายตัวของแบคทีเรียบนผิวหนังมนุษย์	6
1.5	ส่วนประกอบของผิวหนังและจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวหนัง	6
1.6	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างนิเวศจุลชีพบนผิวหนังและ <i>S. aureus</i>	8
4.1	ตัวอย่างภาพความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะกรด (พีเอช 3)	23
4.2	ตัวอย่างจำนวนเชื้อของ <i>Lactobacillus casei</i> NL 60	24
4.3	ตัวอย่างภาพความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะกรด (พีเอช 5)	26
4.4	ตัวอย่างภาพความสามารถในการอยู่รอดในน้ำดี ที่ความเข้มข้น 0.3%	29
4.5	ตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก ต่อ <i>S. epidermidis</i>	36
4.6	ตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทาง ต่อ <i>S. aureus</i>	39
4.7	ตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางการ ต่อ <i>P. acne</i>	42 - 43

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ผิวหนังและองค์ประกอบของผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดของร่างกายทำหน้าที่เป็นปราการปกป้องร่างกายจากปัจจัยภายนอกต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อร่างกายเช่น แสงแดด มลภาวะ รวมถึงรักษาความชุ่มชื้นและอุณหภูมิภายในร่างกายให้เหมาะสม นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากแบคทีเรีย ไวรัสก่อโรคต่าง ๆ ไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย อย่างไรก็ตามผิวหนังก็เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ต่าง ๆ อาทิ แบคทีเรีย ยีสต์รา และไวรัสเช่นเดียวกัน ผิวหนังมีองค์ประกอบชั้นผิวสำคัญอยู่ 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า ชั้นหนังแท้ และชั้นไขมัน

ชั้นหนังกำพร้า (epidermis หรือ cuticle)

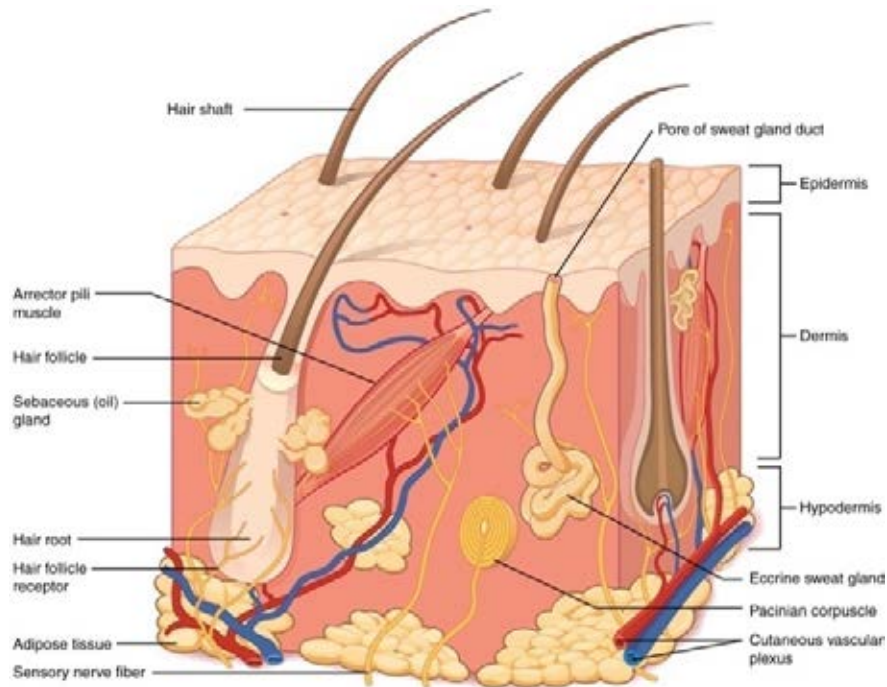
ชั้นหนังกำพร้าเป็นชั้นผิวหนังที่พบบนที่สุดของร่างกาย ประกอบไปด้วยเซลล์ผิวหนังได้แก่ Keratinocyte Melanocyte Langerhans cell และ Merckels cell มีชั้นผิวหนังด้านนอกสุดเรียกว่า Stratum Corneum หรือ Horny layer ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้วที่มีเคราติน (โปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย) และถูกปกคลุมด้วย hydrolipid film จึงทำให้ชั้นหนังกำพร้าเป็นด่านแรกในการป้องกันผิวจากจุลินทรีย์จากบนผิวหนัง รวมทั้งยังมีความสามารถรักษาความชุ่มชื้นให้แก่ผิว

ชั้นหนังแท้ (dermis หรือ corium)

ชั้นหนังแท้ประกอบด้วยเซลล์สำคัญหลักๆ ได้แก่ Fibroblasts Macrophages Mast cells นอกจากนี้ยังประกอบด้วยคอลลาเจน อีลาสติน และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลายชนิด ซึ่งทำให้มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นแก่ผิว โดยเส้นใยเหล่านี้จะถูกตรึงด้วยสาร Hyaluronic acid ซึ่งมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีและช่วยรักษาปริมาตรของผิว นอกจากนี้ชั้นหนังแท้ยังประกอบด้วยของต่อมเหงื่อ เส้นประสาท และรูรากขนต่าง ๆ อีกด้วย

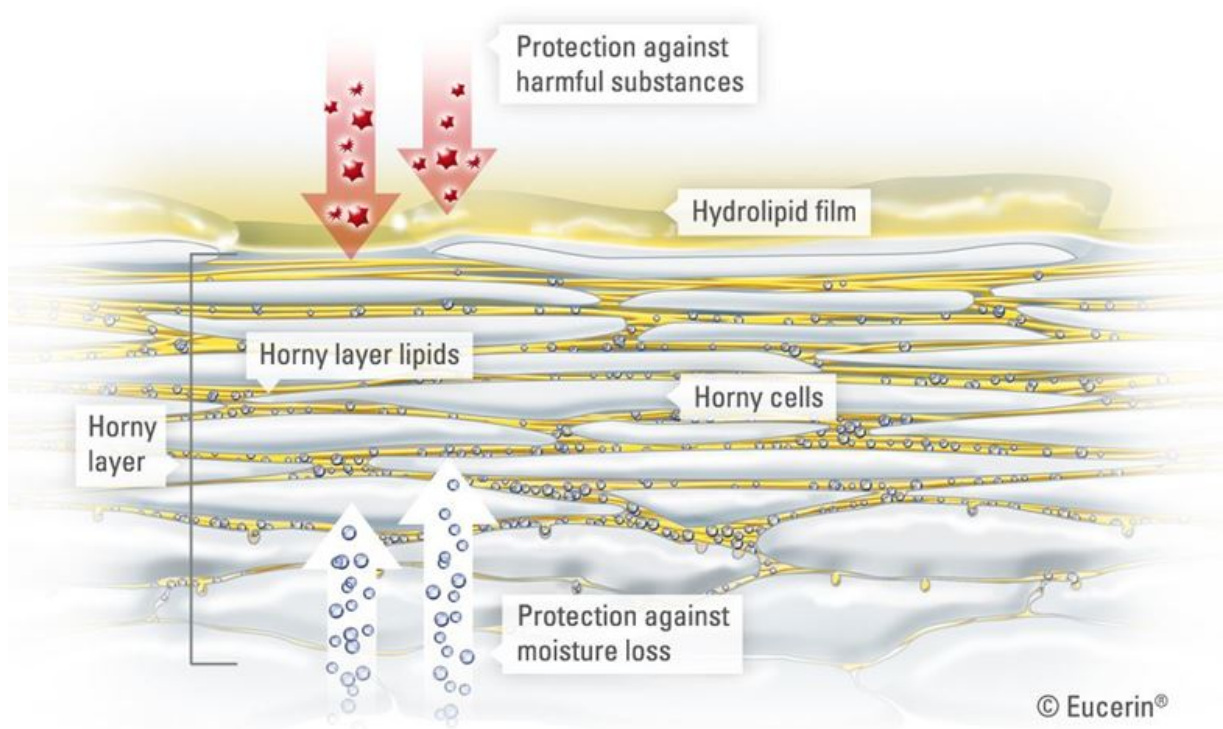
ชั้นไขมัน (subcutaneous หรือ hypodermis layer)

ชั้นไขมันจะเป็นบริเวณที่มีเซลล์ไขมัน โปรตีนคอลลาเจน และหลอดเลือดมาหล่อเลี้ยงจำนวนมาก ทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บพลังงาน และรองรับแรงกระแทกให้กับอวัยวะภายใน ความแตกต่างระหว่างปริมาณไขมัน และคอลลาเจนส่งผลให้โครงสร้างของผิวในแต่ละคนแตกต่างกันไปด้วยเช่นกัน



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของชั้นผิวหนัง

(ที่มา : <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/5-1-layers-of-the-skin>)



รูปที่ 1.2 องค์ประกอบของผิวชั้น Horny layer

(ที่มา : <https://www.eucerin.co.th/about-skin/basic-skin-knowledge/skins-protective-barrier>)

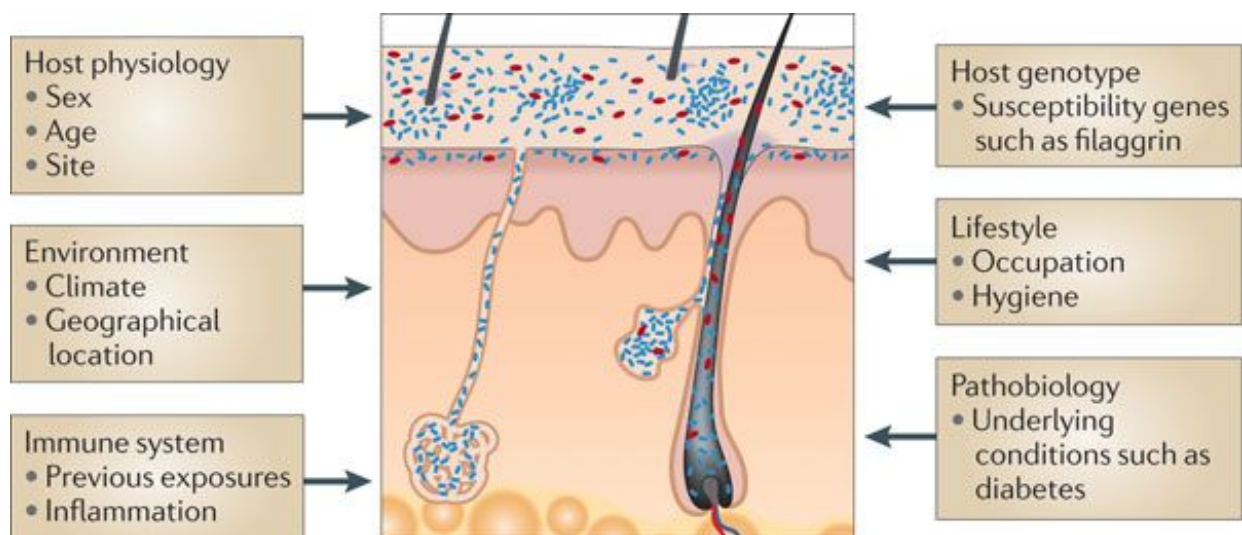
1.2. นิเวศจุลชีพ (microbiome)

บริเวณต่างๆ ในธรรมชาติรวมทั้งร่างกายของมนุษย์ จะมีแบคทีเรียและจุลชีพต่าง ๆ อาศัยอยู่หลากหลายชนิด ประกอบรวมกันขึ้นเป็นชีวนิเวศจุลชีพ ซึ่งประชากรจุลินทรีย์จะมีความแตกต่างกันแม้แต่ในตัวอย่างที่มาจากแหล่งเดียวกันแต่ต่างสภาวะ เช่น ในคนป่วยและคนที่มีสุขภาพดี นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามนำศาสตร์หลายๆ ด้านมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษานิเวศจุลชีพในสภาวะแวดล้อมต่างๆ

การศึกษานิเวศจุลชีพ หมายถึง การศึกษาและจำแนกชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมดในสภาวะแวดล้อมหนึ่ง ทั้งแบคทีเรีย อาร์เคีย รา หรือไวรัส ทั้งจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ในปัจจุบันการศึกษาทางไมโครไบโอมมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ โดยศึกษากลไกการทำงานและปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มจุลินทรีย์กับสิ่งแวดล้อม หรือสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน และค้นหาเหตุและผลที่เกิดขึ้นจากปฏิสัมพันธ์เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้หรือสร้างสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์แสดงออกในสิ่งที่ต้องการ หรือเป็นเครื่องมือเพื่อการทำนายหรือระบุโอกาสการเกิดสิ่งที่ไม่พึงปรารถนาได้ ด้วยเหตุนี้องค์ความรู้ทางไมโครไบโอมในมนุษย์กับสุขภาพจึงได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อจุดมุ่งหมายทางการแพทย์ยกตัวอย่างเช่น โครงการ The human microbiome project (HMP) ในความดูแลของสถาบันสุขภาพแห่งชาติสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นโครงการศึกษาจำแนกและวิเคราะห์บทบาทหน้าที่จุลินทรีย์ในร่างกายมนุษย์ ซึ่งพบความแตกต่างกันของไมโครไบโอม จากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดรูปแบบไมโครไบโอม เช่น รายงานวิจัยกล่าวถึงอาหารที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงไมโครไบโอมในลำไส้ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของร่างกายและการเกิดโรคต่าง ๆ (Shreiner, Kao et al. 2015) เช่น โรคหัวใจ มีรายงานกล่าวถึงการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างไมโครไบโอมและโรคหัวใจตามข้อมูลของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับ phosphatidylcholine metabolism ในกลุ่มผู้ป่วยสุขภาพดีที่รับประทานอาหารที่มี phosphatidylcholine เป็นองค์ประกอบ จะพบระดับของ trimethylamine-N-oxide (TMAO) ซึ่งความสัมพันธ์กับโรคหัวใจเพิ่มสูงขึ้น และในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีที่รับประทานมังสวิรัต ไม่พบระดับการเพิ่มขึ้นของ TMAO เมื่อเทียบกับอาสาสมัครที่รับประทานทั้งเนื้อและสัตว์ ดังนั้นความแตกต่างทางไมโครไบโอม อาจนำไปสู่การรักษาและวินิจฉัยโรคหัวใจได้ (Tang, Wang et al. 2013) นอกจากนี้ สังคมจุลินทรีย์ที่ได้รับจากภายนอก เช่น ลักษณะการคลอด ทารกที่คลอดโดยวิธีธรรมชาติจะมีรูปแบบความหลากหลายไมโครไบโอมที่แตกต่างจากทารกผ่าคลอด โดยทารกที่คลอดด้วยวิธีธรรมชาติ จะได้รับกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่องคลอดของแม่ที่เป็นประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนกลุ่มจุลินทรีย์ในทารกที่ผ่าคลอดจะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปที่ผิวหนัง (Gritz and Bhandari 2015) ซึ่งความแตกต่างของไมโครไบโอมนี้อาจจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพระยะยาวได้ ด้วยเหตุนี้นำมาสู่การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ เช่น โพรไบโอติก (Probiotic) เป็นต้น

1.3. ปัจจัยที่ส่งผลต่อสุขภาพผิวหนัง

เนื่องจากผิวหนังที่ทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันผิวรวมทั้งมีส่วนในการส่งเสริมบุคลิกภาพของแต่ละบุคคล การมีผิวสุขภาพดีจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้การเสื่อมสภาพของผิวหนังเกิดได้จาก 2 สาเหตุหลัก ๆ ได้แก่ ปัจจัยภายใน เช่น เพศ ฮอร์โมน ลักษณะพันธุกรรม และ ปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมี มลภาวะ แสงแดด อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสาเหตุเหล่านี้จะส่งผลโดยตรงกับสุขภาพผิว เป็นผลให้เกิดอาการผิวบอบบาง และแพ้ง่าย นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่สมดุลของสังคมจุลินทรีย์บนผิวหนังยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพผิว รวมถึงจุลินทรีย์บนผิวเปลี่ยนแปลงไปก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังได้เช่นกัน ยกตัวอย่างโรค ภูมิแพ้ผิวหนัง (Atopic dermatitis (AD) ที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการคันตามผิวหนัง เกิดผื่นแดง อักเสบ ผิวหนังแห้งลอก มักพบมากในเด็ก (Huang, Abrams et al. 2009) และจะเกิดอาการเป็นระยะ ๆ มีรายงานวิจัยว่าผู้ป่วยมากกว่า 90% พบว่ามีปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผลและไม่เกิดบาดแผล เมื่อเทียบกับคนสุขภาพดีซึ่งพบ *S. aureus* ในปริมาณที่น้อยกว่า โดย *S. aureus* จะปลดปล่อย exoproteins ซึ่งจะไปทำลายชั้นผิวหนัง ทำให้รูขุมขนเข้าไปในผิว และกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันทำให้เกิดอาการอักเสบขึ้น ซึ่งปริมาณของ *S. aureus* จำนวนมาก มีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงของการอักเสบด้วยเช่นกัน



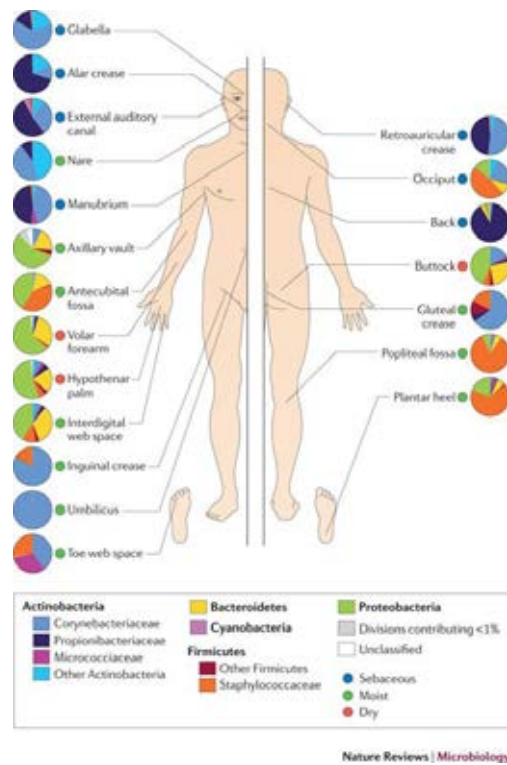
Nature Reviews | Microbiology

รูปที่ 1.3 ปัจจัยที่เอื้อต่อการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนผิวหนังมนุษย์
(ที่มา : <https://www.nature.com/articles/nrmicro2537/figures/2>)

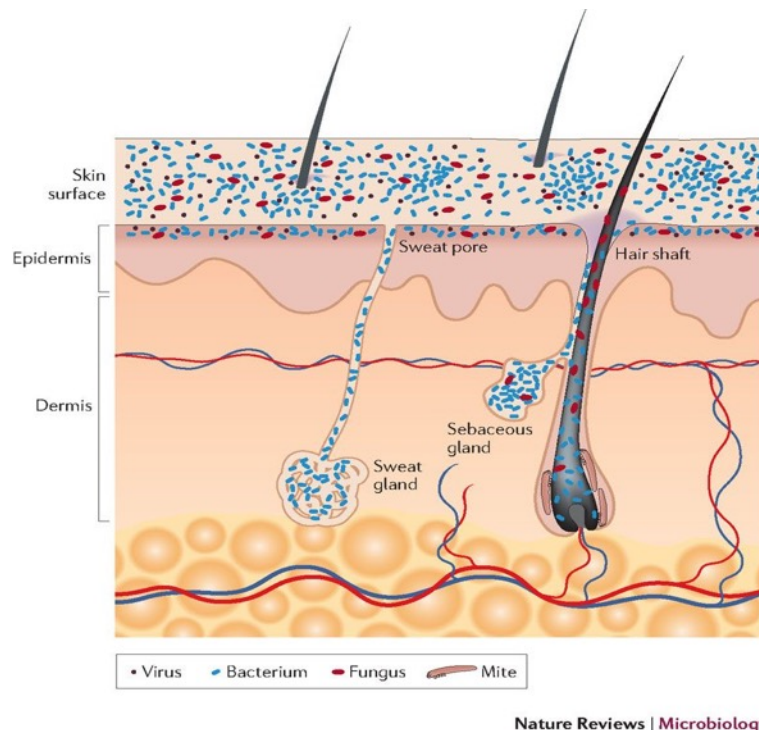
1.4. นิเวศจุลชีพบริเวณผิวหนัง (skin microbiome)

บริเวณผิวหนังโดยเฉพาะผิวหนังชั้นนอก จะสัมผัสกับจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมภายนอกตลอดเวลา เป็นผลให้ผิวหนังชั้นนี้มีปริมาณและความหลากหลายของจุลินทรีย์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังชั้นอื่น ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับผิวหนังที่พบส่วนมาก จะเป็นรูปแบบการอยู่ร่วมกันอย่างเกื้อกูลกัน (symbiotic relationships) โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ป้องกันการรุกรานจากจุลชีพก่อโรคอื่น ๆ ในขณะที่ผิวหนังจะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ ในแต่ละบุคคลนั้นจะมีจุลินทรีย์แตกต่างกัน อันเนื่องมาจากปัจจัยภายในและภายนอกดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยปกติทั่วไปลักษณะของผิวหนังจะมีความเป็นกรดที่ pH ประมาณ 4.7-5.75 มีปริมาณสารอาหารต่ำและแห้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความหนาของผิวและรูขุมขน ด้วย (Tagami 2008) ผิวหนังยังประกอบด้วยต่อมเหงื่อ ต่อมไขมันและรูขุมขน ที่มีการสัมผัสกับจุลินทรีย์ได้โดยตรงเช่นกัน ต่อมเหงื่อชนิด Eccrine ซึ่งพบได้มากบนร่างกาย มีหน้าที่ผลิตเหงื่อเพื่อระบายความร้อน รักษาอุณหภูมิของร่างกาย (Cohn 1994, Grice and Segre 2011) และต่อมไขมันนั้นจะเชื่อมต่อกับรูขุมขน เรียกว่า pilosebaceous unit โดยจะมีการหลั่งไขมันที่มีซีบัม (sebum) เป็นส่วนประกอบออกมาผสมกับเหงื่อ ปกคลุมผิวหนังเป็นชั้นฟิล์ม และสามารถถูกย่อยสลายจากจุลินทรีย์บนผิว เกิดเป็นกรดไขมันอิสระ และทำให้ผิวมีสภาพความเป็นกรด ซึ่งกลไกนี้มีส่วนช่วยในการจำกัดจุลินทรีย์บางชนิดไม่ให้เจริญเติบโต เช่น *Streptococcus pyogenes* และ *S. aureus* ซึ่งจะถูกยับยั้งการเจริญที่สภาวะกรดได้ แต่ในขณะเดียวกันบริเวณไขมันนั้นกลับช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนบางชนิดเช่น *Propionibacterium acnes* ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมของ *P. acnes* พบว่ามีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (lipases) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายซีบัมบนผิวหนัง (Brüggemann, Henne et al. 2004) ให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเกาะติดกับกรดไขมันอิสระเหล่านี้แล้วเข้าไปยังต่อมไขมันได้ จึงเป็นสาเหตุของการเกิดสิว

จากงานวิจัยทางด้าน Metagenomic ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์บนผิวในแต่ละบริเวณ จะขึ้นกับความแตกต่างของความมัน ความชื้น และลักษณะของผิวซึ่งจะพบประชากรแบคทีเรียสำคัญอยู่ 3 กลุ่มได้แก่ *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Corynebacterium* spp. ทั้งนี้สัดส่วนของปริมาณแตกต่างกันตามลักษณะของผิว ตัวอย่างเช่นบริเวณผิวหนังที่ความมันสูง จะพบ *Propionibacterium* spp. เป็นหลัก และในบริเวณที่มีความชื้นสูงจะพบกลุ่ม *Staphylococcus* spp. และ *Corynebacterium* spp. จะเจริญเติบโตได้ดีมากกว่าบริเวณอื่น ส่วนบริเวณผิวหนังที่แห้ง เช่น แขน มือ และ สะโพก จะพบจุลินทรีย์อยู่ร่วมกันหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* และ *Bacteroidetes* (Grice, Kong et al. 2009, Grice and Segre 2011)



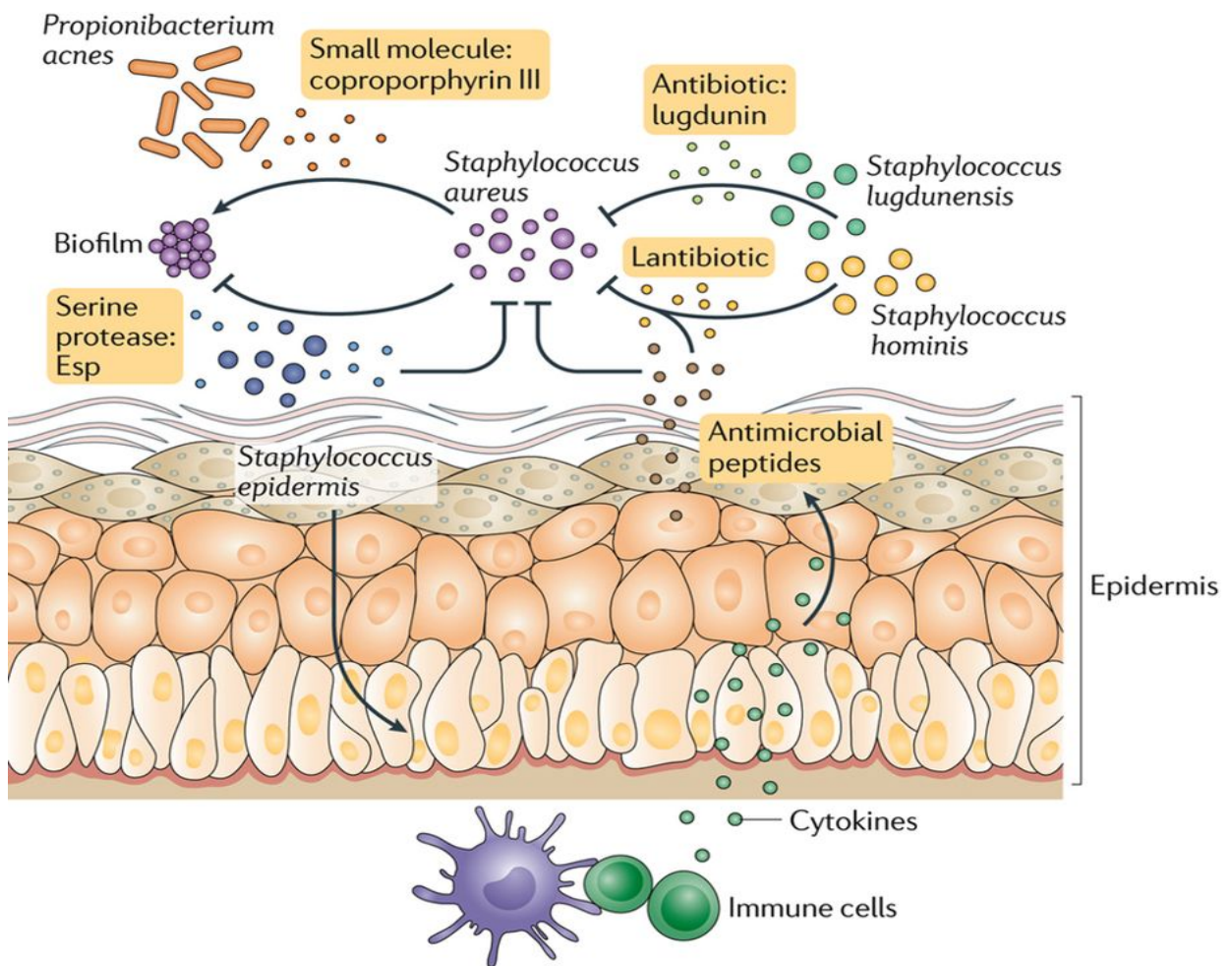
รูปที่ 1.4 แผนภูมิการกระจายตัวของแบคทีเรียบนผิวหนังมนุษย์
(ที่มา : <https://www.nature.com/articles/nrmicro2537/figures/3>)



รูปที่ 1.5 ส่วนประกอบของผิวหนังและจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวหนัง
(ที่มา : <https://www.nature.com/articles/nrmicro2537/figures/2>)

1.5. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อประจำถิ่นบนผิวกับเจ้าบ้าน

จุลินทรีย์ประจำถิ่นบนผิวของเจ้าบ้าน (Normal flora) มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งรุกรานจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างถิ่นและจุลินทรีย์ก่อโรค จากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันในเชิงแข่งขันการเจริญ แ่่งสารอาหารรวมทั้งแย่งพื้นที่ในการยึดเกาะและเจริญของเชื้อต่างถิ่น นอกจากนี้ในแบคทีเรียบางตัว สามารถผลิตสาร antimicrobial ยับยั้งการเจริญของเชื้อรุกรานได้ ยกตัวอย่าง การยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียพบมากในผิวของผู้ป่วยผิวหนังอักเสบที่เกิดจากแบคทีเรีย *S. epidermidis* ที่สามารถผลิต serine protease glutamyl endopeptidase (Esp) ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนสำคัญในการยึดเกาะบนเยื่อบุผิวของเจ้าบ้าน และการฟอร์มตัวเป็นชั้นไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ยิ่งไปกว่านั้น Esp สามารถทำการรวมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิดที่สร้างขึ้นจากร่างกายเช่น β -defensin เพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคได้ นอกจากนี้ Esp ที่ถูกผลิตขึ้นยังสามารถกระตุ้น keratinocytes ให้ผลิตโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ผ่านทางระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (Iwase, Uehara et al. 2010) ในงานวิจัยอื่น ได้กล่าวถึงความสามารถของ *Staphylococcus lugdunensis* ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นกัน โดยผ่านการสร้างเปปไทด์ lugdunin (Zipperer, Konnerth et al. 2016) (Byrd, Belkaid et al. 2018) แบคทีเรียในกลุ่มของ coagulase-negative *Staphylococcus* spp. เช่น *S. epidermidis* และ *S. hominis* สามารถผลิต lantibiotics โดยจะทำงานร่วมกับเปปไทด์ LL-37 ของมนุษย์ ในการส่งเสริมยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* แต่ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ผิวหนัง จะไม่พบแบคทีเรียที่สามารถผลิต lantibiotics ซึ่งส่งเสริมการติดเชื้อ *S. aureus* บนผิวมากยิ่งขึ้น (Nakatsuji, Chen et al. 2017) ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการต้านทาน Esp และ lantibiotic ของเชื้อ *S. aureus* อีกทั้งจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าการอยู่ร่วมกันของ *S. aureus* และ *Corynebacterium striatum* จะส่งเสริมให้ *S. aureus* เปลี่ยนจากสภาวะก่อโรค เป็นภาวะปกติ จากความสามารถในการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของ *S. aureus* อาจใช้เป็นแนวทางการรักษาแทนการทำลายเชื้อได้อีกวิธีหนึ่ง (Ramsey, Freire et al. 2016) นอกจากนี้ปฏิสัมพันธ์ในเชิงการแข่งขันและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคแล้ว ยังมีปฏิสัมพันธ์ในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อก่อโรคด้วย เช่น แบคทีเรียในกลุ่มของ *Propionibacterium* บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการรวมตัวและฟอร์มเป็นไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ด้วยการผลิต coproporphyrin III (CIII) (Wollenberg, Claesen et al. 2014)



Nature Reviews | Microbiology

รูปที่ 1.6 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างนิเวศจุลชีพบนผิวหนังและ *S. aureus*

(ที่มา :<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.157/figures/3>)

1.6 โพรไบโอติกส์

โพรไบโอติกส์ คือ จุลินทรีย์มีชีวิตเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO, 2008) โพรไบโอติกส์จะอาศัยอยู่ร่วมกับเจ้าบ้านแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) เมื่อโพรไบโอติกส์เข้าสู่ร่างกาย ผ่านระบบทางเดินอาหารและยึดเกาะบริเวณเยื่อผิวบริเวณลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันจะจดจำและยอมให้อยู่ร่วมกัน โดยจุลินทรีย์จะใช้อาหารจากเจ้าบ้านในการเจริญ ซึ่งทำให้เจ้าบ้านได้รับประโยชน์ไปด้วย โดยโพรไบโอติกส์จะทำให้สภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่นั้นเป็นสภาพกรด ทำให้เชื้อก่อโรคที่ไม่สามารถทนกรดได้นั้นไม่สามารถเจริญได้ และยังผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอาหารบางชนิดและสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น กรดอินทรีย์ แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) และสารอื่นๆ (Ouweland, Kirjavainen et al. 1999) นอกจากนี้โพรไบโอติกส์ยังช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์และส่งเสริมผลดีต่อสุขภาพในด้านอื่น ๆ เช่น มีรายงานกล่าวถึงประโยชน์ของโพรไบโอติกส์ในการช่วยบรรเทาอาการแพ้แลคโตสในนม (Glück and Gebbers 2019) ป้องการอักเสบของลำไส้ (Gionchetti, Rizzello et al. 2000) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของโพรไบโอติกส์ในการส่งเสริมสุขภาพด้านผิวหนัง เช่น ลดอาการภูมิแพ้ผิวหนัง จากการศึกษา Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของเด็กที่เป็นโรคภูมิแพ้ผิวหนังในหลอดทดลองของ Prescott และคณะ, 2005 พบว่า โพรไบโอติกส์ *Lactobacillus fermentum* มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ Monocyte ในเลือด และ Helper T cell ชนิดที่ 1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ interferon γ เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการตอบสนองต่อเชื้อ *S. aureus* ที่เพิ่มขึ้น เป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความรุนแรงของโรคภูมิแพ้ผิวหนังที่ลดลง (Prescott, Dunstan et al. 2005) ถึงแม้ว่างานวิจัยส่วนมากจะมุ่งเน้นการศึกษาไปที่การรับประทานและศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้น แต่ปัจจุบันเริ่มมีการใช้โพรไบโอติกส์และหรือสารที่ผลิตจากโพรไบโอติกส์ลงไปบนผิวโดยตรงเพื่อการปรับสมดุลไมโครไบโอมในผิวหนังมากขึ้น อาทิ การใช้โพรไบโอติกส์ในการส่งเสริมสุขภาพผิวทั้งในรูปแบบที่มีชีวิต องค์กรประกอบของเซลล์ที่ตายแล้ว หรือน้ำเลี้ยงเซลล์ เช่น ในการทดสอบทางคลินิกและในหลอดทดลอง โดยนำ *Streptococcus thermophiles* มาใช้เป็นส่วนผสมในครีม และทาบริเวณหน้าแขนเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีการผลิต Ceramide เพิ่มขึ้น ซึ่ง Ceramide มีหน้าที่อุ้มน้ำ ทำให้ผิวมีความชุ่มชื้น (Di Marzio, Centi et al. 2003) นอกจากนี้ มีการใช้องค์กรประกอบของเซลล์ *Lactobacillus johnsonii* สายพันธุ์ NCC 533 ที่ตายแล้ว ร่วมกับโลชั่นในการรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ผิวหนัง พบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* บนผิวหนังรวมทั้งลดความรุนแรงของโรคลง (Blanchet-Réthoré, Bourdès et al. 2017)

ตารางที่ 1.1 คุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อผิวหนังของโพรไบโอติกส์จากการทดสอบทางคลินิกที่เคยมีรายงานมาก่อน

สายพันธุ์	คุณสมบัติ	ลักษณะการใช้งาน	อ้างอิง
<i>Bifidobacterium breve</i> strain Yakult (BBY)	- ป้องกันการสูญเสียความยืดหยุ่นจากแสงแดด โดยการยับยั้งการผลิต elastase และ IL-1beta	ใช้สารน้ำจากโพรไบโอติกส์ หรือนมที่ได้จากการหมัก ทาบนานูไรซ์ คนที่ผ่านการฉายแสงยูวี เป็นเวลา 9 และ 14 วัน	Sugimoto et al. (2012)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC53103)	- ลดอาการรุนแรงของโรค ภูมิแพ้ผิวหนัง (SCORAD) ของทารกที่บกพร่อง IgE (IgE-sensitized)	ให้แคปซูลบรรจุโพรไบโอติกส์ที่ความเข้มข้น 5×10^9 CFU ทุกๆ สองครั้งต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เทียบกับ placebo	Viljanen et al. (2005)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	- กระตุ้นการผลิต IFN- γ ในทารกที่แพ้นมวัว หรือ บกพร่อง IgE ที่มี ความสัมพันธ์กับโรคภูมิแพ้ผิวหนัง โดย IFN- γ จะกระตุ้นการทำงานของ mononuclear cell		Pohjavuori et al., (2004)

<i>Bifidobacterium longum</i>	<p>- ลดความไวต่อการระคายเคืองและเพิ่มความแข็งแรงของผิว จากสภาพแวดล้อมภายนอก โดย</p> <p>(1) ยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาทที่กระตุ้นการแพ้</p> <p>(2) ลดการอักเสบของเส้นประสาทซึ่งมีความสัมพันธ์กับอาการแพ้ทางผิวหนัง</p>	<p>-ใช้ 10% ของโพรไบโอติกส์ที่ตายผสมในครีมทาผิว ทาบริเวณ ผิวหน้า แขน และขา</p> <p>ทุกๆ 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน</p>	Gueniche et al. (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> HY7714	<p>- ยับยั้งการผลิต matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) และยับยั้ง MMP-2 MMP-9 MMP-13 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรคอลลาเจนในมนุษย์</p> <p>- ลดการเกิดริ้วรอยในการทดสอบในหนูเทียบกับชุดควบคุม</p>	<p>-ใช้โพรไบโอติกส์ ความเข้มข้น 1×10^9 บ่มร่วมกับเซลล์ผิวหนัง Hs68 Cells ที่ผ่านการฉายแสงยูวี</p> <p>ใช้โพรไบโอติกส์ ความเข้มข้น 1×10^9 ทาบริเวณผิวของหนูทดลองไร้ขน ที่ผ่านการฉายแสงยูวี</p>	Kim et al. (2014)
<i>Streptococcus Thermophilus</i>	<p>- กระตุ้นการเสริมสร้างเซลาไมด์ (ceramide) ในผิว</p>	<p>-ใช้โพรไบโอติกส์ ความเข้มข้น 1×10^8 ปริมาณ 1.7 กรัมต่อ 5 มิลลิกรัม ผสมร่วมกับครีม ทดสอบกับอาสาสมัครผู้หญิง สุขภาพดี วัยเฉลี่ย 60 ปี ที่บริเวณหน้าแขน 2 ครั้งต่อวัน ติดต่อกัน 15 วัน</p>	Di Marzio et al., (2008)

ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อผิวหนังของโพรไบโอติกส์ที่เคยมีรายงานมาก่อน

สายพันธุ์	คุณสมบัติ	อ้างอิง
<i>Lactobacillus casei</i>	- ใช้ร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ชนิดอื่น ในการบรรเทาโรคภูมิแพ้ผิวหนัง	Kimoto-Nira, H., et al. (2014).
<i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> Strain K12	- ใช้ร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ชนิดอื่น ในการบรรเทาโรคภูมิแพ้ผิวหนัง - ยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>Propionibacterium acnes</i> ผ่านการสร้างสาร bacteriocin-like inhibitory (BLIS-like substance) - ยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine จากเยื่อบุเซลล์ และเซลล์คีราติโนไซต์	Fuchs-Tarlovsky, V., et al. (2016). Bowe et al., (2006) Cosseau et al., (2008)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ใช้ร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ชนิดอื่น ในการบรรเทาโรคภูมิแพ้ผิวหนัง	Fuchs-Tarlovsky, V., et al. (2016).
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	- ใช้ร่วมกับ <i>Bifidobacterium breves</i> ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ epithelial cell, DC cell, cytokine และ acne - กระตุ้นในเซลล์สร้าง IFN-gamma	Fuchs-Tarlovsky, V., et al. (2016). Kober, M. M. and W. P. Bowe (2015).
<i>Lactobacillus paracasei</i>	- ชักนำการสร้าง systemic anti-inflammatory cytokines - ยับยั้ง neutrogenic inflammation ในผิว	Kober, M. M. and W. P. Bowe (2015).

<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ลด UV-induced immune suppression - ลดการกระตุ้น Langerhans cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี 	<p>Ouwehand, A. C., et al. (2017). Kober, M. M. and W. P. Bowe (2015).</p>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ยับยั้งการสร้าง metalloproteinase (ที่เกิดจากการชักนำโดย UVB) - ลดรอยเหี่ยวย่นบนผิว - สร้าง hyaluronic acid 	<p>Ouwehand, A. C., et al. (2017). Kober, M. M. and W. P. Bowe (2015).</p>
<i>Lactobacillus Reuteri</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ยับยั้งการยึดเกาะของ S. aureus บนเซลล์คีลาติโนไซต์ จากการแข่งขัน การเจริญผ่านการผลิต bacteriocins - ใช้ร่วมกับ <i>Bifidobacterium</i> ช่วยให้โรคมุมิแพ้ผิวหนังบรรเทา - ชักนำการสร้าง systemic anti-inflammatory cytokines 	<p>Caramia, G., et al. (2008). Fuchs-Tarlovsky, V., et al. (2016).</p>
<i>Bacillus coagulans</i>	<ul style="list-style-type: none"> - สร้างสารประเภท exopolysaccharide และสารต้านอนุมูลอิสระ - Supernatant และ cell fragment กระตุ้น phenotype ของ antigen presenting cell และลดการสร้างอนุมูลอิสระ 	<p>Kober, M. M. and W. P. Bowe (2015). Benson et al., 2012, Jensen et al., (2010)</p>

1.8 เกณฑ์การคัดเลือกโพรไบโอติกส์

เกณฑ์ยืนยันคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ที่จะนำมาใช้ในสัตว์และคนนั้น จะต้องมีคุณสมบัติเบื้องต้นตาม Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food ของ FAO/WHO (2002) ดังนี้คือ

1. การตรวจเอกลักษณ์ของสกุล ชนิด และสายพันธุ์ ด้วยวิธีที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เช่น ลำดับเบส
2. การตรวจสอบคุณลักษณะความเป็นโพรไบโอติกส์ แบ่งเป็น

ความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด

ความสามารถในการทนต่อน้ำดี

ความสามารถในการยึดเกาะที่บริเวณเยื่อบุเซลล์ผิว

ความสามารถในการยับยั้งและลดการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรค

3. การประเมินความปลอดภัยต่อมนุษย์

การก่อโรค การทำให้เกิดติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (Systemic infections)

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดหรือความรุนแรง (virulence factor)

กิจกรรมเมตาบอลิซึม (Metabolism)

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (Immune stimulation)

การต่ออายุปฏิกิริยาระดับเซลล์

การถ่ายโอนยีน (Gene transfer)

บทที่ 2

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ไมโครปิเปต (Micropipette) ของบริษัท Eppendorf North America (New York, USA)
2. หลอดไมโครเซนทิพีลขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Biologix Group Ltd. (Changzhou, China)
3. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VM-10 ของบริษัท DAIHAN Scientific (Seoul, Korea)
4. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep frozen) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo (Osaka, Japan)
5. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi (Tokyo, Japan)
6. เครื่องชั่งรุ่น 1.2200P และ A2008 ของบริษัท Sartorius (New York, USA)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ของบริษัท Kokusan (Shizuoka, Japan)
8. ตู้อบความร้อน อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ของบริษัท Memmert (Schwabach, Germany)
9. เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ของบริษัท Thermo Scientific
11. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ของบริษัท PYREX (New York, USA)
12. ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ของบริษัท PYREX (New York, USA)
13. ทิปสำหรับไมโครปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Nest Biotechnology Co., Ltd. (New Jersey, USA)
14. ทิปสำหรับไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร ของบริษัท Nest Biotechnology Co., Ltd. (New Jersey, USA)
15. กระจกบดของ ของบริษัท PYREX (New York, USA)
16. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท Boss Tech (Hampshire, UK)
17. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว ของบริษัท Petriq (Czech)
18. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ของบริษัท Greiner Bio-one (Thailand)
19. ถุงมือของบริษัท Inter Glove (Bangkok, Thailand)
20. เครื่องปรับ pH
21. ขวดดูแรนขนาด 1000 มิลลิลิตร
22. ขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร
23. คิวเวท (cuvette) ของบริษัท Eppendorff
24. หลอดทดลอง Falcon tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร

25. พาราฟิล์ม
26. เครื่องบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
27. ลูบ์เซียเชื้อ
28. คีมคีบ (Forceps)
29. สไลด์
30. แผ่นปิดสไลด์(coverslip)ขนาด22x22มิลลิเมตร
31. ตะเกียงแอลกอฮอล์
32. น้ำกลั่น
33. กระจกยิบ
34. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
35. โถย้อมสไลด์
36. sterile disc ของ Whatman™
37. ไม้ swab เชื้อของบริษัท Thai Gauze
38. Anaerobic gas pack
39. Anaerobic jar
40. กระบอกใส่จานเลี้ยงเชื้อ
41. เทียน
42. ไฟแช็ค
43. กรด 1N HCl
44. cristal violet
45. Safranin
46. สารละลายไอโอดีน
47. 95% เอทานอล
48. อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharp (MRS) ของบริษัท Himedia
49. อาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid Thioglycollate Medium
50. ผงน้ำดี Bile Salts Mixture ของบริษัท Himedia
51. ผงวุ้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1. การตรวจสอบคุณลักษณะความเป็นโปรไบโอติกส์

3.1.1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยวิธีการย้อมแกรม

นำเชื้อโปรไบโอติกส์ที่ต้องการศึกษา (ตารางที่ 3.1.) มาเลี้ยงในอาหาร de Man, Rogosa และ Sharpe (MRS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมแกรม โดยการ สเมียร์เชื่อบนแผ่นสไลด์ จากนั้นย้อมด้วยสี crystal violet ใช้ gram iodine เพื่อทำให้สีติดกับผนังเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วย 95% alcohol ทำการย้อมสี safranin o เพื่อใช้เป็น counter strain

3.1.2. ศึกษาการทนกรดของโปรไบโอติกส์

นำเชื้อโปรไบโอติกส์ที่ต้องการศึกษา เลี้ยงลงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อโปรไบโอติกส์ ให้มีความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ใส่เชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เตรียมอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับความเป็นกรดที่ pH 3 และ pH 5 (ปรับด้วย 1N HCl) ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างมานับจำนวนโคโลนีที่มีชีวิต โดยวิธี drop plate ลงบนอาหาร MRS agar โดยนำเชื้อมาทำ 10-fold serial dilution ซึ่งเตรียมจาก MRS broth ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} CFU/ml ทำการทดลองนี้ซ้ำ 3 ครั้ง

3.1.3. ศึกษาการทนน้ำดีของโปรไบโอติกส์

นำเชื้อโปรไบโอติกส์ที่ต้องการศึกษา เลี้ยงลงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อโปรไบโอติกส์ ให้มีความเข้มข้น 10^9 CFU/ml เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ผสมผงน้ำดี (bile extract) ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 0.3% ทำการบ่มเชื้อโปรไบโอติกส์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่าง มานับจำนวนโคโลนีที่มีชีวิต โดยวิธี drop plate ลงบนอาหาร MRS agar โดยนำเชื้อมาทำ 10-fold serial dilution ซึ่งเตรียมจาก MRS broth ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} CFU/ml ทำการทดลองนี้ซ้ำ 3 ครั้ง

3.2. ศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของ probiotic ที่มีต่อ *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* (antibacterial activity)

ทำการเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกส์ ลงในอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อโพรไบโอติกส์ ให้มีความเข้มข้น 10^9 CFU/ml และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร MRS broth (สำหรับ *P. acnes* เลี้ยงในอาหาร Fluid Thioglycollate Medium) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10^9 CFU/ml ทำการ swab เชื้อลงบนอาหาร MRS agar จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar disc diffusion ดังนี้

วิธี agar disc diffusion

ทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อโพรไบโอติกส์ (10-fold serial dilution) ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^9 , 10^8 และ 10^7 ด้วย MRS broth นำเชื้อโพรไบโอติกส์แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น disc เปล่า จากนั้นนำแผ่น disc ที่มีโพรไบโอติกส์ที่ต้องการทดสอบ วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ทำการ cotton swab แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml (สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ทำการ swab ลงบนอาหาร MRS agar ส่วน *P. acnes* ทำการ swab ลงบนอาหาร Fluid Thioglycollate agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัด inhibit zones ที่เกิดขึ้น ทำการทดลองนี้ซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางที่ 3.1 รายชื่อโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิงที่ทำการทดสอบ

รายชื่อโพรไบโอติกส์ตัวอย่าง	รหัส
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-
<i>Lactobacillus casei</i> Lac44	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus casei</i> NL57	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus casei</i> NL60	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac39	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac40	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac41	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac42	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lac43	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NL56	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NL58	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B64	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B67	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> NL61	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B6	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus fermentum</i> NL53	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus fermentum</i> Lac31	B4-CU-0001/60-0002/60

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. การประเมินคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ของสายพันธุ์ทางคลินิกและสายพันธุ์อ้างอิง

4.1.1. ความสามารถในการทนกรด

จากผลการทดสอบความทนกรดของโพรไบโอติกส์ในอาหารเหลว MRS ที่ทำการปรับค่า pH 3 (ปรับโดยใช้ 1N HCl) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเทียบกับชุดควบคุม (อาหารเหลว MRS pH ประมาณ 6.5) พบว่าเมื่อนำเชื้อมาทำการ drop plate เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ โดยการทำเจือจางที่ 10^{-2} ถึง 10^{-5} เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทำการทดสอบโพรไบโอติกส์ทั้ง 19 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.1 พบว่าโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก *Lactobacillus casei* NL 60 มีความสามารถในการทนกรดมากที่สุด โดยมีอัตราการอยู่รอด 95.27% และสายพันธุ์อ้างอิง *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus paracasei* มีอัตราการอยู่รอดที่ 97.5% และ 95.16% ตามลำดับ และความสามารถในการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่า pH 5 พบว่าโพรไบโอติกส์ที่นำมาทดสอบ มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 83.94 -107.17 ดังตารางที่ 4.2 โดยสายพันธุ์ทางคลินิกและสายพันธุ์อ้างอิงที่มีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุดได้แก่ *Lactobacillus salivarius* Lac 42 และ *Lactobacillus paracasei* ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดที่ 104.28 และ 107.17 ตามลำดับ ซึ่งคำนวณจากค่าเฉลี่ยโดยใช้สูตร

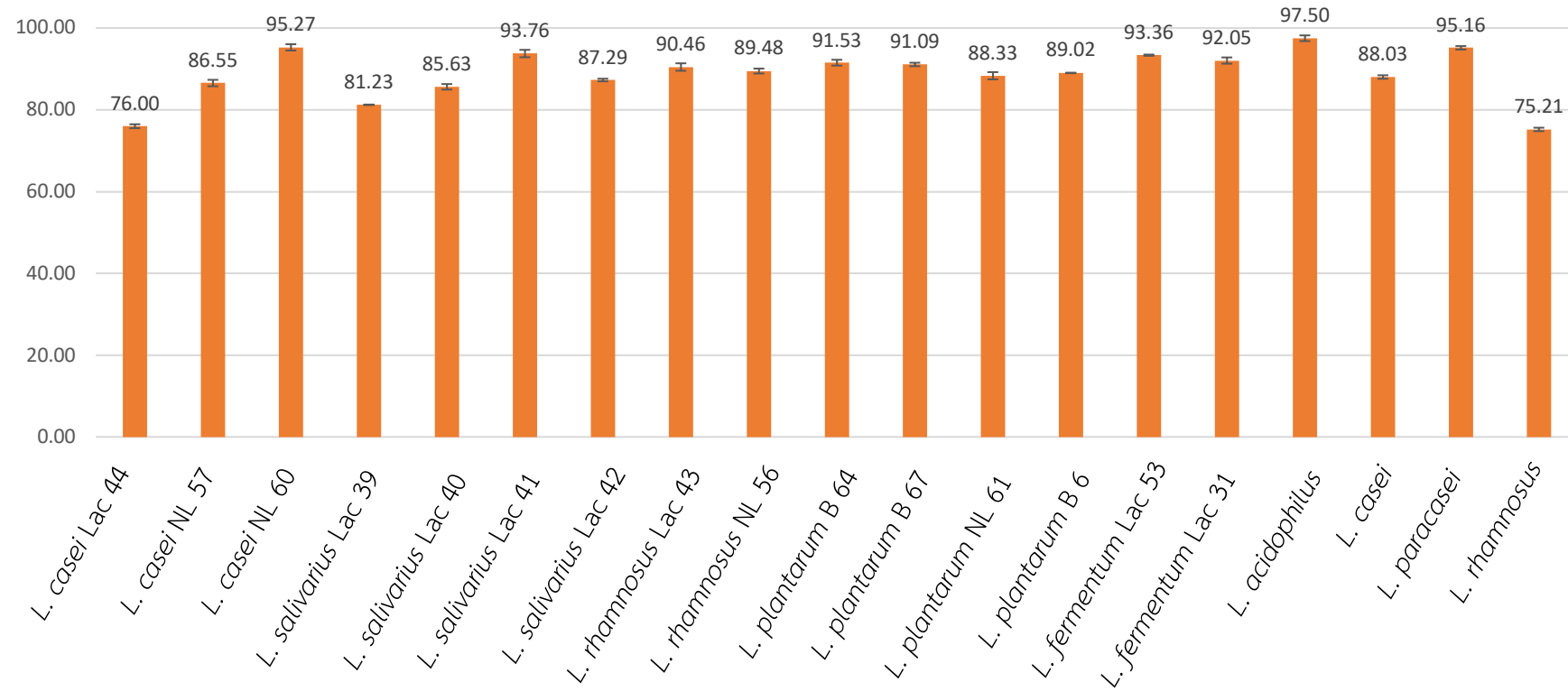
$$\text{อัตราการอยู่รอด} = \frac{\log_{10} \text{ของค่าเฉลี่ยโพรไบโอติกส์ในหน่วย CFU/ml ในสภาวะทนกรด ที่เวลา 3 ชั่วโมง}}{\log_{10} \text{ของค่าเฉลี่ยโพรไบโอติกส์ในหน่วย CFU/ml ในสภาวะควบคุม ที่เวลา 3 ชั่วโมง}} \times 100$$

สูตรดังกล่าวอ้างอิงจากการคำนวณของ Cano R. (2014)

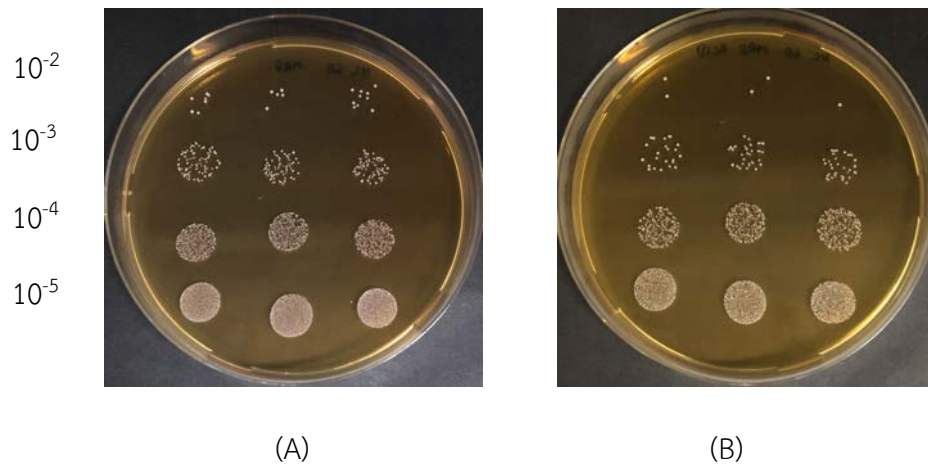
ตารางที่ 4.1. ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะกรด พีเอช 3 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วย
เพาะเลี้ยงโดยวิธี drop plate ในสภาวะปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทุกการทดสอบดำเนินการ 3 ซ้ำ)

โพรไบโอติกส์ที่ทำการทดสอบ	ค่า pH	การเจือจาง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ± SD	CFU/ml	อัตรา การอยู่รอด
<i>L. acidophilus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	3	10 ⁻⁴	7.33 ± 5.03	7.3×10 ⁴	97.5%
	control	10 ⁻⁴	9.67 ± 5.13	9.7×10 ⁴	
<i>L. casei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	3	10 ⁻³	9.00 ± 2.65	9.0×10 ⁵	88.03
	control	10 ⁻³	58.67 ± 9.29	5.8×10 ⁶	
<i>L. paracasei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	3	10 ⁻³	34.00 ± 2.65	3.4×10 ⁴	95.16%
	control	10 ⁻³	73.00 ± 4.00	7.3×10 ⁶	
<i>L. rhamnosus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	3	10 ⁻²	1.67 ± 1.15	1.7×10 ⁵	75.21%
	control	10 ⁻⁴	9.00± 2.65	9.0×10 ⁶	
<i>L. casei</i> Lac 44	3	10 ⁻⁴	6.00 ± 3.00	6.0×10 ⁵	76.00%
	control	10 ⁻³	39.67 ± 3.79	4.0×10 ⁷	
<i>L. casei</i> NL57	3	10 ⁻³	37.67 ± 6.11	3.8×10 ⁶	86.55%
	control	10 ⁻⁴	39.67 ± 8.33	4.0×10 ⁷	
<i>L. casei</i> NL 60	3	10 ⁻⁴	28.67 ± 5.86	2.9×10 ⁷	95.27%
	control	10 ⁻⁴	68.33 ± 5.86	6.8×10 ⁷	
<i>L. salivarius</i> Lac 39	3	10 ⁻²	29.33 ± 1.15	2.9×10 ⁵	81.23%
	control	10 ⁻³	5.33 ± 2.31	5.3×10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 40	3	10 ⁻⁴	7.67 ± 4.73	7.7×10 ⁶	85.63.%
	control	10 ⁻⁵	11.00 ± 5.57	1.1×10 ⁸	
<i>L. salivarius</i> Lac 41	3	10 ⁻³	17.67 ± 8.02	1.8×10 ⁶	93.75%
	control	10 ⁻³	47.33 ± 6.81	4.7×10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 42	3	10 ⁻³	14.33 ± 2.08	1.4×10 ⁶	87.29%
	control	10 ⁻⁴	10.67 ± 1.15	1.1×10 ⁷	

<i>L. rhamnosus</i> Lac 43	3	10^{-2}	26.00 ± 8.19	2.6×10^5	90.46%
	control	10^{-3}	9.67 ± 2.52	9.7×10^5	
<i>L. rhamnosus</i> NL56	3	10^{-3}	6.33 ± 2.52	4.9×10^6	89.48%
	control	10^{-4}	29.50 ± 0.71	3.0×10^7	
<i>L. plantarum</i> B 64	3	10^{-3}	15.67 ± 5.13	1.6×10^6	79.76%
	control	10^{-3}	60.33 ± 1.53	6.0×10^6	
<i>L. plantarum</i> B 67	3	10^{-3}	91.33 ± 6.66	1.4×10^7	91.09%
	control	10^{-4}	63.00 ± 4.24	7.00×10^7	
<i>L. plantarum</i> B 6	3	10^{-4}	2.33 ± 1.15	2.3×10^6	89.02%
	control	10^{-4}	14.00 ± 5.29	1.4×10^7	
<i>L. fermentum</i> NL 53	3	10^{-5}	11.00 ± 1.41	1.1×10^8	93.36%
	control	10^{-5}	41.33 ± 27.23	4.1×10^8	
<i>L. plantarum</i> NL 61	3	10^{-3}	22.67 ± 7.77	2.3×10^6	88.33%
	control	10^{-4}	15.67 ± 1.15	1.6×10^7	
<i>L. fermentum</i> Lac31	3	10^{-3}	10.33 ± 5.77	1.0×10^6	92.05%
	control	10^{-3}	33.33 ± 2.89	3.3×10^6	



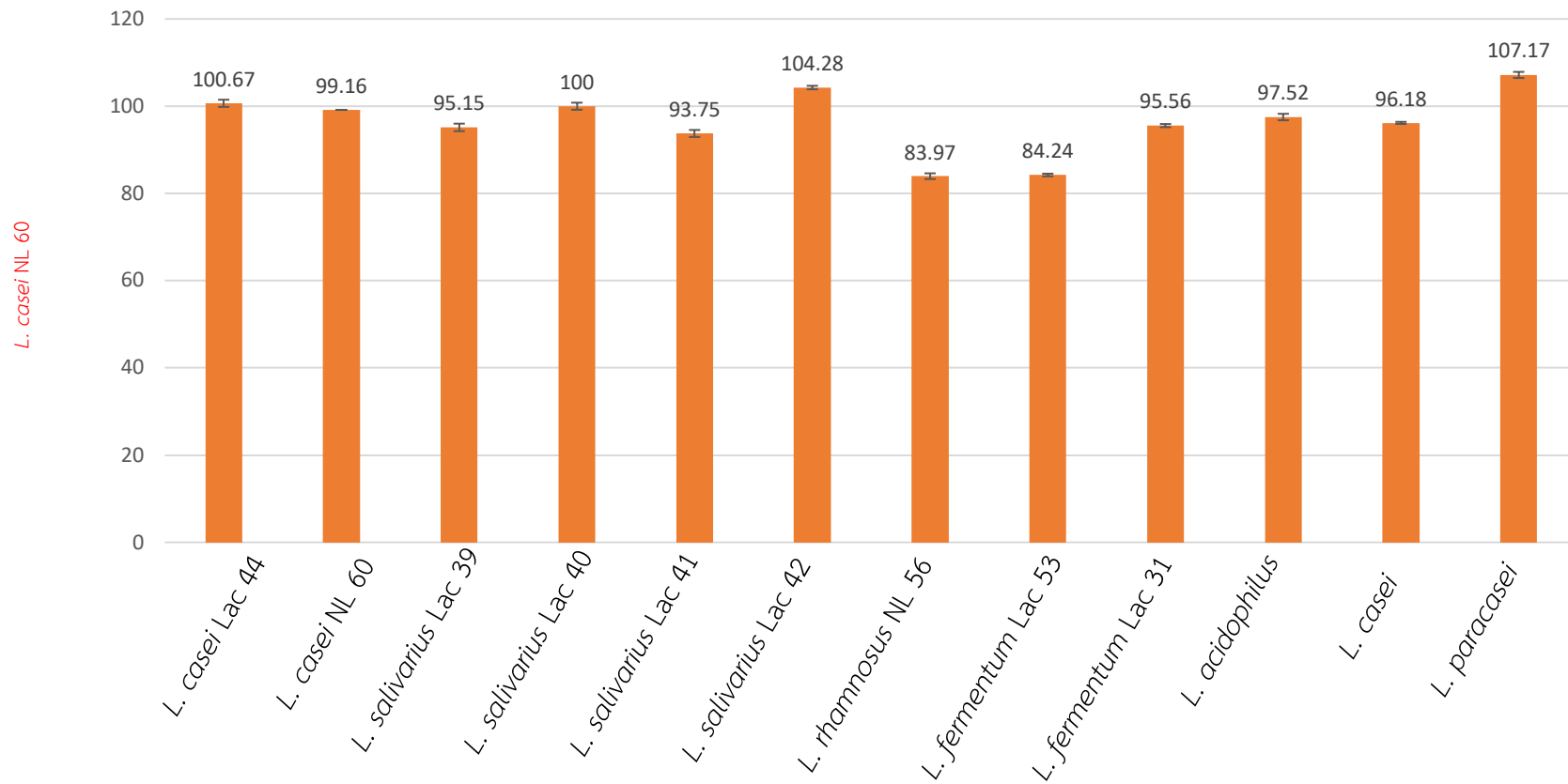
รูปที่ 4.1 ตัวอย่างภาพความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะกรด (พีเอช 3) ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและสายพันธุ์ทางการค้า (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* และ *L. rhamnosus*)



รูปที่ 4.2 ตัวอย่างจำนวนเชื้อของ *Lactobacillus casei* NL 60 ระหว่าง (A) อาหาร MRS pH 6.5 (ชุดควบคุม) และ (B) อาหาร MRS pH 3 หลังการเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยวิธี drop plate ที่ระดับการเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-5} บันทึกผลการทดลองหลังบ่มที่ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะกรด พีเอช 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วย
เพาะเลี้ยงโดยวิธี drop plate ในสภาวะปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทุกการทดสอบดำเนินการ 3 ซ้ำ)

โพรไบโอติกส์ที่ทำการทดสอบ	ค่า pH	การเจือจาง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ± SD	CFU/ml	อัตราการอยู่รอด
<i>L. acidophilus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	5	10 ⁻⁴	7.33 ± 5.51	7.3x10 ⁴	97.52%
	control	10 ⁻⁴	9.67 ± 4.16	9.7x10 ⁴	
<i>L. casei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	5	10 ⁻³	32.00 ± 1.00	3.2x10 ⁶	96.18%
	control	10 ⁻³	58.67 ± 9.29	5.8x10 ⁶	
<i>L. paracasei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	5	10 ⁻³	10.00 ± 5.00	1.0x10 ⁷	107.17
	control	10 ⁻³	34.00 ± 2.65	3.4x10 ⁶	
<i>L. casei</i> Lac 44	5	10 ⁻⁴	44.67 ± 6.66	4.5x10 ⁷	100.67%
	control	10 ⁻³	39.67 ± 3.79	4.0x10 ⁷	
<i>L. casei</i> NL 60	5	10 ⁻⁴	7.00 ± 2.00	7.0x10 ⁶	99.16%
	control	10 ⁻⁴	8.00 ± 2.65	8.0x10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 39	5	10 ⁻²	24.67 ± 7.23	2.5x10 ⁶	95.15%
	control	10 ⁻³	5.33 ± 2.31	5.3x10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 40	5	10 ⁻⁵	10.67 ± 6.51	1.1x10 ⁸	100.00%
	control	10 ⁻⁵	11.00 ± 5.57	1.1x10 ⁸	
<i>L. salivarius</i> Lac 41	5	10 ⁻³	17.67 ± 8.02	1.8x10 ⁶	93.75%
	control	10 ⁻³	47.33 ± 6.81	4.7x10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 42	5	10 ⁻³	21.67 ± 2.52	2.2x10 ⁷	104.28%
	control	10 ⁻⁴	10.67 ± 1.15	1.1x10 ⁷	
<i>L. rhamnosus</i> NL56	5	10 ⁻³	18.67 ± 4.51	1.9x10 ⁶	83.97%
	control	10 ⁻⁴	29.50 ± 0.71	3.0x10 ⁷	
<i>L. fermentum</i> NL 53	5	10 ⁻⁴	18.00 ± 1.00	1.8x10 ⁷	84.24%
	control	10 ⁻⁵	41.33 ± 27.23	4.1x10 ⁸	
<i>L. fermentum</i> Lac31	5	10 ⁻³	28.33 ± 2.31	2.8x10 ⁸	95.57%
	control	10 ⁻⁵	69.67 ± 0.58	6.9x10 ⁸	



รูปที่ 4.3 ตัวอย่างภาพความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะกรด (พีเอช 5) ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและสายพันธุ์ทางการค้า (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* และ *L. rhamnosus*)

4.1.2. ความสามารถในการทนน้ำดี

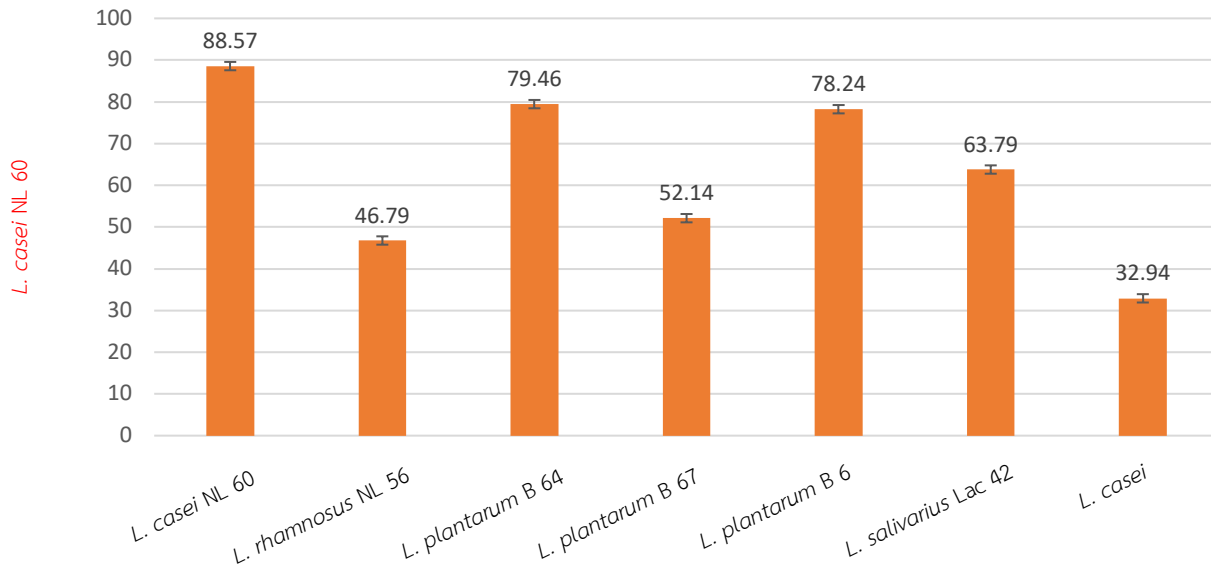
จากผลการทดสอบความทนน้ำดีของโพรไบโอติกส์ในอาหารเหลว MRS ที่ผสมน้ำดีความเข้มข้น 0.3 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเทียบกับชุดควบคุม (อาหารเหลว MRS พีเอชประมาณ 6.5) พบว่าเมื่อนำเชื้อมาทำการ drop plate เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบ พบว่า โพรไบโอติกส์ที่นำมาทดสอบ 17 สายพันธุ์ มีเพียง 7 สายพันธุ์ที่สามารถอยู่รอดภายใต้สภาวะน้ำดี ได้แก่ โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก *L. casei* (NL 60), *L. rhamnosus* (NL 56), *L. plantarum* (B 6, B 64 และ B 67) และ *L. salivarius* (Lac 42) สำหรับสายพันธุ์อ้างอิงพบเพียง *L. casei* โดยมีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 32.98% – 88.57% (ดังตารางที่ 4.3) โดยโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก *L. plantarum* B 64 มีอัตราการอยู่รอดได้มากที่สุด โดยมีอัตราการอยู่รอด 79.46% และสายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* มีอัตราการอยู่รอดที่ 32.98%

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะน้ำดี เข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วยเพาะเลี้ยงโดยวิธี drop plate ในสภาวะปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทุกการทดสอบ ดำเนินการ 3 ซ้ำ)

โพรไบโอติกส์ที่ทำการทดสอบ	ค่าความเข้มข้นน้ำดี	การเจือจาง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ± SD	CFU/ml	อัตราการอยู่รอด
<i>L. acidophilus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻⁴	9.67 ± 5.13	9.7×10 ⁴	
<i>L. casei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	0.3% bile				32.98%
	control	10 ⁻³	58.67 ± 9.29	5.8×10 ⁶	
<i>L. paracasei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻³	73.00 ± 4.00	7.3×10 ⁶	
<i>L. rhamnosus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻⁴	9.00± 2.65	9.0×10 ⁶	
<i>L. casei</i> Lac 44	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻³	39.67 ± 3.79	4.0×10 ⁷	
<i>L. casei</i> NL 60	0.3% bile	10 ⁻⁴	1.67 ± 1.15	1.7×10 ²	32.94%
	control	10 ⁻⁴	58.67 ± 9.29	5.9×10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 39	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻³	5.33 ± 2.31	5.3×10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 40	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻⁵	11.00 ± 5.57	1.1×10 ⁸	

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกส์หลังบ่มภายใต้สภาวะน้ำดี เข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วยเพาะเลี้ยงโดยวิธี drop plate ในสภาวะปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทุกการทดสอบ ดำเนินการ 3 ซ้ำ)

โพรไบโอติกส์ที่ทำการทดสอบ	ค่าความเข้มข้นน้ำดี	การเจือจาง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ± SD	CFU/ml	อัตราการอยู่รอด
<i>L. salivarius</i> Lac 41	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻³	47.33 ± 6.81	4.7×10 ⁶	
<i>L. salivarius</i> Lac 42	0.3% bile	10 ⁻³	30.67 ± 4.04	3.1×10 ⁴	63.79%
	control	10 ⁻⁴	10.67 ± 1.15	1.1×10 ⁷	
<i>L. rhamnosus</i> Lac 43	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻³	7.67 ± 2.52	7.7×10 ⁵	
<i>L. rhamnosus</i> NL56	0.3% bile	undilute	-	8.0×10 ² -	46.79%
	control	10 ⁻⁴	8.00 ± 4.36	1.6×10 ⁶	
<i>L. casei</i> NL58	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻⁴	4.67 ± 1.53	4.7×10 ⁶	
<i>L. plantarum</i> B 64	0.3% bile	10 ⁻²	77.67 ± 32.08	7.8×10 ⁵	79.46%
	control	10 ⁻⁴	25.67 ± 3.06	2.6×10 ⁷	
<i>L. plantarum</i> B 67	0.3% bile	10 ⁻⁴	1.67 ± 0.58	1.7×10 ⁴	52.14%
	control	10 ⁻⁴	14.33 ± 10.12	1.4×10 ⁸	
<i>L. plantarum</i> B 6	0.3% bile	10 ⁻⁴	39.00 ± 6.56	3.9×10 ⁵	78.24%
	control	10 ⁻⁴	14.00 ± 5.29	1.4×10 ⁷	
<i>L. fermentum</i> NL 53	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻⁵	41.33 ± 27.23	4.1×10 ⁸	
<i>L. fermentum</i> Lac31	0.3% bile	undilute	-	-	0%
	control	10 ⁻³	33.33 ± 2.89	3.3×10 ⁶	

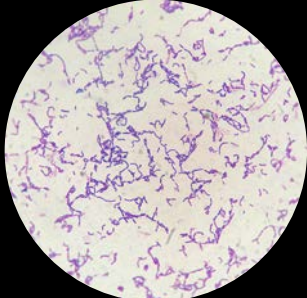
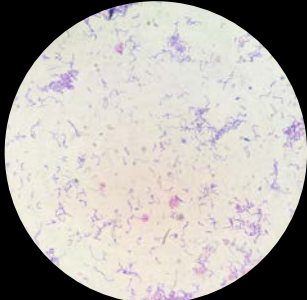
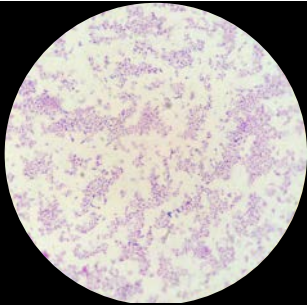


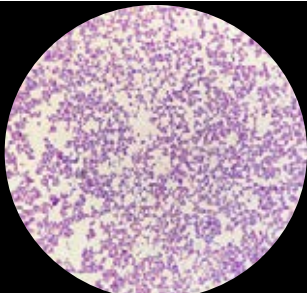
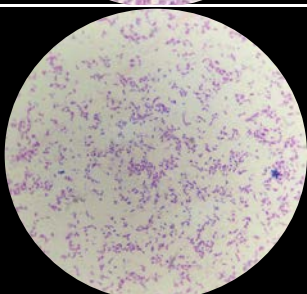
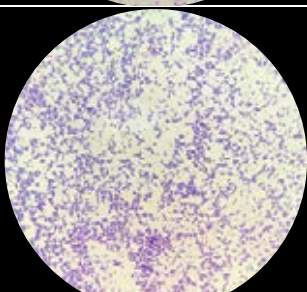
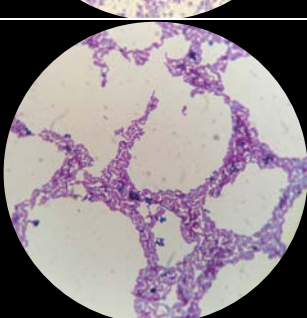
รูปที่ 4.4 ตัวอย่างภาพความสามารถในการอยู่รอดในน้ำดี ที่ความเข้มข้น 0.3% ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก และอ้างอิง

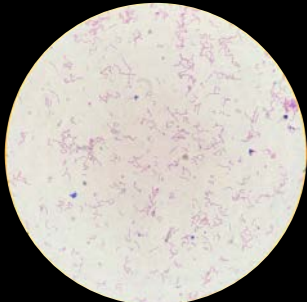
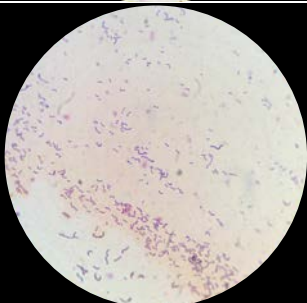
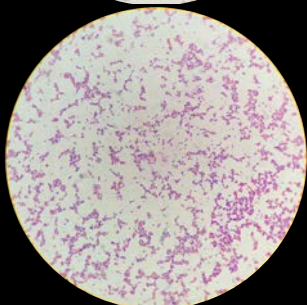
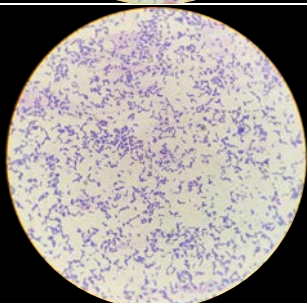
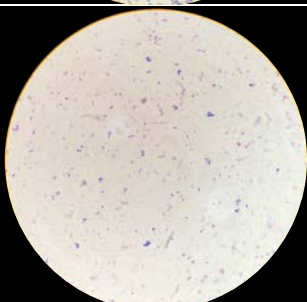
4.1.2. การย้อมแกรม

เมื่อทำการย้อมแกรม *Lactobacillus spp.* สายพันธุ์ทางคลินิกได้ พบว่ามีลักษณะเป็นแกรมบวก รูปร่างแท่ง ซึ่งลักษณะรูปร่างของ *Lactobacillus spp.* แตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์

ตารางที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Lactobacillus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100X

โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก	การย้อมแกรม
<i>L. casei</i> Lac44	
<i>L. casei</i> NL60	
<i>L. salivarius</i> Lac39	

<p><i>L. salivarius</i> Lac40</p>	
<p><i>L. salivarius</i> Lac41</p>	
<p><i>L. salivarius</i> Lac42</p>	
<p><i>L. rhamnosus</i> Lac43</p>	

<p><i>L. rhamnosus</i> NL56</p>	
<p><i>L. rhamnosus</i> NL58</p>	
<p><i>Lactobacillus plantarum</i> B64</p>	
<p><i>L. plantarum</i> B67</p>	
<p><i>L. fermentum</i> NL53</p>	

4.2. การศึกษาความเป็นปฏิกิริยาต่อแบคทีเรียทางผิวหนัง

4.2.1. *Staphylococcus epidermidis*

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *S. epidermidis* ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง โดยกำหนดความเข้มข้นของโพรไบโอติกส์ที่ใช้ทดสอบ ที่ 10^9 , 10^8 และ 10^7 CFU/ml และ ความเข้มข้นของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ 10^8 CFU/ml ให้ผลการยับยั้งตามตารางที่ 4.5 พบว่า โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก ได้แก่ *Lactobacillus salivarius* Lac 41 และ Lac 42, *Lactobacillus plantarum* B 6, B 64 และ B67 และ *Lactobacillus fermentum* Lac 31 และ NL 53 และสายพันธุ์อ้างอิง *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* และ *Lactobacillus rhamnosus* สามารถยับยั้ง *S. epidermidis* แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (คำนวณจาก ONE-WAY ANOVA TEST โดยค่า $p < 0.05$)

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* โดยโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง

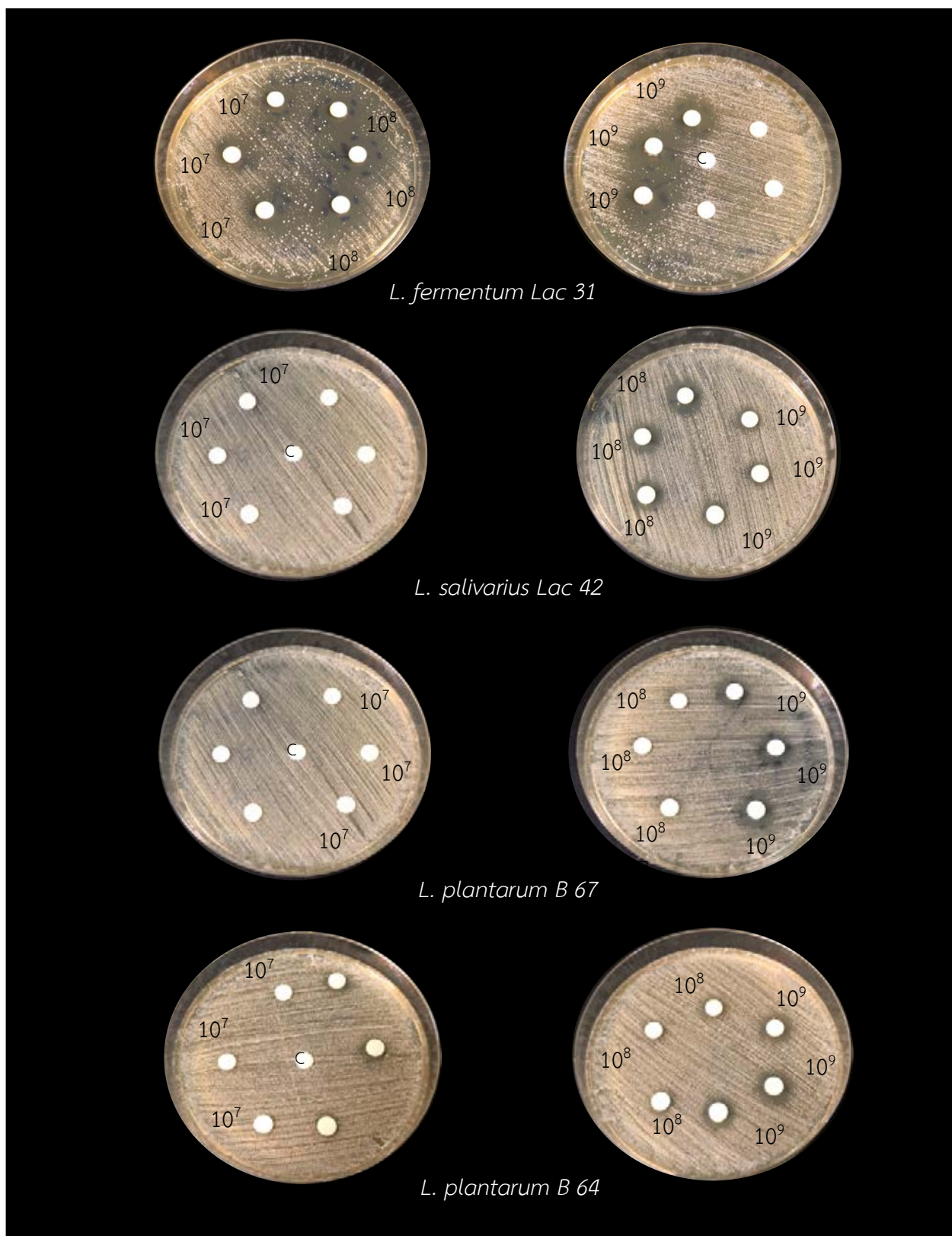
สายพันธุ์โพรไบโอติกส์ตัวอย่าง	จำนวนเซลล์ตั้งต้น (CFU/ml)	<i>S. epidermidis</i> (mm.)
Control (MRS broth 10 ไมโครลิตร)	0	6.0 ± 0.0
<i>L. acidophilus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. casei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	7.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. paracasei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	$8.0 \pm 0.0^*$
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	$8.7 \pm 0.6^*$
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. casei</i> Lac 44	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0

<i>L. casei</i> NL 60	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 39	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 40	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 41	10 ⁹	9.8 ± 0.3*
	10 ⁸	6.2 ± 0.3
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 42	10 ⁹	10.3 ± 0.6*
	10 ⁸	7.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> Lac 43	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> NL 56	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> NL 58	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> B 64	10 ⁹	9.7 ± 0.6*
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> B 67	10 ⁹	10.0 ± 0.0*
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0

<i>L. plantarum</i> NL 61	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> B 6	10 ⁹	9.0 ± 0.0*
	10 ⁸	8.3 ± 0.6*
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. fermentum</i> NL 53	10 ⁹	9.7 ± 2.1*
	10 ⁸	7.5 ± 0.5*
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. fermentum</i> Lac 31	10 ⁹	12.7 ± 1.2*
	10 ⁸	12.0 ± 1.0*
	10 ⁷	9.3 ± 0.6*

- ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

* ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งโดยโพรไบโอติกส์ตัวอย่างมีค่าแตกต่างจากค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ONE-WAY ANOVA TEST)



รูปที่ 4.5. ตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก ที่ปริมาตร 10 ไมโครลิตรบนแผ่น disc ต่อ *S. epidermidis* โดย C แทน อาหาร MRS ที่ไม่มีโพรไบโอติกส์, 10^9 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^9 CFU/ml, 10^8 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml และ 10^7 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^7 CFU/ml

4.2.2. *Staphylococcus aureus*

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *S. aureus* ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยกำหนดความเข้มข้นของโพรไบโอติกส์ที่ใช้ทดสอบ ที่ 10^9 , 10^8 และ 10^7 CFU/ml และ ความเข้มข้นของเชื้อ *S. aureus* ที่ 10^8 CFU/ml จากผลการยับยั้งตามตารางที่ 4.6. พบว่า โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก *Lactobacillus salivarius* Lac 41 *Lactobacillus plantarum* B 6 และ *Lactobacillus fermentum* NL 53 และสายพันธุ์อ้างอิง *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus rhamnosus* ให้ผลการยับยั้งแตกต่างกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) แต่ *L. plantarum* B 64 ให้ลักษณะการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้เล็กน้อย

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง

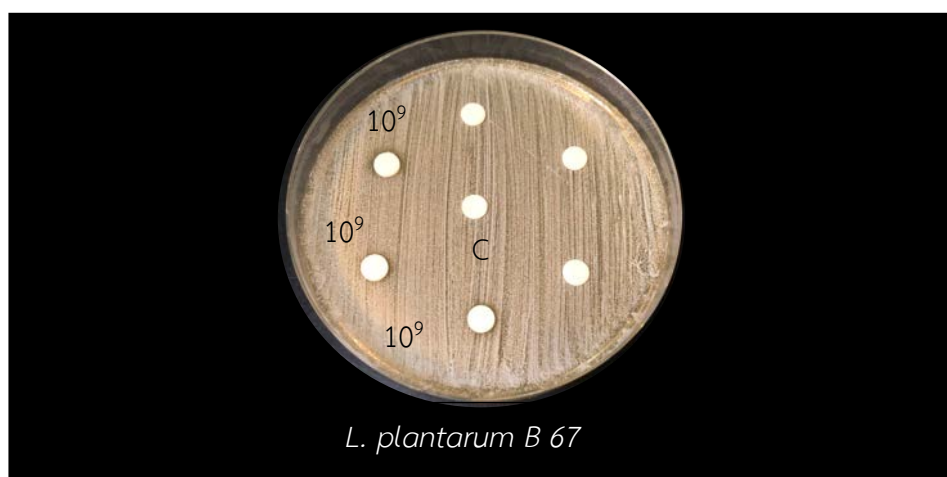
<i>Lactobacillus</i> strain	จำนวนเซลล์ตั้งต้น CFU/ml	<i>S. aureus</i> (mm)
Control (MRS broth 10 ไมโครลิตร)	0	6.0 ± 0.0
<i>L. acidophilus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. casei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	$20.3 \pm 1.5^*$
	10^8	$17.3 \pm 2.1^*$
	10^7	$10.0 \pm 1.7^*$
<i>L. paracasei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	$17.7 \pm 1.5^*$
	10^8	$15.2 \pm 0.8^*$
	10^7	$11.7 \pm 2.1^*$
<i>L. casei</i> Lac 44	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0

<i>L. casei</i> NL 60	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 39	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 40	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 41	10^9	$8.5 \pm 0.5^*$
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. salivarius</i> Lac 42	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> Lac 43	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> NL 56	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> NL 58	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> B 64	10^9	7.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> B 67	10^9	7.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0

<i>L. plantarum</i> NL 61	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> B 6	10^9	$17.3 \pm 0.6^*$
	10^8	$8.8 \pm 0.3^*$
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. fermentum</i> NL 53	10^9	$8.0 \pm 1.0^*$
	10^8	6.5 ± 0.5
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. fermentum</i> Lac 31	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0

- ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

* ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งโดยโพรไบโอติกส์ตัวอย่างมีค่าแตกต่างจากค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ONE-WAY ANOVA TEST)



รูปที่ 4.6 ตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิก ที่ปริมาตร 10 ไมโครลิตรบนแผ่น disc ต่อ *S. aureus* โดย C แทน อาหาร MRS ที่ไม่มีโพรไบโอติกส์, 10^9 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^9 CFU/ml

4.2.3. *Propionibacterium acne*

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *P. acne* ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยกำหนดความเข้มข้นของโพรไบโอติกส์ที่ใช้ทดสอบ ที่ 10^9 , 10^8 และ 10^7 CFU/ml และ ความเข้มข้นของเชื้อ *P. acne* ที่ 10^8 CFU/ml จากผลการยับยั้งตามตารางที่ 4.7 พบโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกที่ทำการทดสอบ 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์อ้างอิง *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus rhamnosus* ให้ผลการยับยั้ง *P. acne* ได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P < 0.05$)

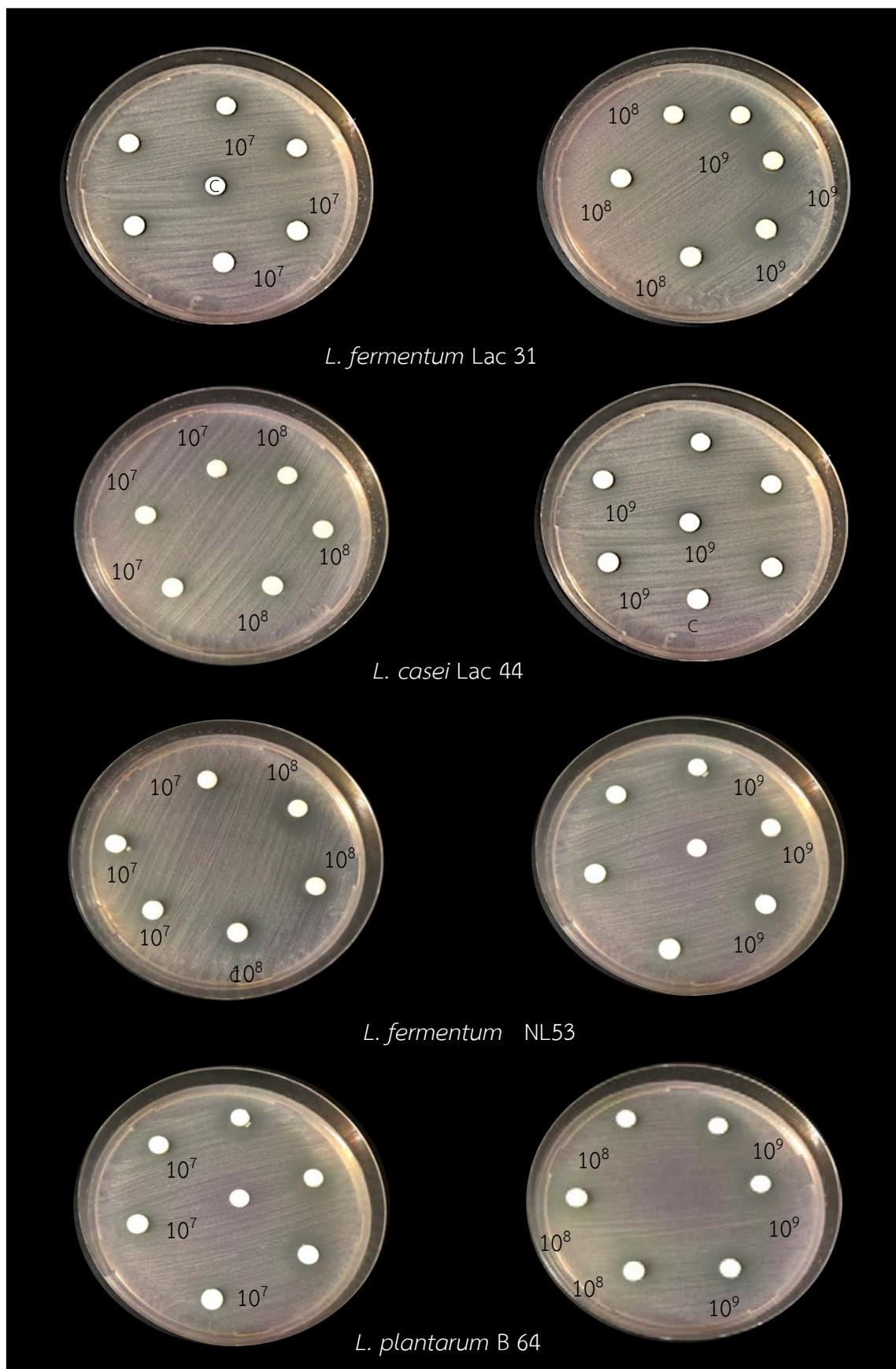
ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *P. acne* โดยโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง

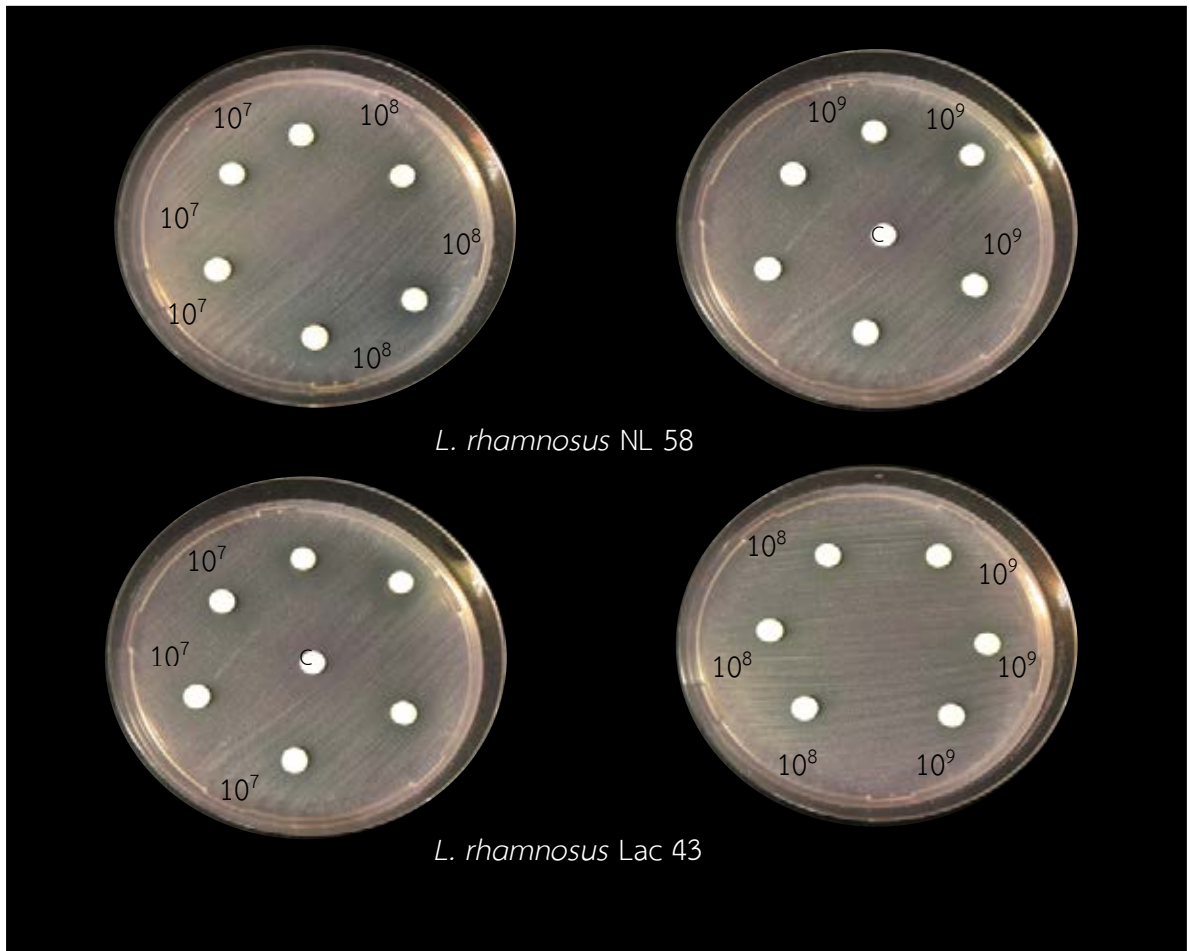
<i>Lactobacillus</i> strain	จำนวนเซลล์ตั้งต้น CFU/ml	<i>P. acne</i> (mm)
Control (MRS broth 10 ไมโครลิตร)	0	6.0 ± 0.0
<i>L. acidophilus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. casei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	$10.0 \pm 0.0^*$
	10^8	$9.0 \pm 1.0^*$
	10^7	7.7 ± 0.6
<i>L. paracasei</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	6.0 ± 0.0
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> (สายพันธุ์อ้างอิง)	10^9	$8.5 \pm 1.8^*$
	10^8	$8.7 \pm 0.6^*$
	10^7	7.7 ± 0.6
<i>L. casei</i> Lac 44	10^9	$8.3 \pm 0.6^*$
	10^8	6.0 ± 0.0
	10^7	6.0 ± 0.0
<i>L. rhamnosus</i> Lac 43	10^9	$8.7 \pm 0.6^*$
	10^8	7.0 ± 0.0
	10^7	7.0 ± 0.0

<i>L. rhamnosus</i> NL 58	10 ⁹	10.0 ± 1.7*
	10 ⁸	9.0 ± 0.0*
	10 ⁷	8.0 ± 1.0*
<i>L. plantarum</i> B 64	10 ⁹	10.0 ± 1.1*
	10 ⁸	9.7 ± 0.6*
	10 ⁷	7.0 ± 1.0
<i>L. plantarum</i> B 6	10 ⁹	6.0 ± 0.0
	10 ⁸	6.0 ± 0.0
	10 ⁷	6.0 ± 0.0
<i>L. fermentum</i> Lac 31	10 ⁹	11.3 ± 0.6*
	10 ⁸	10.7 ± 0.6*
	10 ⁷	9.6 ± 0.6*
<i>L. fermentum</i> NL53	10 ⁹	10.0 ± 1.0*
	10 ⁸	9.7 ± 1.2*
	10 ⁷	8.0 ± 1.0*

- ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

* ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งโดยโพรไบโอติกส์ตัวอย่างมีค่าแตกต่างจากค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ONE-WAY ANOVA TEST)





รูปที่ 4.7. ตัวอย่างผลการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางการคลินิก ที่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนแผ่น disc ต่อ *P. acne* โดย C แทน อาหาร MRS ที่ไม่มีโพรไบโอติกส์, 10^9 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^9 CFU/ml, 10^8 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml และ 10^7 แทนจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^7 CFU/ml

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

โพรไบโอติกส์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพดีให้กับมนุษย์ในหลายด้าน โดยเฉพาะเมื่อนำมาบริโภค จากการศึกษาทางด้านคลินิกยืนยันประสิทธิภาพของโพรไบโอติกส์ ในการรักษาโรคต่างๆ อาทิ โรคอ้วน โรคเกี้ยวภูมิแพ้ เช่น โรคภูมิแพ้ผิวหนัง นอกจากนี้ยังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (Paulina, M. และ Slizewska, K, 2017) ซึ่งความสามารถของโพรไบโอติกส์จะแสดงออกได้ดีเมื่อจุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนภายในลำไส้ได้ การที่จะเจริญเพิ่มจำนวนในลำไส้ได้นั้นโพรไบโอติกส์ต้องผ่านกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเป็นกรดและมีน้ำดีที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอาหารรวมทั้งจุลินทรีย์ต่างๆ โพรไบโอติกส์จึงต้องมีความสามารถในการอยู่รอด เพื่อไปยังที่บริเวณเยื่อลำไส้และเจริญเพิ่มจำนวน อ้างอิงถึงงานวิจัยที่ทำการทดสอบความสามารถในการทนกรดของ โพรไบโอติกส์ได้จำลองลักษณะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารโดยปรับสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเป็นกรดที่ pH 2 และ pH 3 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Prasad J., et al., 1998). รวมทั้งการศึกษากการทนกรดของเชื้อโพรไบโอติกส์ของ Liong และ Shah ได้กำหนดสภาวะความเป็นกรดที่ pH 3 เป็นมาตรฐานในการศึกษากการทนกรดของโพรไบโอติกส์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ pH 3 ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมงมาทำทดสอบ จากผลการทดสอบการทนกรดของโพรไบโอติกส์ทางคลินิกและอ้างอิง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการอยู่รอดจากสภาวะความเป็นกรด สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิงสามารถทนสภาวะกรดได้ดี และมีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกัน โดยมีอัตราการอยู่รอดที่ร้อยละ 75.21 – 97.50 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shehata พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม lactic acid bacteria มีอัตราการรอด 68–88.3% ในสภาวะกรดที่ pH 2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Shehata, 2016) ซึ่งถือว่า *Lactobacillus* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ทำการทดสอบมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าการทดลองของ Shehata และคณะ จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดที่ pH 3 ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของโพรไบโอติกส์ จึงสรุปได้ว่าโพรไบโอติกส์สายพันธุ์คลินิกและอ้างอิงที่ทดสอบมีคุณสมบัติของความเป็นโพรไบโอติกส์ในด้านการทนกรด

การทดสอบการทนน้ำดีเป็นหนึ่งในประเมินคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ เนื่องจากว่าโพรไบโอติกส์นั้นต้องสามารถทนต่อน้ำดีในกระเพาะอาหาร (WHO, 2016) เพื่อให้โพรไบโอติกส์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนลำไส้เล็กและส่งผลกระทบต่อสุขภาพเจ้าบ้าน ผลจากการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิง พบว่าโพรไบโอติกส์ที่ทำการทดสอบส่วนใหญ่ไม่สามารถการทนน้ำดีได้ ยกเว้น โพรไบโอติกส์สายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* NL 60, *L. rhamnosus* NL 56, *L. plantarum* B 6, B 64 และ B 67 และ *L. salivarius* Lac 42 และสายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* โดยมีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 32.98 – 88.57 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Hassanzadazar et al. (2012) ที่พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* และ *L. casei* บางสายพันธุ์ไม่สามารถทนน้ำดีได้ เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับน้ำดี ทำให้เกิดการขัดขวางภาวะสมดุลของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้เกิดการแยกชั้นของชั้นไขมัน (lipid bilayer) และโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดภาวะเซลล์รั่วและทำให้เซลล์ตายได้

อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนกรดและทนน้ำดีที่ทดสอบเพื่อประเมินคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ให้เป็นไปตามเกณฑ์ของ WHO/FAO ซึ่งการนำโพรไบโอติกส์ไปประยุกต์ใช้บนผิวหนังซึ่งสภาพผิวหนังมีค่า pH ประมาณ 4.7 ถึง 5.75 รวมทั้งไม่มีส่วนประกอบของน้ำดี อาจทำให้การทดสอบการทนกรด ที่ pH 3 และทนน้ำดีนี้ไม่จำเป็นต่อการนำโพรไบโอติกส์ไปประยุกต์ใช้บนผิวหนัง

อย่างไรก็ตามในการทดสอบความเป็นกรดที่ pH 5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดใกล้เคียงกับสภาพผิวหนัง พบว่าทั้งโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ทางคลินิกและอ้างอิงมีอัตราการอยู่รอดสูง (ร้อยละ 84.24 -107.17) ซึ่งเป็นผลมาจากความสามารถในการเจริญของแลคติกแบคทีเรียในค่า pH ต่างๆ โดยค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 5.4 – 5.8 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Salminen et al., 2004) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Mayano และคณะ (2008) พบว่าแลคติกแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากไส้กรอกแห้ง สามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH 5 และ 5.5 โดยมีความสามารถในการรอด 34.6% โดยมีจำนวนแบคทีเรียที่ 10^6 - 10^8 CFU/g ดังนั้นจากความสามารถในการอยู่รอดต่อกรดที่ pH 5 นี้ จึงอาจสามารถนำโพรไบโอติกส์มาประยุกต์ใช้บนผิวหนังได้

เนื่องจากผิวหนังประกอบไปด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกัน แบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าส่งผลกระทบเชิงบวกแก่ผิวหนังและส่งผลเสียรวมทั้งก่อให้เกิดโรคผิวหนัง การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีรายงานเชิงดีและไม่ดีบนผิวหนัง เป็นการประเมินคุณสมบัติหนึ่งเพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพในการรักษาสมดุลของไมโครไบโอมรวมทั้งส่งเสริมสุขภาพผิว

ในการทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ส่งเสริมสุขภาพผิว *S. epidermidis* ของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์อ้างอิง พบว่า *L. paracasei* และ *L. rhamnosus* ที่ความเข้มข้นที่ 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *S. epidermidis* และสายพันธุ์ทางคลินิก 7 สายพันธุ์ *Lactobacillus* ได้แก่ *L. fermentum* lac 31 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร *L. fermentum* NL 53 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^8 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร *L. salivarius* Lac 41, *L. salivarius* Lac 42 และ *L. plantarum* B6, *L. plantarum* B64 และ *L. plantarum* B67 ที่ความเข้มข้น 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* ดังนั้นโพรไบโอติกส์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. epidermidis* อาจไม่เหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้บนผิวหนัง เนื่องจากยับยั้ง *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ดีและไม่ก่อให้เกิดโรคในคนในสภาวะปกติ (Byrd, A. et al. (2018) แต่อย่างไรก็ตามผลในการยับยั้ง *S. epidermidis* จะพบเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตรเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นหากเลือกใช้โพรไบโอติกส์ในอัตราความเข้มข้นที่น้อยลงกว่าที่พบการยับยั้งการเจริญนั้นอาจไม่ส่งผลเสียต่อ *S. epidermidis* ทำให้เชื้อโพรไบโอติกส์สามารถนำไปใช้ได้ในการดูแลสุขภาพผิวได้

ในขณะที่โพรไบโอติกส์สายพันธุ์คลินิก *L. fermentum* lac 31 และ NL 53, *L. rhamnosus* NL 58 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร *L. plantarum* B 64 และ *L. rhamnosus* lac 43 ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^8 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ *L. casei* lac 44 ที่ความเข้มข้น 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* และ *L. rhamnosus* ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^8 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. acne* สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Shokryazdan และคณะ. (2014) พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย *Lactobacilli* ให้ผลการยับยั้ง *P. acne* ที่ระหว่าง 3.3 ถึง 16.5 มิลลิเมตร จากผลการยับยั้ง *P. acne* นี้ แสดง

ให้เห็นว่าโพรไบโอติกส์สามารถสร้างสารซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังซึ่งอาจเป็นผลมาจากซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ อาทิ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ bacteriocins (Shokryazdan, Sieo et al. 2014)

นอกจากนี้การยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* พบโพรไบโอติกส์สายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* และ *L. rhamnosus* ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์คลินิก *L. plantarum* B 64 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^8 - 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร *L. salivarius* Lac 41, *L. fermentum* NL 53 ที่ความเข้มข้น 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มในการยับยั้ง *S. aureus* ของ *L. plantarum* B 64 ที่ความเข้มข้น 10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค สามารถพบได้ตามผิวหนัง อีกทั้งยังมีรายงานว่าสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด (Lolou V. และ Panayiotidis MI, 2019) ดังนั้น โพรไบโอติกส์จึงเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่สามารถประยุกต์ใช้ในการรักษาและบำบัดผิวได้

จากผลการทดลองยังเป็นความรู้เบื้องต้นในการช่วยให้ทราบและเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่ควรใช้ต่อในการส่งเสริมสุขภาพผิวในแต่ละด้าน เช่น ลดการเกิดสิว โดยการเลือกใช้โพรไบโอติกส์ *L. casei* lac 44, *L. rhamnosus* lac 43 และ NL58 ที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ที่มีศักยภาพในการ *P. acne* แต่ไม่ยับยั้ง *S. epidermidis* หรือ ลดความรุนแรงของอาการแพ้ของผิวหนังเนื่องจาก *S. aureus* โดยเลือกใช้โพรไบโอติกส์สายพันธุ์อ้างอิง *L. casei* ที่สามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* และ *P. acne* ในการบำบัดสุขภาพผิวแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เตตระไซคลิน, คลินดาไมซิน, อิริโทรมัยซินที่ใช้ในการรักษาอยู่ในปัจจุบันเป็นต้น (Dreno 2004)

เอกสารอ้างอิง

- Blanchet-Réthoré, S., et al. (2017). "Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis." Clinical, cosmetic and investigational dermatology 10: 249-257.
- Brüggemann, H., et al. (2004). "The Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Acnes*, a Commensal of Human Skin." Science 305(5684): 671-673.
- Byrd, A. L., et al. (2018). "The human skin microbiome." Nature Reviews Microbiology 16: 143.
- Cohn, B. A. (1994). "In Search of Human Skin Pheromones." Archives of Dermatology 130(8): 1048-1051.
- Di Marzio, L., et al. (2003). "Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on stratum corneum ceramide levels and signs and symptoms of atopic dermatitis patients." Experimental Dermatology 12(5): 615-620.
- Dreno, B. (2004). "Topical Antibacterial Therapy for Acne Vulgaris." Drugs 64(21): 2389-2397.
- Gionchetti, P., et al. (2000). "Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology 119(2): 305-309.
- Glück, U. and J.-O. Gebbers (2019). Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*)
- Grice, E. A., et al. (2009). "Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome." Science 324(5931): 1190-1192.
- Grice, E. A. and J. A. Segre (2011). "The skin microbiome." Nature Reviews Microbiology 9: 244.
- Gritz, E. C. and V. Bhandari (2015). "The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review." Frontiers in Pediatrics 3(17).
- Huang, J. T., et al. (2009). "Treatment of *Staphylococcus aureus* Colonization in Atopic Dermatitis Decreases Disease Severity." Pediatrics 123(5): e808-e814.
- Iwase, T., et al. (2010). "*Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization." Nature 465: 346.
- Nakatsuji, T., et al. (2017). "Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis." Science Translational Medicine 9(378): eaah4680.

- Ouwehand, A. C., et al. (1999). "Probiotics: mechanisms and established effects." International Dairy Journal 9(1): 43-52.
- Prescott, S. L., et al. (2005). "Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon- γ responses in very young children with atopic dermatitis." Clinical & Experimental Allergy 35(12): 1557-1564.
- Ramsey, M. M., et al. (2016). "Staphylococcus aureus Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species." Frontiers in Microbiology 7(1230).
- Shokryazdan, P., et al. (2014). "Probiotic Potential of Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains." BioMed Research International 2014: 16.
- Shreiner, A. B., et al. (2015). "The gut microbiome in health and in disease." Current Opinion in Gastroenterology 31(1): 69-75.
- Tagami, H. (2008). "Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin." International Journal of Cosmetic Science 30(6): 413-434.
- Tang, W. H. W., et al. (2013). "Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk." New England Journal of Medicine 368(17): 1575-1584.
- Wollenberg, M. S., et al. (2014). "*Propionibacterium*-Produced Coproporphyrin III Induces *Staphylococcus aureus* Aggregation and Biofilm Formation." mBio 5(4): e01286-01214.
- Zipperer, A., et al. (2016). "Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization." Nature 535: 511.
- สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. (2556).
 โพรไบโอติกส์ : จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. ค้นเมื่อ 26 มิถุนายน 2561, จาก
<http://www.thaicam.go.th>

ภาคผนวก ก.

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Man, Rogosa and Sharp (MRS)

ประกอบด้วย

Proteose peptone	10.0	กรัม/ลิตร
Beef extract	10.0	กรัม/ลิตร
Yeast extract	5.0	กรัม/ลิตร
Dextrose	20.0	กรัม/ลิตร
Polysorbate 80	1.0	มิลลิลิตร/ลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม/ลิตร
Sodium acetate	5.0	กรัม/ลิตร
Magnesium sulphate	0.1	กรัม/ลิตร
Manganese sulphate	0.05	กรัม/ลิตร
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม/ลิตร
พีเอชสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 25 °C	6.5±0.2	

วิธีการเตรียม

ละลายผงอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม MRS powder (Himedia's MRS broth) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง de Man, Rogosa and Sharp (MRS agar)

วิธีการเตรียม

ละลายผงอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม MRS powder (Himedia's MRS broth) และผงวุ้น 150 กรัม (1.5 % Agar) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Fluid Thioglycollate Medium

ประกอบด้วย

Tryptone	15.0	กรัม/ลิตร
Yeast extract	5.0	กรัม/ลิตร
Dextrose (Glucose)	5.5	กรัม/ลิตร
Sodium chloride	2.5	กรัม/ลิตร
L-Cystine	0.5	กรัม/ลิตร
Sodium thioglycollate	0.5	กรัม/ลิตร
Resazurin sodium	0.001	กรัม/ลิตร
Agar	0.750	กรัม/ลิตร
พีเอชสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 25 °C	7.1±0.2	

วิธีการเตรียม

ละลายผงอาหารสำเร็จรูป 29.75 กรัม Fluid Thioglycollate Medium powder (Himedia's Fluid Thioglycollate Medium) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นลงถึง 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเก็บในมีดและอุณหภูมิต่ำ และทำการต้มไล่อากาศก่อนนำไปใช้

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Fluid Thioglycollate Medium

วิธีการเตรียม

ละลายผงอาหารสำเร็จรูป 29.75 กรัม Fluid Thioglycollate Medium powder (Himedia's Fluid Thioglycollate Medium) และผงวุ้น 150 กรัม (1.5 % Agar) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นลงถึง 25 องศาเซลเซียสแล้วจึงนำไปเก็บในมีดและอุณหภูมิต่ำ

ภาคผนวก ข.

รายชื่อเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

รายชื่อโพรไบโอติกส์ตัวอย่าง	รหัส
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bif6	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bif7	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bif8	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bif9	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bif20	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bif32	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium breve</i> Bif14	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Bifidobacterium breve</i> Bif24	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus casei</i> Lac44	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus casei</i> NL57	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus casei</i> NL60	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac39	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac40	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac41	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus salivarius</i> Lac42	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lac43	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NL56	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NL58	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B64	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B67	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> NL61	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus plantarum</i> B6	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus fermentum</i> NL50	B4-CU-0001/60-0002/60

<i>Lactobacillus fermentum</i> NL53	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus fermentum</i> Lac31	B4-CU-0001/60-0002/60
<i>Lactobacillus fermentum</i> NL16	B4-CU-0001/60-0002/60