บทบาทของโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* SD1 *Lactobacillus rhamnosus* SD11 และ *Lactobacillus gasseri* SD12 ต่อความสัมพันธ์โฮสต์และจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่

The Role of Probiotics *Lactobacillus paracasei* SD1, *Lactobacillus rhamnosus* SD11 and *Lactobacillus gasseri* SD12 on Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract of *Drosophila* Model

ภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี

Pasaraporn Laomongkholchaisri

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Oral Health Sciences
Prince of Songkla University
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทบาทของโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* SD1 *Lactobacillus rhamnosus* SD11 **และ** *Lactobacillus gasseri* SD12 **ต่อความสัมพันธ์โฮสต์และจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่**

The Role of Probiotics *Lactobacillus paracasei* SD1, *Lactobacillus rhamnosus* SD11 and *Lactobacillus gasseri* SD12 on Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract of *Drosophila* Model

ภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี

Pasaraporn Laomongkholchaisri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Oral Health Sciences

Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ บทบาทของโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* SD1 *Lactobacillus rhamnosus* SD11 และ *Lactobacillus gasseri* SD12 ต่อความสัมพันธ์โฮสต์และจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่

ผู้เขียน นางสาวภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……………………………………………….....

(ศาสตราจารย์ ดร. รวี เถียรไพศาล)

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์พิเศษชุติมา ไตรรัตน์วรกุล)

....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. รวี เถียรไพศาล)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อ้อยทิพย์ ชาญการค้า)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ...

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ ....

(นางสาวภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ ....

(นางสาวภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	บทบาทของโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* SD1 *Lactobacillus rhamnosus* SD11 และ *Lactobacillus gasseri* SD12 ต่อความสัมพันธ์โฮสต์และจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่
ผู้เขียน	นางสาวภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

โพรไบโอติกในช่องปาก *Lactobacillus paracasei* SD1 *Lactobacillus rhamnosus* SD11 และ *Lactobacillus gasseri* SD12 มีรายงานถึงความสามารถในการส่งเสริมสุขภาพช่องปากที่ดี อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาผลของโพรไบโอติกเหล่านี้ต่อร่างกายโดยรวม การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ใช้โมเดลแมลงหวี่เพื่อศึกษาผลของโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อการเจริญเติบโต เมื่อได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอน และศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อน้ำหนักตัวของแมลงหวี่ และศึกษาการตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลชีพในลำไส้แมลงหวี่ เมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับ *L. rhamnosus* GG ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่ใช้ทางการค้า โดยโมเดลแมลงหวี่นี้ใช้แมลงหวี่ปราศจากเชื้อ ทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อร่างกาย โดยเลี้ยงไข่แมลงหวี่ในอาหารที่มีเชื้อโพรไบโอติกจนถึงช่วงตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารปราศจากเชื้อ ติดตามการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนแมลงหวี่ที่สามารถพัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยและน้ำหนักตัวของแมลงหวี่จนถึงเมื่อโตเต็มวัย ส่วนการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อน้ำหนัก และการตั้งถิ่นฐานของโพรไบโอติกในลำไส้แมลงหวี่ตัวเต็มวัย ทำโดยเลี้ยงแมลงหวี่ตัวเต็มวัยในอาหารที่มีโพรไบโอติก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก ชั่งน้ำหนักตัวและดูปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้หลังจากได้รับเชื้อโพรไบโอติกในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 จากการศึกษาพบว่าแมลงหวี่ที่ได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอน มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างสั้นกว่ากลุ่มควบคุม และสามารถพัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยได้จำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 มีจำนวนแมลงหวี่ที่พัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่าแมลงหวี่ที่ได้รับเชื้อโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอนมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าแมลงหวี่ที่ได้รับโพร

ไบโอติกในระยะตัวเต็มวัย มีน้ำหนักที่ไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มศึกษา และพบว่าปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้แมลงหวี่ เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึงวันที่ 3 หลังได้รับโพรไบโอติกแล้วจึงเริ่มลดลง ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 ที่พบปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้ในระดับต่ำกว่ากลุ่มโพรไบโอติกอื่นตลอดระยะเวลาศึกษา จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อโพรไบโอติกมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง รวมถึงน้ำหนักของแมลงหวี่ ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของโพรไบโอติกด้วย

Thesis Title	The Role of Probiotics *Lactobacillus paracasei* SD1, *Lactobacillus rhamnosus* SD11 and *Lactobacillus gasseri* SD12 on Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract of *Drosophila* Model
Author	Miss Pasaraporn Laomongkholchaisri
Major Program	Oral Health Sciences
Academic Year	2017

ABSTRACT

Our previous studies showed that *Lactobacillus paracasei* SD1, *Lactobacillus rhamnosus* SD11 and *Lactobacillus gasseri* SD12 have been considered as the potentially oral probiotics for improvement oral health. However, the effects of these oral probiotics on general health have not been studied. The aim of this study was to evaluate the effect of *L. paracasei* SD1, *L. rhamnosus* SD11, *L. gasseri* SD12 and *L. rhamnosus* GG, the commercial probiotics, on growth and on the establishment of probiotics in the fly gut. For evaluate the effects of probiotics on the growth, the fly's eggs were introduced onto the food with probiotics in test groups and without probiotics in control group. They were fed with these food until adults. The morphogenesis and development rate of flies were evaluated and the weight of 7-day-old adult flies were measured. The study of the effect of probiotics on weight and the establishment of probiotics in the gut of adult fly, adult flies were reared in food with probiotics in test groups and without probiotics in control group. Flies' weight and the probiotics in their gut were evaluated on day 1, 2, 3 and 5. The study revealed that the duration of morphogenesis of probiotics fed groups were faster, and the development rate of flies from larva to pupa and adult were also higher in probiotics groups than control group. However, the development rate in *L. gasseri* SD12 group was similar to control group. The mean body weight of the fly reared with probiotics since larva stage was statistically significant higher than control group. However, the effect of probiotics on body weight in adult fly was not

different from control group. The number of probiotics bacteria were increased in all probiotic groups and reach to the highest point in the third day, except *L. gasseri* SD12 group, which had lower level of gut probiotics than other probiotics groups throughout the study. These finding can be concluded that feeding with selected probiotics can promote effect on growth in a strain-dependent manner.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์ ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล และดร.มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ ผู้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

ข้าพเจ้าขอขอบคุณคุณอัครพล สลีแดง คุณณัฏฐาภรณ์ มีนา คุณรจนกร คงแสน คุณสุภาวรรณ มีนา และพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ BSC 1008 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คุณนันทิยา พาหุมันโต คุณเบญจมาศ โสภะถา คุณวิสุทธิ์ แซ่ทอง และพี่ ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาให้แนวคิดข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัย หน่วยบัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และรุ่นน้องนักศึกษาหลังปริญญาสาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชายและทุกคนในครอบครัวที่มอบกำลังใจ และคอยสนับสนุนในทุกเรื่อง ขอขอบพระคุณคณาจารย์ บุคลากรทุกท่านในภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และให้กำลังใจในการเรียนและทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา คุณงามความดีที่เกิดจากการวิจัยครั้งนี้ขอมอบแด่บุพการีและคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษาของข้าพเจ้า

ภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูปภาพ	(12)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การทบทวนวรรณกรรม	3
วัตถุประสงค์	12
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย	13
3. ผลการวิจัย	23
4. บทวิจารณ์	34
5. สรุป	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	45
ประวัติผู้เขียน	47

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงอัตราแมลงหวี่ที่พัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย ในแต่ละกลุ่มการศึกษา 24

รายการรูปภาพ

รูปภาพที่ **หน้า**

รูปที่ 1 แสดงขวดสำหรับให้แมลงหวี่วางไข่ 18

รูปที่ 2 แสดงไข่แมลงหวี่บนอาหาร 18

รูปที่ 3 แสดง MRS agar และ Blood agar ที่ปราศจากโคโลนีของเชื้อจุลชีพ 18

รูปที่ 4 แสดง MRS agar และ Blood agar ที่พบโคโลนีของเชื้อจุลชีพ 19

รูปที่ 5 แสดงขวดสำหรับเลี้ยงแมลงหวี่ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่ตั้งแต่ไข่จนถึงตัวเต็มวัย 21

รูปที่ 6 กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเจริญเติบโตของแมลงหวี่จากตัวหนอนเป็นดักแด้ 23

รูปที่ 7 กราฟแท่งแสดงน้ำหนักเฉลี่ยของแมลงหวี่โตเต็มวัยในแต่ละกลุ่มการศึกษาที่ได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอน 25

รูปที่ 8 แสดงแมลงหวี่ตัวเต็มวัยในแต่ละกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอน 26

รูปที่ 9 กราฟเส้นแสดงน้ำหนักเฉลี่ยในช่วงเวลาต่าง ๆ ของแมลงหวี่แต่ละกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัย 27

รูปที่ 10 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นในลำไส้แมลงหวี่ของกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปราศจากเชื้อในช่วงตัวเต็มวัย 28

รูปที่ 11 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG ในลำไส้แมลงหวี่ที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG ในช่วงตัวเต็มวัย 29

รูปที่ 12 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 ในลำไส้แมลงหวี่ที่ได้รับ *L. paracasei* SD1 ในช่วงตัวเต็มวัย 30

รูปที่ 13 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. rhamnosus* SD11 ในลำไส้แมลงหวี่ที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11 ในช่วงตัวเต็มวัย 31

รูปที่ 14 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. gasseri* SD12 ในลำไส้แมลงหวี่ที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 ในช่วงตัวเต็มวัย 32

รูปที่ 15 กราฟเส้นแสดงปริมาณเฉลี่ยของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้แมลงหวี่แต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อได้รับโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัย ตามระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา 33

ตัวย่อและสัญลักษณ์

WHO	=	World Health Organization
pH	=	Potential of Hydrogen ion
CFU	=	Colony forming unit
MRS agar	=	Man Rogosa Sharpe agar
OD	=	Optical density
NaOCl	=	Sodium hypochlorite
PBS solution	=	Phosphate-buffered saline solution
mg	=	Milligram
ml	=	Millimeter

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

องค์การอนามัยโลก[1] (WHO) ได้ให้นิยาม โพรไบโอติก (Probiotics) คือ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ซึ่งเมื่อรับประทานในปริมาณที่เหมาะสมก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายโฮสต์ โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น สามารถพบในผลิตภัณฑ์พวกโยเกิร์ต นมเปรี้ยว หรืออาหารหมักชนิดอื่น ๆ[2] ในลำไส้ของมนุษย์มีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากมาย โดยเมื่อพิจารณาจำนวนสารพันธุกรรมของแบคทีเรียที่มีชีวิตในลำไส้ มีแบคทีเรียมากถึง 60% ที่ยังไม่เคยถูกค้นพบ[3]

เมื่อเรารับประทานโพรไบโอติกเข้าไปในร่างกาย โพรไบโอติกจะมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อจุลชีพในลำไส้ และตัวรับ (receptor) ที่ผนังลำไส้ของโฮสต์ โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ ในการกำจัดเชื้อก่อโรค ในปัจจุบันพบว่าการบริโภคโพรไบโอติกส่วนใหญ่ก่อให้เกิดผลดีต่อระบบทางเดินอาหาร โดยช่วยควบคุมกลุ่มอาการภาวะลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome) ช่วยต้านต่อการตั้งถิ่นฐานของเชื้อก่อโรคที่สัมพันธ์กับการเกิดท้องเสีย[4] นอกจากนี้โพรไบโอติกยังช่วยในการสร้างสมดุลให้กับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อระบบภูมิคุ้มกันเกิดสมดุล ทำให้ช่วยลดการแพ้อาหารในเด็ก เช่น ลดอาการแพ้แลคโตส นอกจากนี้โพรไบโอติกยังช่วยในการสังเคราะห์อาหาร ลดระดับคลอเรสเตอรอลและลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง โดยเชื่อว่ากลไกของโพรไบโอติกต่อโฮสต์เกี่ยวข้องกับการปรับค่ากรดด่าง (pH) ในลำไส้ การต้านเชื้อก่อโรคโดยการสร้างสารประกอบที่ต้านเชื้อจุลชีพ การแย่งจับตัวรับของเชื้อก่อโรค การกระตุ้นให้เกิดสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ และช่วยสร้างแลคเตส[2] นอกจากนี้โพรไบโอติกยังมีบทบาทในชีวิตประจำวัน คือช่วยในการเก็บรักษานม โดยการใช้แบคทีเรียที่สร้างกรด ทำให้เกิดรสชาติของอาหารและเกิดการย่อยสลายพวก extracellular polysaccharides และเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เช่น มีการปล่อยกรดอะมิโนอิสระหรือมีการสังเคราะห์วิตามิน[5]

Lactobacillus rhamnosus GG เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในเชิงอุตสาหกรรมและพาณิชย์ โดยเน้นประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในช่องปาก เพื่อต้านเชื้อที่ก่อโรคในช่องปากด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Wannun และคณะ[6,7] ในห้องปฏิบัติการพบว่า *L. paracasei* SD1 ที่ได้จากเด็กที่ปราศจาก

ฟันผุ มีความสามารถในการสร้างสาร paracasin SD1 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์ในช่องปากได้ ต่อมามีการนำ *L. paracasei* SD1 มาผสมในนมผง ให้กลุ่มตัวอย่างรับประทาน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีการลดลงของ mutans streptococci และการเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ *L. paracasei* SD1 ยังสามารถคงอยู่ในช่องปากได้นาน 4 สัปดาห์ หลังหยุดรับประทาน โดยไม่เกิดผลข้างเคียงใด ๆ ต่อกลุ่มตัวอย่างตลอดการศึกษา นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโพรไบโอติกที่ได้จากน้ำลายเด็กอีก 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus rhamnosus* SD11 และ *Lactobacillus gasseri* SD12 โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Wannun และคณะในห้องปฏิบัติการพบว่า *L. rhamnosus* SD11 สามารถสร้างสาร fermensin SD11 ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์ได้เช่นเดียวกับ *L. paracasei* SD1[7] สำหรับ *L. gasseri* เป็น Lactobacilli สายพันธุ์หนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการป้องกันโรคในช่องปาก โดยจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า *L. gasseri* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการยึดเกาะสูง (aggregation) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากได้ และมีความสามารถในการจับกับน้ำลาย และการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) ของเหงือกได้[8-11] โดยจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า *L. gasseri* SD12 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยึดเกาะระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (autoaggregation) และการยึดเกาะระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกัน (co-aggregation) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของเชื้อโพรไบโอติกที่ได้จากช่องปากทั้งสามสายพันธุ์ต่อสุขภาพร่างกายโดยรวม

แมลงหวี่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Drosophila melanogaster* ชื่อสามัญคือ common fruit fly หรือ vinegar fly จัดอยู่ในชั้น Insecta ระดับ Diptera ตระกูล *Drosophilidae* แมลงหวี่มีวงจรชีวิตสั้น ใน 1 วงจรประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย[12] เมื่อเข้าสู่ช่วงตัวเต็มวัย แมลงหวี่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 2 เดือน[13]

โมเดลการศึกษาในแมลงหวี่เป็นโมเดลที่ดีในการศึกษาภาวะพึ่งพากันของจุลชีพในลำไส้โฮสต์ (host-gut microbiota mutualism) เนื่องจากแมลงหวี่มีอายุสั้น ขยายพันธุ์ได้ง่าย สามารถแสดงปฏิกิริยาระหว่างอาหาร แบคทีเรีย และโฮสต์ได้ อีกทั้งสารพันธุกรรมของแมลงหวี่ไม่มีความซับซ้อน ทำให้ง่ายต่อการศึกษากลไกในระดับโมเลกุล (molecular mechanism) ทำให้ง่ายต่อการนำมาใช้ในการศึกษา โดยโมเดลการศึกษาในแมลงหวี่เป็นโมเดลที่นิยมใช้ในการศึกษาผลของปฏิกิริยาระหว่างแบคทีเรีย อาหารและภาวะชีวภาพของโฮสต์[14] เนื่องจากแมลงหวี่มีระบบทางเดินอาหารที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ โดยลำไส้ส่วนหน้า (foregut) ของแมลงหวี่เทียบได้กับส่วนของ

หลอดอาหาร (esophagus) ของมนุษย์ ส่วนของกระเพาะอาหารมีเช่นเดียวกันทั้งมนุษย์และแมลงหวี่ ส่วนลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ในแมลงหวี่เทียบได้กับส่วนของลำไส้เล็กในมนุษย์ และส่วนลำไส้ส่วนท้าย (hindgut) ไส้ตรง และทวารหนักของแมลงหวี่มีความคล้ายคลึงกับลำไส้ใหญ่ ไส้ตรง และทวารหนักของมนุษย์ โดยมีส่วนที่แตกต่างคือ แมลงหวี่มีส่วน malpighian tube ซึ่งทำหน้าที่เสมือนไตสำหรับแมลงหวี่ ช่วยในการดูดซึมน้ำเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ[15] นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในแมลงหวี่ไม่มีความหลากหลายมากนัก ทำให้ง่ายต่อการศึกษา โดยเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่สำคัญในแมลงหวี่ ได้แก่ *Acetobacter pomorum Acetobacter tropicalis Lactobacillus brevis Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus fructivorans*[16,17] ซึ่งเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นของแมลงหวี่ทุกตัวยกเว้น *A. pomorum* และ *A. tropicalis* สามารถพบได้ในมนุษย์ โดยเชื้อดังกล่าวอยู่แบบภาวะอิงอาศัยในร่างกายมนุษย์[18] ดังนั้นการใช้โมเดลแมลงหวี่จึงเหมาะสมในการศึกษาผลของเชื้อโพรไบโอติกต่อร่างกาย

การทบทวนวรรณกรรม

จุลชีพ (microorganism)

เชื้อจุลชีพเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานในร่างกายมนุษย์ตั้งแต่เกิดเพื่อช่วยปกป้องผิวหนัง ช่องปาก ช่องคลอด และระบบทางเดินอาหาร[19] การพัฒนาของจุลชีพในทารกช่วงแรกขึ้นกับวิธีการคลอดของเด็ก ได้แก่ การคลอดโดยธรรมชาติผ่านทางช่องคลอดและการผ่าคลอด อายุครรภ์ที่คลอด เช่น การคลอดก่อนกำหนดหรือการคลอดตามกำหนด การใช้ยาปฏิชีวนะระหว่างตั้งครรภ์ และอาหารที่ทารกได้รับในช่วงแรก รูปแบบการให้อาหารในช่วงแรกของชีวิตก็มีผลต่อการตั้งถิ่นฐานของจุลชีพในลำไส้ โดยในทารกที่ได้รับนมแม่จะมี intestinal permeability ลดลงกว่าเด็กที่กินนมสูตร เพราะนมแม่มีภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune) ต้านเชื้อจุลชีพ ในขณะที่เด็กที่กินนมสูตร จะมีการเพิ่มขึ้นของ Clostridia และ *Bacteroides* ในลำไส้[20]

ในลำไส้ของมนุษย์มีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากมาย เมื่อพิจารณาจำนวนสารพันธุกรรม (genes) ของแบคทีเรียที่มีชีวิตในลำไส้ พบว่ามีจำนวน 100-150 เท่าของสารพันธุกรรมของเซลล์ทั้งหมดในร่างกายมนุษย์ โดยมีแบคทีเรียมากถึง 60% ที่ยังไม่เคยถูกค้นพบ[3,18] โดยจุลชีพหลากหลายสายพันธุ์ในลำไส้มนุษย์ อยู่กันอย่างพึ่งพาอาศัยและอิงอาศัยกัน องค์ประกอบของจุลชีพ

แตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยมีจุลชีพตัวที่เด่น เช่น *Bacteroides fragilis* และ *B. thetaiotaomicron*[21] การคงสมดุลของจุลชีพเป็นสิ่งสำคัญ ก่อให้เกิดสุขภาพที่ดีให้แก่โฮสต์ หากเสียสมดุลทำให้เกิดโรคได้ โดยเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลชีพในลำไส้ ทำให้เกิดการอักเสบเฉียบพลันของระบบภูมิคุ้มกันอัตโนมัติ (chronic autoimmune inflammatory diseases) เช่น Celiac disease เบาหวานชนิดที่ 2 หรือโรคอ้วน ซึ่งสัมพันธ์กับความไม่สมดุลของจุลชีพในลำไส้ นอกจากนี้โรคลำไส้แปรปรวน (Irritate bowel syndrome) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโรค Crohn’s disease และท้องเสียเรื้อรัง มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพบางชนิดในลำไส้ใหญ่[20,21] จากการศึกษาของ Swidsinski และคณะ ในฝาแฝด พบว่าเมื่อมี *Fecakibacterium prausnitzii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่อย่างอิงอาศัยลดลง และมี *Escherichia coli* มากขึ้น จะมีความสัมพันธ์กับการเกิด Ileal Crohn’s disease phenotype แต่ในปัจจุบันพบว่า Crohn’s disease สัมพันธ์กับการเกิดแผลที่ลำไส้ ไม่ใช่เกิดจากความไม่สมดุลของจุลชีพ โดยความไม่สมดุลของจุลชีพสัมพันธ์กับการท้องเสียเรื้อรัง พบการลดลงของ *F. prausnitzii* และ *bacteroides* ในผู้ป่วยบางราย โดยระดับของจุลชีพสามารถกลับเข้าสู่ภาวะปกติเมื่อรับประทาน *Saccharomyces boulardii* ซึ่งเป็นโพรไบโอติก[22]

โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก ตามคำนิยามของ WHO[1] คือ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่เมื่อรับประทานในปริมาณที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายโฮสต์ บางครั้งโพรไบโอติกอาจหมายถึง อาหารเสริมที่ประกอบด้วยจุลชีพที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค โดยส่วนใหญ่มักรู้จักกันในกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียสร้างกรด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลมหรือแท่ง ไม่มีการสร้างสปอร์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นกรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซค์ และเอทานอล (ethanol) ซึ่งก่อให้เกิดพลังงานแก่แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สร้างกรดได้ส่วนใหญ่สามารถเติบโตได้ในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) แบคทีเรียสร้างกรด ประกอบด้วย *Lactobacillus Leuconostoc Pediococcus Lactococcus* และ *Streptococcus* โดยบางชนิดเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อให้เกิดโรค เช่น บางตัวในกลุ่ม *Streptococcus* ในขณะที่บางชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ ทั้งในช่องปาก ลำไส้ และช่องคลอด แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญในการหมักดองอาหาร ทำให้อาหารมีรสชาติและเนื้อสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไป และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth-inhibiting substance) และกรดแลคติกในปริมาณมาก เพื่อยับยั้ง

การเจริญเติบโตของจุลชีพอื่น ๆ[5] โดย *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียสร้างกรดชนิดหนึ่งที่จัดเป็นโพรไบโอติก

การบริโภคโพรไบโอติกมักอยู่ในรูปของ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว หรืออาหารหมักชนิดอื่น ๆ[2] โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นจุลชีพที่ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน[4] เมื่อรับประทานโพรไบโอติกเข้าไปในร่างกาย โพรไบโอติกจะมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อจุลชีพในลำไส้ และตัวรับที่ผนังลำไส้ก่อให้เกิดผลหลากหลายต่อร่างกายโฮสต์[4] ปัจจุบันพบว่าการบริโภคโพรไบโอติกส่วนใหญ่ก่อให้เกิดผลดีต่อระบบทางเดินทางอาหาร โดยช่วยควบคุมกลุ่มอาการภาวะลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome) ต้านต่อการตั้งถิ่นฐานของเชื้อก่อโรคที่สัมพันธ์กับการเกิดท้องเสีย นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมการเกิดภาวะลำไส้อักเสบได้ มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดและไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) มีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับไวรัสและเชื้อก่อโรค (pathogen) ในอาหารและน้ำ[4] นอกจากนี้โพรไบโอติกยังช่วยในการสร้างสมดุลให้กับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อระบบภูมิคุ้มกันสมดุล ทำให้ช่วยลดการแพ้อาหารในเด็ก เช่น ลดอาการแพ้แลคโตส นอกจากนี้ช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยในการสังเคราะห์อาหาร ลดระดับคลอเรสเตอรอลและลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง โดยเชื่อว่ากลไกของโพรไบโอติกต่อโฮสต์เกี่ยวข้องกับการปรับค่ากรดด่างในลำไส้ การต้านเชื้อก่อให้เกิดโรคโดยการสร้างสารประกอบที่ต้านเชื้อจุลชีพ การแย่งจับตัวรับของเชื้อก่อโรค การกระตุ้นให้เกิดสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ และช่วยสร้างแลคเตส[2] นอกจากนี้โพรไบโอติกยังมีบทบาทในชีวิตประจำวัน คือ ช่วยในการเก็บรักษานมโดยการใช้แบคทีเรียที่สร้างกรด ทำให้เกิดรสชาติของอาหาร เกิดการย่อยสลายพวก extracellular polysaccharides และเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เช่น มีการปล่อยกรดอะมิโนอิสระหรือมีการสังเคราะห์วิตามิน[5]

ในปัจจุบันมีการสนับสนุนให้โพรไบโอติกเป็นส่วนหนึ่งของอาหารเพื่อสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย คุ้มค่า และสามารถต้านการติดเชื้อจุลชีพโดยธรรมชาติ[2] แต่อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า โพรไบโอติกก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ เช่น ติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งมีโอกาสพบได้น้อยมาก โดยพบในผู้ป่วยเด็กที่มี short bowel syndrome และ central venous catheter[20]

จุลชีพที่ใช้เป็นโพรไบโอติก[20] ได้แก่

- Yeast*: Saccharomyces boulardii*
- แบคทีเรียแกรมลบ*: E. coli* Nissle 1917

- แบคทีเรียแกรมบวก: *B. bifidum B. infantis L. rhamnosus* GG *L. lactis, L. plantarum* 299v *L. acidophilus L. rhamnosus L. casei L. gasseri B. polyfermenticus*
- กลุ่มแบคทีเรียผสม (combination regiment): *L. rhamnosus* ร่วมกับ *B. lactis L. rhamnosus* ร่วมกับ *L. helveticus* และ VSL#3 *(L. casei, L. plantarum L. acidophilus L. bulgaricus B. longum B. breve, B. infantis* และ *S. Thermophilus*

กลไกของโพรไบโอติก

กลไกของโพรไบโอติกที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายโฮสต์ ส่วนใหญ่ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด แต่ในปัจจุบันแบ่งกลไกออกเป็น 5 กลไก[4] คือ

1. การลดความเป็นกรดด่างภายในลำไส้
2. การแย่งจับตัวรับกับเชื้อก่อโรคและแย่งแหล่งอาหารเชื้อก่อโรค
3. การหลั่งสารต้านจุลชีพ (antimicrobial substances)
4. ทำให้สารพิษไม่ออกฤทธิ์ (toxin inactivation)
5. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

โดยอาศัยกลไกปฏิกิริยาระหว่างโฮสต์และแบคทีเรีย (Host-bacteria interaction mechanism) รวมถึงกลไกปฏิกิริยาทางกายภาพของแบคทีเรียและเยื่อบุเซลล์ (physical bacteria-epithelium interaction) โดยมีการยึดเกาะที่เยื่อเมือกและเยื่อบุเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการหลั่งเมือก (mucus) และสร้างสารต้านจุลชีพและส่งเสริมการทำงานของการป้องกันในลำไส้ อีกกลไกหนึ่งคือ กลไกปฏิกิริยาระหว่างแบคทีเรียและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (bacteria-immune system interaction) เป็นการปรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (modulation and regulation of immune response) และสุดท้ายคือ กลไกปฏิกิริยาระหว่างแบคทีเรียและแบคทีเรีย (bacteria-bacteria interaction) ซึ่งรวมถึงการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยการป้องกันการยึดติด การหลั่งสารต้านจุลชีพ การแย่งอาหารและการต้านพิษ (anti-toxin effects)[4] โดยโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ช่วยส่งเสริมความแข็งแรงในการปกป้องของลำไส้ (Intestinal barrier) ซึ่งมีผลช่วยรักษาสภาพของระบบภูมิคุ้มกัน ลดการเปลี่ยนตำแหน่งของแบคทีเรียในเยื่อบุลำไส้ และลดการเกิดโรค เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น[21]

Probiotics *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะแท่ง ไม่มีการสร้างสปอร์ อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดได้ พบทั่วไปในช่องปาก ลำไส้ และช่องคลอด[5] ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับฟันผุ โดยเชื่อว่าสามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในฟันผุลึก ซึ่งสัมพันธ์กับการดำเนินไปของโรคฟันผุในชั้นเนื้อฟัน แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ มีความสามารถต้านเชื้อ *S. mutans* และ *C. albicans* ในช่องปากได้[23-25] จากการทบทวนวรรณกรรมของ Meurman และ Stamatova[26] ได้รวบรวมการศึกษาทั้งในห้องปฏิบัติการและในมนุษย์ โดยแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกที่มีผลยับยั้งและลดการยึดเกาะของ *S. mutans* ในช่องในช่องปาก ได้แก่ *L. rhamnosus* GG *L. acidophilus* ร่วมกับ *L. casei* และ *L.reuteri Bifidobacterium L. rhamnosus L. paracasei* ร่วมกับ *L. johnsonii* และ *L. rhamnosus* GG

L. rhamnosus GG เป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีประโยชน์ต่อช่องปากและร่างกายมนุษย์ จากการศึกษาของ Silva และคณะ[27]พบว่า *L. rhamnosus* GG ผลิตกรดแลคติกและกรดอะซิติก (acetic acid) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ *Clostridium* spp. *Bacteroides* spp. *Bifidobacterium* spp. และแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae Pseudomonas* spp. *Staphylococcus* และ *Streptococcus* spp. รวมถึง *S. mutans* ได้ จากการศึกษาของ Nase และคณะ[25] โดยเปรียบเทียบการเกิดฟันผุในที่เด็กดื่มนมวัวที่ไม่ผสม *L. rhamnosus* GG กับเด็กดื่มนมวัวที่ผสม *L. rhamnosus* GG จำนวน 10^5 CFU/ml เป็นเวลา 5 วันต่อสัปดาห์ นาน 7 เดือน พบว่าเมื่อสิ้นสุดการศึกษาในกลุ่มที่ได้รับนมวัวที่ผสม *L. rhamnosus* GG มีการเกิดฟันผุน้อยกว่า และมีจำนวน *S. mutans* น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับนมวัวธรรมดา และจากการศึกษาของ Ahola และคณะ[23] โดยให้ผู้ใหญ่รับประทานชีสที่มี *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* LC705 พบว่า ลดปริมาณ *S. mutans* ในน้ำลายได้ แสดงให้เห็นว่า *L. rhamnosus* GG เป็นโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อช่องปากในการลดการเกิดฟันผุและลดเชื้อที่ทำให้เกิดฟันผุ แต่อย่างไรก็ตาม *L. rhamnosus* GG สามารถคงอยู่ในช่องปากได้เพียงชั่วคราว ไม่สามารถตั้งถิ่นฐานในช่องปากได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *L. rhamnosus* GG ไม่มีต้นกำเนิดมาจากช่องปาก[28] ซึ่งนอกจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพช่องปากแล้วพบว่า *L. rhamnosus* GG ยังมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วย จากการศึกษาของ Kim และคณะ[29] ได้ทำการศึกษาในหนู โดยให้หนูกินอาหารที่มีไขมันสูงร่วมกับ *L. rhamnosus* GG พบว่าช่วยลดการสะสมไขมันที่ตับและระดับ

ไทรกลีเซอไรด์และคลอเรสเตอรอลในซีรั่ม และจากการศึกษาในมนุษย์[30] พบว่า *L. rhamnosus* GG เป็นโพรไบโอติกที่ช่วยป้องกันท้องเสียเนื่องจากการได้รับยาปฏิชีวนะทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ นอกจากนี้ Latin American export group[31] ได้แนะนำให้ใช้ *L. rhamnosus* GG รวมทั้ง *Bifidobacterium lactis* และ *L. reuteri* ในการป้องกันภาวะท้องเสียในเด็ก

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการของ Wannun และคณะ[6] พบว่า *L. paracasei* SD1 มีความสามารถสร้างสาร paracasin SD1 ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะ *S. mutans* ได้เป็นอย่างดี ยกเว้น *F. nucleatum* โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. albicans* ได้ด้วย และจากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีโรคทางระบบของ Ritthagol และคณะ[32] โดยให้ผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีโรคทางระบบดื่มนมที่ผสม *L. paracasei* SD1 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจปริมาณ mutans streptococci และ *Lactobacilli* จากการเก็บน้ำลายเป็นค่าพื้นฐานทุก ๆ สัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 4 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ดื่มนมผสม *L. paracasei* SD1 มีจำนวน mutans streptocooci น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ดื่มนมไม่ผสม *L. paracasei* SD1 และมีจำนวน *Lactobacilli* ในกลุ่มที่ดื่มนมผสม *L. paracasei* SD1 มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ดื่มนมไม่ผสม *L. paracasei* SD1 และสามารถพบ *L. paracasei* SD1 ภายหลังการหยุดดื่มนมที่ผสม *L. paracasei* SD1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *L. paracasei* SD1 สามารถตั้งถิ่นฐานในช่องปากของผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Teanpaisan และคณะ[33] ที่ศึกษาในกลุ่มอาสาสมัคร อายุ 21$\pm$1.45 ปี โดยกลุ่มศึกษาได้รับนมที่ผสม *L. paracasei* SD1 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับนมที่ไม่ผสม *L. paracasei* SD1 แล้วเก็บน้ำลายเพื่อดูปริมาณ mutans streptococci lactobacilli และ yeast พบว่า ในกลุ่มศึกษามีจำนวน mutans streptococci ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มควบคุม จำนวน mutans streptococci ไม่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าค่า yeast ในกลุ่มศึกษาลดลง ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้น โดยการลดลงและเพิ่มขึ้นของค่า yeast ทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษานี้มีการติดตามผลข้างเคียงจากการดื่มนมที่ผสม *L. paracasei* SD1 พบว่า กลุ่มตัวอย่างไม่มีรายงานผลข้างเคียงใด ๆ

จากการศึกษาของ Piwat และคณะ[34] ได้ทำการเก็บน้ำลายในเด็กไทยช่วงก่อนวัยเรียน พบว่าสามารถพบ *L. rhamnosus* ในน้ำลายของเด็กทุกกลุ่ม ทั้งที่มีฟันผุในระดับปานกลางถึงสูง และในกลุ่มที่มีฟันผุต่ำ โดย *L. rhamnosus* SD11 เป็นแบคทีเรียที่ได้จากช่องปากเด็กที่

ปราศจากฟันผุเช่นเดียวกับ *L. paracasei* SD1 โดยจากการศึกษาในห้องทดลอง[7] พบว่า *L. rhamnosus* SD11 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสาร fermensin SD11 ซึ่งคงอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส และสามารถต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปากได้หลายชนิด ทั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดฟันผุ (*S. mutans* และ *S. sorbrinus*) เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์ (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* และ *P. gingivalis*) และ *C. albicans* และจากการศึกษาของ นันทรักษ์ชัยกุล และคณะ[35] ได้ทำการศึกษาโดยกลุ่มอาสาสมัครได้รับโยเกิร์ตที่มี *L. rhamnosus* SD11 และกลุ่มควบคุมได้รับโยเกิร์ตที่มี *L. bulgaricus* จำนวน 100 มิลลิลิตร/วัน ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าในกลุ่มศึกษามี *S. mutans* และเชื้อราลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อก่อนและหลังการศึกษาจากค่า 2.80$\pm$1.41 log10CFU/ml เป็นค่า 0.78$\pm$1.19 log10CFU/ml ในเชื้อ *S. mutans* และจากค่า 1.81$\pm$1.81 log10CFU/ml เป็นค่า 0.54$\pm$1.00 log10CFU/ml ในเชื้อรา ในขณะที่กลุ่มควบคุม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อก่อนและหลังการศึกษา นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม พบว่าหลังได้รับโยเกิร์ตครบ 1 เดือน ในกลุ่มศึกษาพบปริมาณ *S. mutans* (0.78$\pm$1.19 log10CFU/ml) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (3.48$\pm$1.58 log10CFU/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อราไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบผลข้างเคียงใด ๆ จากการรับประทานโยเกิร์ตตลอดการศึกษาในกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษา

L. gasseri เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถตั้งถิ่นฐานได้ในระบบทางเดินอาหาร ช่องปาก และช่องคลอดของมนุษย์[10] ในช่องปากพบได้ในบุคคลที่มีภาวะปริทันต์ดี[36] โดยจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการของ Teanpaisan และคณะ[37] พบว่า *L. gasseri* มีความสามารถในการยับยั้ง *S. mutans* ได้ในระดับปานกลางถึงต่ำ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Piwat และคณะ[8] พบว่า *L. gasseri* มีคุณสมบัติในการยึดเกาะภายนอก (externalization) สูง (40%) ในขณะที่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะภายใน (internalization) ต่ำ (22%) แต่มีคุณสมบัติการเกิดการเกาะกลุ่มระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (autoaggrgation) และคุณสมบัติในการเกาะกลุ่มระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกัน (co-aggregation) สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่ 74% และ 47% ตามลำดับ และจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า *L. gasseri* SD12 มีความสามารถในการเกาะกลุ่มระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกันและการเกาะกลุ่มระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกันสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. gasseri* สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งคุณสมบัติในการยึดเกาะที่ดีเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญต่อการคงอยู่ของโพรไบโอติก นอกจากนี้จากการศึกษาของ Sakamoto และคณะ[38] พบว่า *L. gasseri* OLL 2716 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Helicobacter pyroli*

และลดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหารของอาสาสมัครที่รับประทานโยเกิร์ตที่เติม *L. gasseri* OLL 2716 วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และจากการศึกษาของ Fujimura และคณะ[39] พบว่า ภายหลังบริโภคโยเกิร์ตที่เติม *L. gasseri* OLL 2716 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ *L. gasseri* OLL 2716 ในเยื่อบุกระเพาะอาหารของอาสาสมัครได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *L. gasseri* OLL 2716 มีความสามารถในการแทรกเข้าไปในเยื่อบุกระเพาะอาหารได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า *L. paracasei* SD1 และ *L. rhamnosus* SD 11 มีความสามารถในการสร้างสารเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปากและ *L. gasseri* มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ ซึ่งถือเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญ อันแสดงให้เห็นว่า *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเป็นโพรไบโอติก

Drosophila as an in vivo model of human

แมลงหวี่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Drosophila melanogaster* ชื่อสามัญคือ common fruit fly หรือ vinegar fly จัดอยู่ในชั้น Insecta ระดับ Diptera ตระกูล *Drosophilidae* แมลงหวี่มีวงจรชีวิตประมาณ 14 วัน ใน 1 วงจรประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย[12] เมื่อเข้าสู่ช่วงตัวเต็มวัย แมลงหวี่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 2 เดือน[13] โดยระยะที่นิยมใช้เพื่อการศึกษาคือระยะตัวเต็มวัยหลังออกจากดักแด้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง[40]

แมลงหวี่ถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาแบบจำลองระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพและหน้าที่คล้ายคลึงกับระบบทางเดินอาหารของมนุษย์[41] ระบบทางเดินอาหารของแมลงหวี่ ประกอบด้วยช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ และไส้ตรง เช่นเดียวกับมนุษย์ เมื่อพิจารณาส่วนของลำไส้แมลงหวี่ พบว่าประกอบด้วยส่วนของเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียว (simple epithelium) และล้อมรอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบ (visceral muscles) เส้นประสาทต่าง ๆ และ หลอดลม (tracheae) ลำไส้ของแมลงหวี่แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนหน้า (foregut) ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) และลำไส้ส่วนท้าย (hindgut) โดยลำไส้ส่วนหน้าและลำไส้ส่วนท้าย เป็นส่วนที่มาจาก ectodermal line และมีปกคลุมด้วย impermeable cuticle ในขณะที่ลำไส้ส่วนกลางมาจาก endodermal และมี peritrophic matrix (PM) ปกคลุมด้านในโดยแมลงหวี่ในช่วงตัวหนอนและตัวเต็มวัยจะมีลักษณะของทางเดินอาหารที่แตกต่างกัน เนื่องจากแมลงหวี่ในช่วงตัวหนอนและตัวเต็มวัยมีลักษณะการบริโภคอาหารที่แตกต่างกัน โดยในช่วงตัวหนอน จะกินอาหารตลอดเวลา โดยใช้ปากในการดูดอาหาร สามารถย่อยอาหารที่มีลักษณะเป็น

ของแข็งได้ แต่ในแมลงหวี่ที่โตเต็มวัย จะมีความถี่ในการกินอาหารน้อยกว่า โดยใช้ปากดูดอาหารที่เป็นของเหลว แล้วเก็บอาหารไว้ในส่วนของกระเพาะอาหารก่อน หลังจากนั้นอาหารจะเข้าสู่ส่วนของลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ของแมลงหวี่จะมีการเปลี่ยนแปลงจากช่วงที่เป็นหนอนมาสู่ช่วงตัวเต็มวัย โดยเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัย ลำไส้ส่วนกลางในช่วงหนอน และดักแด้จะสลายกลายเป็นอุจจาระและลอกออกเมื่อแมลงหวี่โตเต็มวัย[15,41] โดยแมลงหวี่มีระบบทางเดินอาหารที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ โดยส่วนของหลอดอาหาร (esophagus) ของมนุษย์เทียบได้กับลำไส้ส่วนหน้า (foregut) ของแมลงหวี่ ถัดลงมาเป็นส่วนของกระเพาะอาหารซึ่งมีเช่นเดียวกันทั้งมนุษย์และแมลงหวี่ ต่อมาคือส่วนของลำไส้เล็กในมนุษย์ ซึ่งเทียบได้กับลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ในแมลงหวี่ และส่วนสุดท้ายคือ ลำไส้ใหญ่ ไส้ตรง และทวารหนักในมนุษย์ก็มีความคล้ายคลึงกับ ลำไส้ส่วนท้าย (hindgut) ไส้ตรง และทวารหนักของแมลงหวี่ โดยมีส่วนที่แตกต่างคือแมลงหวี่จะพบ malpighian tube ซึ่งเทียบได้กับไตของแมลงหวี่ ทำหน้าที่ช่วยในการดูดซึมน้ำเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ[15] แมลงหวี่มีเชื้อจุลชีพประจำถิ่นไม่มากนัก โดยเชื้อจุลชีพประจำถิ่นที่สำคัญในแมลงหวี่ คือ *A. pomorum A. tropicalis L. brevis L. plantarum* และ *L. fructivorans*[16,17] โดยเชื้อจุลชีพประจำถิ่นของแมลงหวี่ทุกตัวยกเว้น *A. pomorum* และ *A. tropicalis* สามารถพบได้ในมนุษย์ โดยเชื้อดังกล่าวอยู่แบบภาวะอิงอาศัยในร่างกายมนุษย์[18] การศึกษาในปัจจุบันพบว่า เชื้อแบคทีเรียในแมลงหวี่มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ได้รับ ระยะพัฒนาการของแมลงหวี่และสภาวะระบบภูมิคุ้มกัน[16,17,42] โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียในแมลงหวี่มากที่สุด คือ อาหารที่ได้รับ[43] โดยอาหารมีผลต่อทั้งความหนาแน่นและสัดส่วนของเชื้อจุลชีพในลำไส้แมลงหวี่[41] ในแมลงหวี่ที่ได้รับอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกอย่างต่อเนื่อง พบว่าชนิดของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของแมลงหวี่มีจำนวนมากกว่าแมลงหวี่ที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกอย่างต่อเนื่อง (กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติก 3 วัน รับอาหารปกติ 1 วัน สลับกันจนครบ 7 วัน และกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติกเลย) แสดงให้เห็นว่า หากไม่ได้รับเชื้อโพรไบโอติกอย่างต่อเนื่องจะทำให้ปริมาณเชื้อในลำไส้ของแมลงหวี่ลดลง สามารถชะลอการลดลงของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้ของแมลงหวี่ได้ โดยแมลงหวี่กลุ่มที่ถูกอดอาหารจะมีการขับถ่ายน้อย ทำให้เชื้อโพรไบโอติกคงอยู่ในลำไส้ได้นานขึ้น[40]

วิธีใส่เชื้อในแมลงหวี่มี 3 วิธี[13] คือ 1.) วิธีจิ้มเข็มที่จุ่มสารละลายเชื้อลงไปบริเวณส่วนอกของแมลงหวี่ วิธีนี้ใช้สำหรับการศึกษาการติดเชื้อเฉพาะตำแหน่ง 2.) วิธีการฉีดเชื้อไปบริเวณส่วนอกของแมลงหวี่ วิธีนี้ใช้สำหรับการศึกษาการติดเชื้อทั่วร่างกายและในกระแสเลือด

และ 3.) วิธีการใส่เชื้อในอาหารของแมลงหวี่ เป็นการศึกษาการติดเชื้อเฉพาะตำแหน่ง เน้นไปที่ลำไส้และทางเดินอาหาร มักใส่เชื้อประมาณ 10^4-10^5 CFU/ตัว

จากการศึกษาของ Corby-Harris และคณะ[43] แสดงให้เห็นว่าจากการสังเกตประชากรแมลงหวี่ 11 กลุ่มจากภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนของประชากรเชื้อจุลชีพของแมลงหวี่ในแต่ละภูมิศาสตร์ แต่การศึกษาประชากรเชื้อจุลชีพในแมลงหวี่ที่เลี้ยงในห้องทดลองกับแมลงหวี่ที่จับมา พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน นอกจากนี้อายุของแมลงหวี่ก็มีผลต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยทั่วไปแนะนำให้ใช้แมลงหวี่ในช่วงอายุเดียวกันตลอดการศึกษา นิยมใช้ที่อายุ 5-7 วัน ส่วนเพศของแมลงหวี่ไม่มีผลต่อการศึกษา แต่ควรเลือกใช้แมลงหวี่เพศเดียวกันในการศึกษา[13]

โมเดลการศึกษาในแมลงหวี่ เป็นโมเดลที่ดีในการศึกษาภาวะพึ่งพากันของจุลชีพในลำไส้โฮสต์ เพราะเป็นโมเดลที่ง่าย ไม่ซับซ้อน สามารถแสดงให้เห็นปฏิกิริยาระหว่างอาหาร แบคทีเรีย และโฮสต์ และสารพันธุกรรมของแมลงหวี่ไม่ซับซ้อนทำให้ง่ายต่อการศึกษากลไกในระดับโมเลกุล (molecular mechanism) โดยโมเดลแมลงหวี่เป็นโมเดลที่นิยมใช้ในการศึกษาผลของปฏิกิริยาระหว่าง *lactobacillus* และระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเนื่องจากสามารถเห็นกลไกการตอบสนองที่ชัดเจน[14] นอกจากนี้การศึกษาโดยให้แมลงหวี่ได้รับเชื้อผ่านทางอาหารยังเป็นโมเดลที่เลียนแบบการติดเชื้อในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้[13]

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนแมลงหวี่ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย และน้ำหนักของแมลงหวี่เมื่อเป็นตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับ *L. rhamnosus* GG และกลุ่มควบคุม

2. เพื่อศึกษาผลของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อน้ำหนักของแมลงหวี่ในระยะตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับ *L. rhamnosus* GG และกลุ่มควบคุม

3. เพื่อศึกษาการตั้งถิ่นฐานของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ในลำไส้แมลงหวี่ เมื่อได้รับโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับ *L. rhamnosus* GG และกลุ่มควบคุม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth (HIMEDIA®, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS agar (HIMEDIA®, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Difco™, Becton, Dickinson and company, USA)
4. ไม้พันสำลี (Cotton stick; Hivan®, Mfg. NTT Marketing Co. Ltd., Thailand)
5. สารละลาย PBS (Phosphate buffered saline solution: pH 7.0)
6. น้ำกลั่น (distilled water)
7. ผงวุ้นทำขนมตรานางเงือก® ซองสีน้ำเงิน (ตรานางเงือก®, กรุงเทพ, ประเทศไทย)
8. ยีสต์สกัดจาก *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA®, Germany)
9. ข้าวโพดดิบ (Mcgarrett®, USA) นำมาบดให้ละเอียด
10. กากน้ำตาล
11. สารกันบูด (10% Sodium benzoate)
12. สารละลาย tetracycline (50 μg/ml)

อุปกรณ์

1. Sterile wire loop
2. ภาชนะเลี้ยงแบคทีเรียไร้ออกซิเจน (anaerobic jar: Scientific Promotion Co., Ltd., USA)
3. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ขนาด 400 ลิตร (Incubator; Binder, Scientific Promotion Co., Ltd., USA)
4. หม้อนึ่งควบคุมความดันไอน้ำ (Autoclave: Tomy SD-320, Tokyo, Japan)
5. Centrifuge tube (Corning®, Corning Incorporated., Mexico)
6. Autopipette (Biohit®, Gibthai, Thailand)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge; biosan® LMC-3000, Gibthai Co., Ltd., Thailand)

8. เครื่องสั่น (Vibrator: Vortex-Genie 2 TM, Scientific industries, Inc., Bohemia, N.Y., 11716, USA)
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer; Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
10. คิวเวทท์ (Cuvette; Greiner bio-one Co., Ltd., Thailand)
11. บีกเกอร์ (Beaker; Pyrex®, USA)
12. ขวดรูปชมพู่ (flask; Pyrex®, USA)
13. ขวดดูแรน (Duran; Schott®, Germany)
14. เครื่องชั่งสาร (Sartorius® AG Germany)
15. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล 5 ตำแหน่ง
16. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus® CH20)
17. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
18. ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic workstation; Whitley M6500)
19. เครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirer; IKA® C-MAG HS 7, Becthai Bangkok Equipment&Chemical Co., Ltd, Bangkok, Thailand)
20. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter: Cyberscan 1000 pH, Oakton Instruments, Vernon Hills, USA)
21. หลอดทดลองฝาเกลียว (Test tube with Screw Cap; Pyrex®, USA)
22. หลอดทดลอง ขนาด 24 x 150 mm.
23. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube Rack)
24. พาสเจอร์ปิเปตแก้ว (Pasteur Pipette; Pyrex®, USA)
25. จานเพาะเชื้อ (Petri dish; Pyrex®, USA)
26. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; Memmert Germany)
27. สำลี
28. ไม้จิ้มฟัน
29. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
30. ขวดแก้ว
31. แท่งแก้วคน
32. 48 well cell culture plate

33. Sterile polystyrene plastic Petri dishes 90 x 15 mm.
34. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow: Nuaire® NU-425-400E,USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษาเลือกเชื้อ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นโพรไบโอติกในช่องปาก ซึ่งได้จากการศึกษาก่อนหน้าของ Piwat และคณะ[34] และใช้เชื้อมาตราฐาน *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 ซึ่งเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำ *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogosa Sharpe (MRS) agar (HIMEDIA®, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) และ *L. gasseri* SD12 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogosa Sharpe (MRS) agar (Difco™, Becton, Dickinson and company, USA) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (HIMEDIA®, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (80% N_2, 10% H_2 และ 10% CO_2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นให้ตกตะกอน (centrifugation) ที่ 3,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge; biosan® LMC-3000, Gibthai Co., Ltd., Thailand) โดยใช้เวลา 5 นาทีสำหรับ *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* SD1, *L. rhamnosus* SD11 และใช้เวลา 10 นาที สำหรับ *L. gasseri* SD12 แล้วนำไปผสมในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ที่ใช้ในการศึกษา

การเตรียมอาหารเลี้ยงแมลงหวี่

เตรียมอาหารแมลงหวี่ปริมาตร 1 ลิตร โดยผสมผงวุ้นสำหรับทำขนม (ตรานางเงือก® สีน้ำเงิน, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) ซึ่งเป็นผงวุ้นที่ได้จากการสกัดสาหร่ายทะเล จำนวน 5 กรัม ยีสต์สกัดจาก *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA®, Germany) จำนวน10 กรัม Cornmeal ได้จากการบดเมล็ดข้าวโพดตากแห้ง (Mcgarrett®, USA) ให้ละเอียดจำนวน 50 กรัม และกากน้ำตาลปริมาตร 62.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 830 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave: Tomy SD-320, Tokyo, Japan) อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่นแล้วเติมสารกันบูด (10% Sodium benzoate) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร และสารละลาย 10%

tetracycline ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แล้วเทใส่หลอดเลี้ยงแมลงหวี่ปราศจากเชื้อ ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น ปิดจุกด้วยสำลีปราศจากเชื้อ นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ผสมเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการศึกษา

เตรียมอาหารแมลงหวี่ปริมาตร 1 ลิตร โดยผสมผงวุ้นสำหรับทำขนม (ตรานางเงือก® สีน้ำเงิน, กรุงเทพ, ประเทศไทย) ซึ่งเป็นผงวุ้นที่ได้จากการสกัดสาหร่ายทะเล จำนวน 5 กรัม, ยีสต์สกัดจาก *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA®, Germany) จำนวน 10 กรัม, cornmeal ได้จากการบดเมล็ดข้าวโพดตากแห้ง (Mcgarrett®, USA) ให้ละเอียด จำนวน 50 กรัม และกากน้ำตาล ปริมาตร 62.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 665 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วผสมกับเชื้อโพรไบโอติกที่เตรียมไว้ที่ค่าความขุ่น (OD: Optical density) เท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงแมลงหวี่:เชื้อโพรไบโอติก เท่ากับ 4:1 ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคนปราศจากเชื้อ เทใส่หลอดเลี้ยงแมลงหวี่ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปิดจุกด้วยสำลีปราศจากเชื้อ

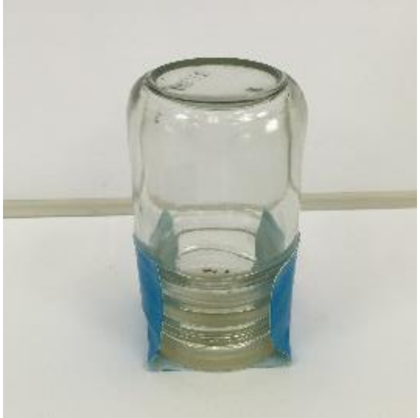
ชนิดและวิธีการเลี้ยงแมลงหวี่

แมลงหวี่ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* ชนิด wild type W^{118} ที่ถูกทำให้ปราศจากเชื้อโดยดัดแปลงวิธีของ Sabat และคณะ[44] มีขั้นตอนดังนี้

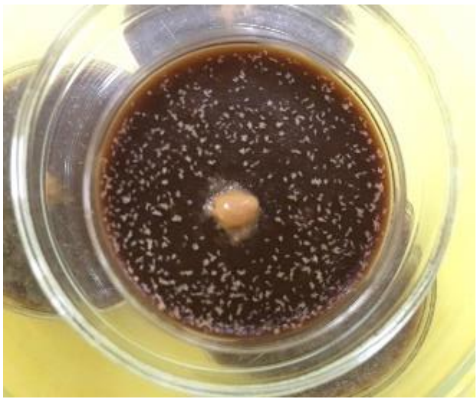
1. การเตรียมขวดสำหรับให้แมลงหวี่วางไข่:
   ก. เตรียมอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ปราศจากเชื้อที่ผสมสารกันบูด (10% Sodium benzoate) และสารละลาย 10% tetracycline ลงใน Sterile polystyrene plastic Petri dishes ขนาด 90 x 15 มิลลิเมตร ในตู้ปลอดเชื้อ ปล่อยไว้ให้แข็งตัว
   ข. เตรียมยีสต์สกัดจาก *Saccharomyces cerevisiae* ผสมน้ำเล็กน้อย คนให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็นครีม แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave: Tomy SD-320, Tokyo, Japan) อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส
   ค. นำยีสต์สกัดที่ทำให้ปราศจากเชื้อไปวางขึ้นรูปบนอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ที่เตรียมไว้ ภายในตู้ปลอดเชื้อ

ง. นำขวดแก้วปราศจากเชื้อ มาครอบจานอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ที่เตรียมไว้ พันด้วยเทปกาว ดังภาพที่ 1

2. ถ่ายแมลงหวี่ตัวเต็มวัยใส่ในขวดที่เตรียมไว้ ขวดละ 30-40 ตัว โดยเป็นเพศผู้ 10-15 ตัว เพศเมีย 20-25 ตัว ภายในตู้ปราศจากเชื้อ (laminar flow cabinet) แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงแมลงหวี่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 คืน
3. เมื่อผ่านไป 2 คืน แยกส่วนจานอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ออกจากขวดภายใต้ตู้ปราศจากเชื้อ จะได้จานอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ที่มีไข่แมลงหวี่อยู่ภายในอาหาร ดังภาพที่ 2 ล้างยีสต์สกัดออก ใส่ mili Q water ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และใช้พู่กันเขี่ยเบา ๆ บนอาหารเลี้ยงแมลงหวี่เพื่อให้ไข่หลุดออกจากอาหารเลี้ยงแมลงหวี่
4. ใช้ปิเปตต์ดูด mili Q water ที่มีไข่ลอยอยู่ กรองด้วยเซลล์กรอง (Cell Strainer 40μ, BD Falcon™,USA) หลังจากนั้นนำไข่แมลงหวี่ที่ได้แช่ใน 2.5% โซเดียมไฮโปรคลอไรต์ (NaOCl) นาน 2-3 นาที ตามด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง และสุดท้ายล้างด้วย mili Q water จนไม่มีกลิ่นของโซเดียมไฮโปรคลอไรต์
5. คัดเลือกไข่แมลงหวี่ที่ผ่านการล้างภายในเซลล์กรอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อร่วมกับคีมหนีบปลายแหลมปราศจากเชื้อ ย้ายไข่แมลงหวี่วางบนกระดาษกรอง (Whatman paper) แล้วนำไปวางในหลอดเลี้ยงแมลงหวี่ที่มีอาหารเตรียมไว้แล้ว หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงแมลงหวี่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รอจนแมลงหวี่โตเต็มวัยเป็นระยะเวลา 10-11 วัน
6. แมลงหวี่รุ่นแรกที่เกิดมานับเป็นรุ่น F0 หลังจากนั้นเลี้ยงแมลงหวี่ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะต่ออีก 3 รุ่น จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้ โดยมีการทดสอบการปราศจากเชื้อของแมลงหวี่ก่อนนำมาใช้ในการศึกษา

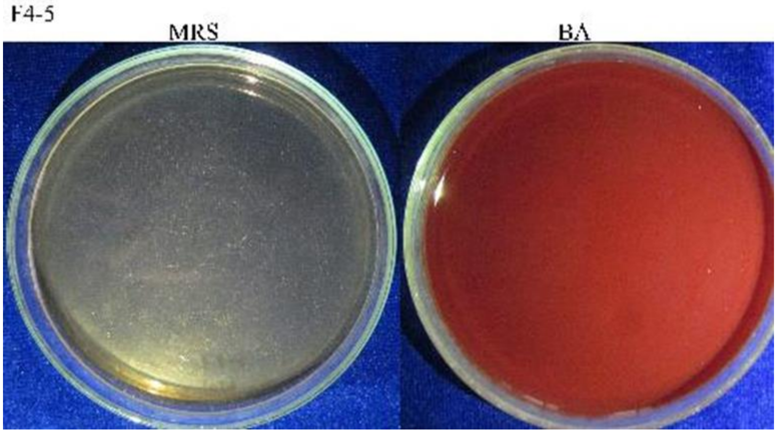


ภาพที่ 1 แสดงขวดสำหรับให้แมลงหวี่วางไข่

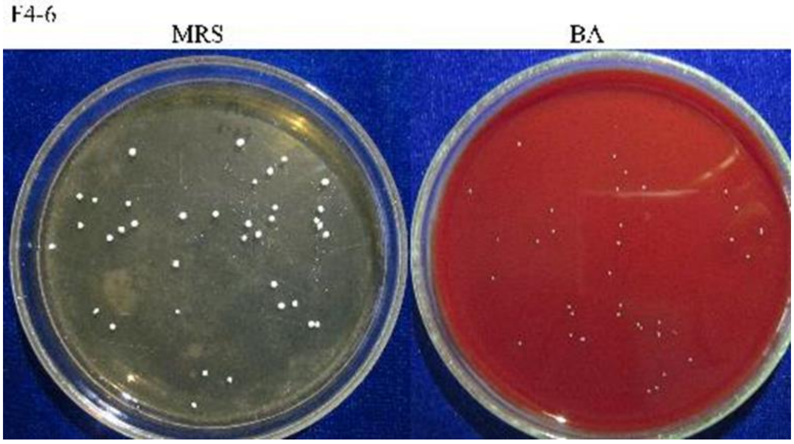


ภาพที่ 2 แสดงไข่แมลงหวี่บนอาหาร

ทดสอบการปราศจากเชื้อของแมลงหวี่โดยสุ่มแมลงหวี่ในหลอดที่ต้องการทดสอบหลอดละ 1-2 ตัว ทำให้แมลงหวี่สลบบนแท่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 2-3 นาที แล้วใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย PBS (Phosphate-buffered saline solution) 1 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว บี้แมลงหวี่ด้วยไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ ทำการทดสอบเชื้อด้วย Spread plate technique โดยดูดของเหลวจากหลอด หลอด Microcentrifuge จำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน MRS agar และ Blood agar เกลี่ยของเหลวให้ทั่วด้วย sterile spreader หลังจากนั้นนำไปบ่มทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 3 แสดง MRS agar และ Blood agar ที่ปราศจากโคโลนีของเชื้อจุลชีพ แสดงว่าแมลงหวี่ที่นำมาทดสอบปราศจากเชื้อ



ภาพที่ 4 แสดง MRS agar และ Blood agar ที่พบโคโลนีของเชื้อจุลชีพ แสดงว่าแมลงหวี่ที่นำมาทดสอบไม่ปราศจากเชื้อ

แมลงหวี่ปราศจากเชื้อที่ใช้ในการศึกษาถูกเลี้ยงในตู้เลี้ยงแมลงหวี่ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ห้องปฏิบัติการ BSC 1008 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิธีการย้ายแมลงหวี่

ทำการย้ายแมลงหวี่ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ โดยคว่ำหลอดเลี้ยงแมลงหวี่เพื่อให้แมลงหวี่บินขึ้นไปยังด้านบนของหลอด เปิดจุกสำลี นำหลอดที่ต้องการถ่ายแมลงหวี่มาประกบ แล้วเคาะให้แมลงหวี่ลงมายังหลอดที่ต้องการซึ่งอยู่ด้านล่าง หลังจากนั้นแยกหลอดออกจากกันและปิดจุกด้วยสำลีอย่างรวดเร็ว

การทำให้แมลงหวี่สลบ

นำหลอดเลี้ยงแมลงหวี่คว่ำบนแท่นปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 2-3 นาที หรือแช่ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้แมลงหวี่สลบ

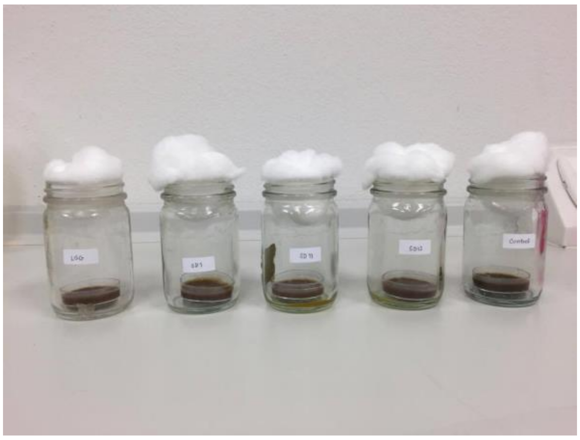
การกำจัดแมลงหวี่เมื่อเสร็จสิ้นการศึกษา

แช่แมลงหวี่ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำไปอบในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อก่อนทิ้ง

การศึกษาผลของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่

วิธีการศึกษา

เลี้ยงแมลงหวี่ปราศจากเชื้อในขวดเลี้ยงแมลงหวี่ เป็นเวลา 2 คืน แยกส่วนจานอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ภายในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำมาเก็บไข่แมลงหวี่ด้วยไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วางไข่แมลงหวี่บนจานอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ฟอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ผสมเชื้อโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ กลุ่มควบคุมเชิงบวก ผสมเชื้อโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG ปริมาณ 10^8 CFU/ml ในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ผสมเชื้อ *L. paracasei* SD1, *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ปริมาณ 10^8 CFU/ml ตามลำดับ ใส่จานอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ที่มีไข่แมลงหวี่ลงในขวดแก้วปราศจากเชื้อ แล้วปิดจุกด้วยสำลี ดังแสดงในภาพที่ 5 นำขวดแมลงหวี่ที่เตรียมไว้ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงแมลงหวี่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ติดตามและบันทึกการเจริญเติบโต ทั้งอัตราการรอดชีวิตในแต่ละช่วงวัย ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนแมลงหวี่ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย และขนาดและน้ำหนักตัวของแมลงหวี่ในแต่ละกลุ่มทุกวัน เมื่อแมลงหวี่โตเต็มวัยมีอายุ 7 วัน นำมาทำให้สลบบนแท่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ค่าเฉลี่ยจำนวนดักแด้และแมลงหวี่ตัวเต็มวัย และค่าเฉลี่ยน้ำหนักของแมลงหวี่ที่โตเต็มวัยในแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 5 แสดงขวดสำหรับเลี้ยงแมลงหวี่ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่ตั้งแต่ไข่จนถึงตัวเต็มวัย

การศึกษาการเจริญเติบโตของแมลงหวี่เมื่อได้รับ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ในระยะตัวเต็มวัย และการตั้งถิ่นฐานของเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาในลำไส้แมลงหวี่

วิธีการศึกษา

นำแมลงหวี่ตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 1-3 วัน จำนวน 300 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 60 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ตามปกติ, กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก เลี้ยงในอาหารที่เติม *L. rhamnosus* GG ปริมาณ 10^8 CFU/ml, กลุ่มที่ 3-5 เป็นกลุ่มศึกษา เลี้ยงในอาหารที่เติม *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ปริมาณ 10^8 CFU/ml ตามลำดับ เป็นเวลา 5 วัน ติดตามการเจริญเติบโตของแมลงหวี่ในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 โดยนำแมลงหวี่หลอดละ 12 ตัวจากแต่ละกลุ่ม ทำให้สลบบนแท่นก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซค์เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล 5 ตำแหน่ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นแยกส่วนลำไส้ของแมลงหวี่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำลำไส้ที่ได้ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย PBS 0.1 มิลลิลิตร บี้ไส้แมลงหวี่ด้วยไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปทำ dilution แล้วเพาะเชื้อในอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (80% N_2, 10% H_2 และ 10% CO_2) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล พิจารณาข้อมูลการเจริญเติบโตโดยดูจากน้ำหนักของแมลงหวี่และพิจารณา

ข้อมูลการตั้งถิ่นฐานของเชื้อโพรไบโอติกจากปริมาณเชื้อในลำไส้แมลงหวี่แต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณเชื้อในลำไส้แมลงหวี่ในแต่ละวัน

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากข้อมูลระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง น้ำหนักตัวเฉลี่ยของแมลงหวี่และปริมาณเชื้อในลำไส้มีการกระจายข้อมูลไม่เป็นแบบปกติ เมื่อทำการทดสอบด้วยสถิติ Kolmogorow-Smirnov จึงใช้สถิติที่ไม่ใช้พารามิเตอร์ (Nonparametric statistic) ในการทดสอบ

เปรียบเทียบระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่แต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบน้ำหนักของแมลงหวี่เมื่อได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอนจนถึงระยะตัวเต็มวัยและได้รับเมื่อระยะตัวเต็มวัยด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test และทดสอบ Posthoc ด้วยสถิติ Mann-Whitney Test ในโปรแกรม SPSS 1.60 โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

เปรียบเทียบจำนวนแมลงหวี่ที่สามารถพัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยด้วยสถิติ Chi-square test โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

เปรียบเทียบน้ำหนักและปริมาณเชื้อในลำไส้ของแมลงหวี่ในแต่ละวัน ทั้งปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาและปริมาณเชื้อจุลชีพทั้งหมด ด้วยสถิติ Friedman’s test และทดสอบ Posthoc test ด้วยสถิติ Bonferroni correction ในโปรแกรม SPSS 1.60 โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

จรรยาบรรณการศึกษาในสัตว์ทดลอง

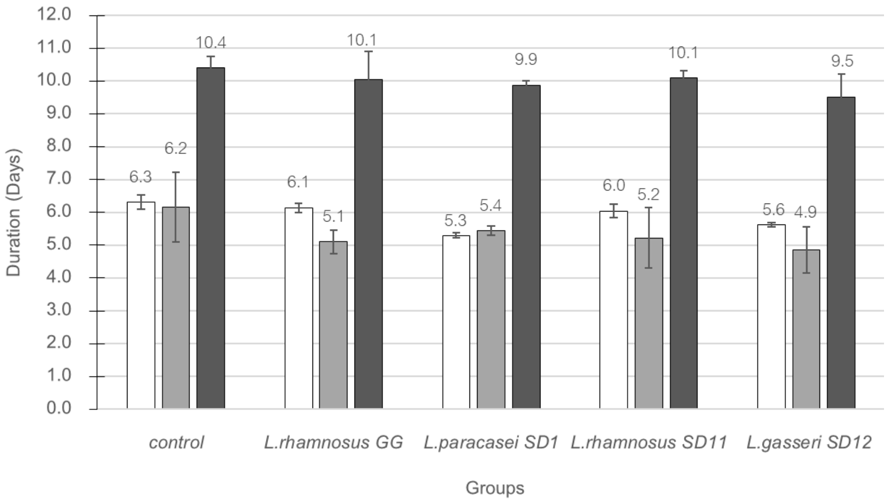
การวิจัยนี้ได้นำเสนอเพื่อการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมเพื่อการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และผ่านความเห็นชอบเรียบร้อยแล้ว ตามใบรับรองการตรวจสอบจริยธรรม MOE 0521.11/380 ในภาคผนวก

บทที่ 3

ผลการวิจัย

การศึกษาผลของโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่

แมลงหวี่กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG และกลุ่มทดลองที่ได้รับ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวหนอนเป็นดักแด้ในทุกกลุ่มใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 5.3-6.3 วัน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 4.9-6.2 วัน เช่นเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวหนอนเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 9.5-10.4 วัน จากการทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test และ Mann-Whitney Test เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่เมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกแต่ละชนิด พบว่าชนิดของโพรไบโอติกที่ได้รับไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่ในทุกระยะการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเจริญเติบโตของแมลงหวี่จากตัวหนอนเป็นดักแด้ (□) จากดักแด้เป็นตัวเต็มวัย (■) และจากตัวหนอนเป็นตัวเต็มวัย (■) ในแต่ละกลุ่มการศึกษา ข้อมูลกราฟแท่ง แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test และ Mann-Whitney Test ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ในทุกกลุ่มศึกษา

การศึกษาผลของโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อจำนวนแมลงหวี่ที่พัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย

กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG มีความสามารถในการพัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้ได้มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11 และ *L. paracasei* SD1 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 มีจำนวนดักแด้น้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของกลุ่มโพรไบโอติกทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

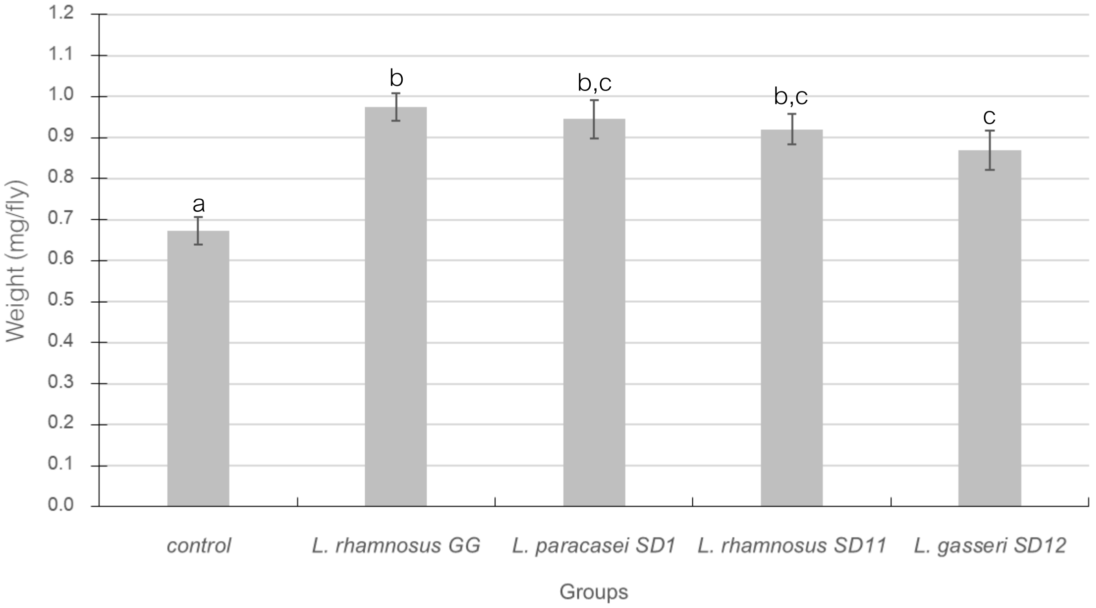
กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* SD11 มีความสามารถในการพัฒนาจากตัวหนอนเป็นตัวเต็มวัยสูงที่สุด รองลงมาคือ กลุ่ม *L. paracasei* SD1 ส่วนกลุ่ม *L. gasseri* SD12 มีอัตราการรอดชีวิตตั้งแต่ไข่ไปจนถึงตัวเต็มวัยน้อยที่สุดและใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* SD11 มีจำนวนแมลงหวี่ตัวเต็มวัยมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value $\leq$ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Chi-square test ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราแมลงหวี่ที่พัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย ในแต่ละกลุ่มการศึกษา โดยแสดงเป็นค่าร้อยละ(* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value $\leq$ 0.05 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Chi-square test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

กลุ่ม	**อัตราแมลงหวี่ที่พัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้**	**อัตราแมลงหวี่ที่พัฒนาจากตัวหนอนเป็นตัวเต็มวัย**
	ร้อยละ	**ร้อยละ**
กลุ่มควบคุม	26.00	22.00
กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG	37.33	35.33*
กลุ่มที่ได้รับ *L. paracasei* SD1	31.66	28.67
กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11	35.33	35.33*
กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12	20.00	20.00

การศึกษาผลของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อน้ำหนักของแมลงหวี่ เมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอน

แมลงหวี่ที่ศึกษากลุ่มต่าง ๆ มีน้ำหนักเมื่อเป็นตัวเต็มวัยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value $\leq$ 0.05) เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test แมลงหวี่ตัวเต็มวัยกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยน้อยที่สุด ส่วนกลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับ *L. paracasei* SD1 รองลงมาคือ กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ตามลำดับ โดยแมลงหวี่ทุกกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value $\leq$ 0.05) และกลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value $\leq$ 0.05) เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Mann-Whitney Test ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 แสดงให้เห็นว่า ชนิดของโพรไบโอติกมีผลต่อน้ำหนักตัวของแมลงหวี่ เมื่อให้โพรไบโอติกแก่แมลงหวี่ตั้งแต่ระยะตัวหนอน

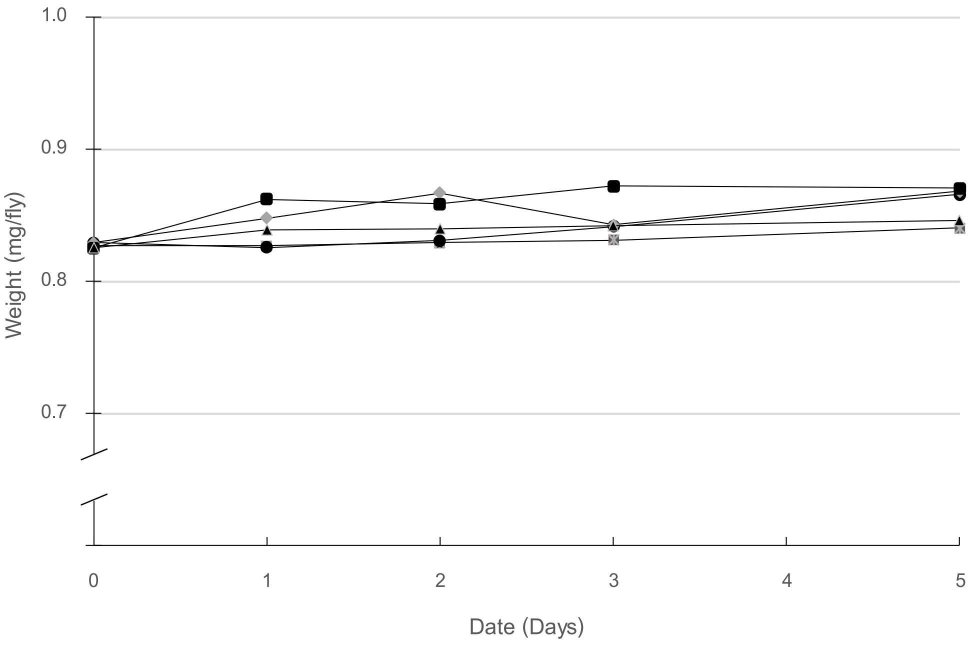


ภาพที่ 7 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของแมลงหวี่โตเต็มวัยในแต่ละกลุ่มการศึกษา (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอน ข้อมูลกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) (ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value $\leq$ 0.05 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test และ Mann-Whitney Test)

ภาพที่ 8 ขนาดแมลงหวี่ตัวเต็มวัยอายุ 7 วันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะตัวหนอน (A: กลุ่มควบคุม B, C, D, E : กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* SD1, *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ตามลำดับ) ที่มา ภาพถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo Microscope) กำลังขยาย 20x (Nikon, SMZ800N)

การศึกษาผลของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ต่อน้ำหนักของแมลงหวี่ เมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัย

เมื่อแมลงหวี่ได้รับโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัย พบว่าแต่ละกลุ่มมีค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวันอยู่ในช่วง 0.83-0.87 มิลลิกรัมต่อตัว ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยจากการวิเคราะห์ทางสถิติการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เปลี่ยนจากตั้งต้น โดยใช้สถิติ Friedman's test พบว่าแมลงหวี่กลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรไบโอติกทุกชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ยเมื่อเวลาเปลี่ยนไป และพบว่าที่แต่ละช่วงเวลาน้ำหนักตัวเฉลี่ยของแมลงหวี่ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างตลอดระยะเวลาศึกษา (สถิติ Kruskal-Wallis Test ที่ p value ≤ 0.05 แสดงให้เห็นว่าชนิดของโพรไบโอติกไม่มีผลต่อน้ำหนักของแมลงหวี่ เมื่อแมลงหวี่ได้รับโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัยแล้ว

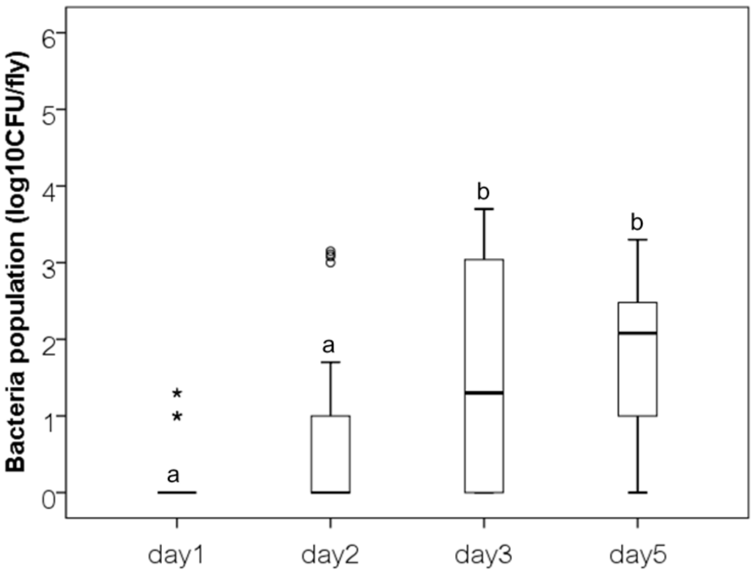


ภาพที่ 9 กราฟเส้นแสดงน้ำหนักเฉลี่ยในช่วงเวลาต่าง ๆ ของแมลงหวี่แต่ละกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัย (—■— กลุ่มควบคุม, —●—กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG, —◆— กลุ่มที่ได้รับ *L. paracasei* SD1, —■— กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11 และ —▲—กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12)

การศึกษาการตั้งถิ่นฐานของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ในลำไส้แมลงหวี่ เมื่อได้รับโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัย

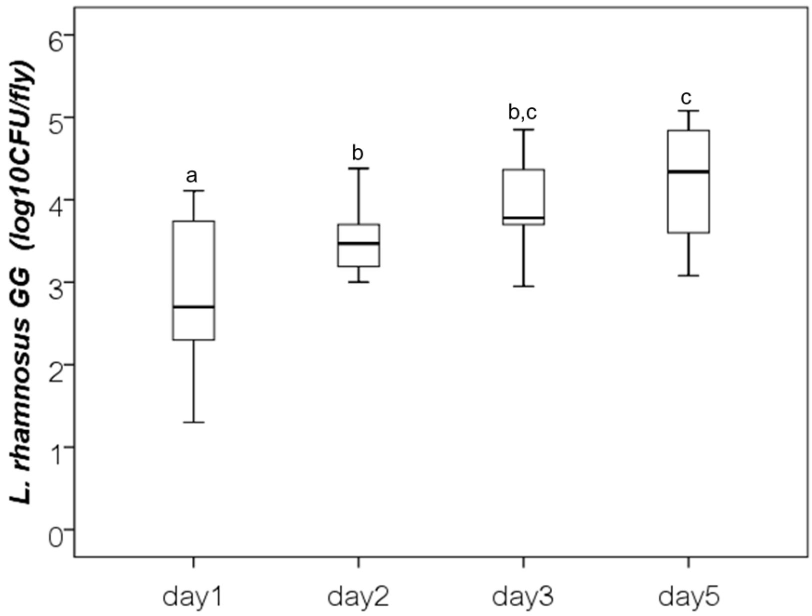
จากการศึกษาการตั้งถิ่นฐานของโพรไบโอติกต่อปริมาณเชื้อจุลชีพในลำไส้แมลงหวี่ โดยแบ่งแมลงหวี่ออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปราศจากเชื้อ กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1, *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ตามลำดับ โดยวัดปริมาณเชื้อในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 จากการศึกษาพบว่าแมลงหวี่กลุ่มควบคุม ไม่พบเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา แสดงว่าในลำไส้ของแมลงหวี่ไม่มีโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาอยู่ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีปริมาณเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นในลำไส้เพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่ใช้ในการศึกษา ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยปริมาณเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นเพิ่มขึ้นสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.42$\pm$1.34 log10CFU/ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ

เฉลี่ยเท่ากับ 0.22±0.45 log10CFU/ตัว และมีปริมาณเพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.75±1.01 log10CFU/ตัว



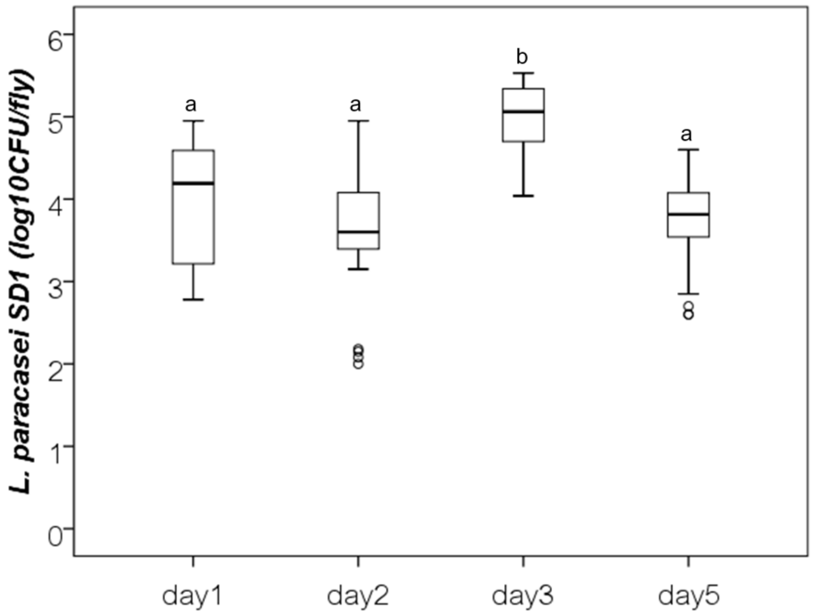
ภาพที่ 10 แสดงปริมาณเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นในลำไส้แมลงหวี่ (log10CFU/ตัว) ของกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปราศจากเชื้อในช่วงตัวเต็มวัย ข้อมูลแผนภาพกล่องแสดงค่ามัธยฐาน ควอร์ไทล์ที่ 1 และ 3 และค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุดของข้อมูล ในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 ของการศึกษา(ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value ≤ 0.001 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Friedman's test และทดสอบ Post Hoc test โดยใช้สถิติ Bonferroni correction)

แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG มีปริมาณเชื้อ *L. rhamnosus* GG ในลำไส้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา โดยเริ่มมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังได้รับ *L. rhamnosus* GG ในวันที่ 2 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.54$\pm$0.42 log10CFU/ตัว และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 4.19$\pm$0.68 log10CFU/ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 2.78$\pm$0.84 log10CFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 11



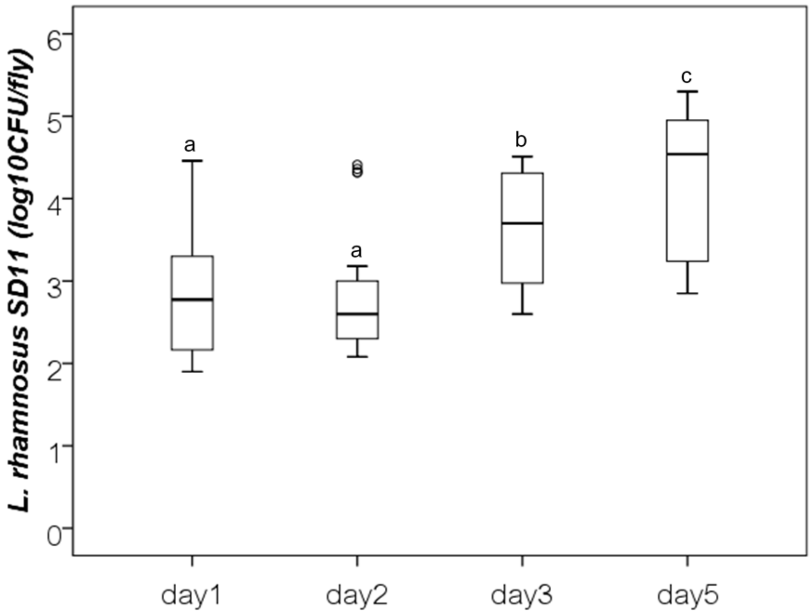
ภาพที่ 11 แสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG ในลำไส้ของแมลงหวี่ (log10CFU/ตัว) ที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG ในช่วงตัวเต็มวัย ข้อมูลแผนภาพกล่องแสดงค่ามัธยฐาน ควอร์ไทล์ที่ 1 และ 3 และค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุดของข้อมูล ในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 ของการศึกษา (ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value $\leq$ 0.001เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Friedman's test และทดสอบ Post Hoc test โดยใช้สถิติ Bonferroni correction)

แมลงหวี่กลุ่มที่ได้เชื้อ *L. paracasei* SD1 มีปริมาณเชื้อ *L. paracasei* SD1 ในลำไส้หลังได้รับเชื้อโพรไบโอติกในวันที่ 1 และวันที่ 2 ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 4.00±0.68 log10CFU/ตัว และ 3.60±0.78 log10CFU/ตัว ตามลำดับ โดยมีปริมาณเชื้อ *L. paracasei* SD1 เพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 4.98±0.44 log10CFU/ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 และในวันที่ 5 มีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกลดลงจนมีปริมาณใกล้เคียงกับวันที่ 1 และวันที่ 2 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.73±0.53 log10CFU/ตัว ดังแสดงในภาพที่ 12



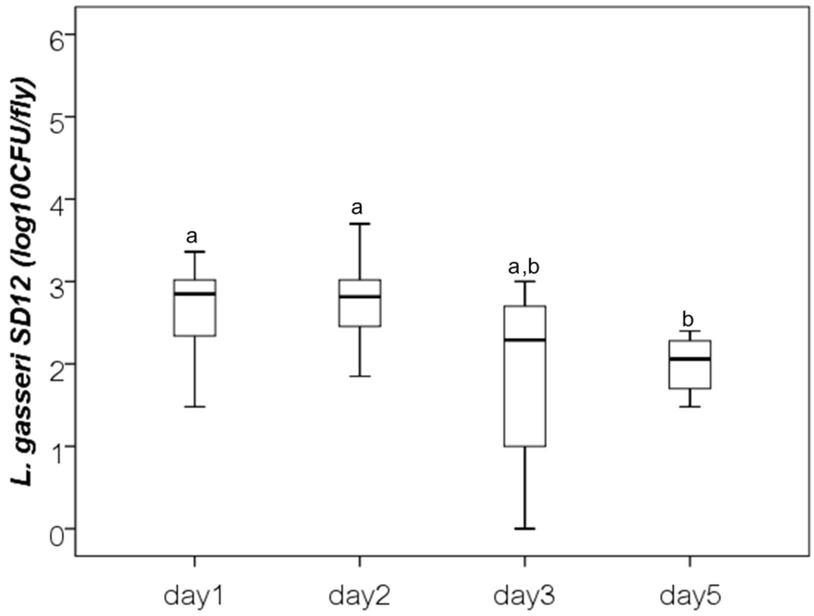
ภาพที่ 12 แสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 ในลำไส้แมลงหวี่ (log10CFU/ตัว) ที่ได้รับ *L. paracasei* SD1 ในช่วงตัวเต็มวัย ข้อมูลแผนภาพกล่อง แสดงค่ามัธยฐาน ควอร์ไทล์ที่ 1 และ 3 และค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุดของข้อมูล ในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 ของการศึกษา (ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value $\leq$ 0.001 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Friedman’s test และทดสอบ Post Hoc test โดยใช้สถิติ Bonferroni correction)

แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *L. rhamnosus* SD11 มีปริมาณเชื้อ *L. rhamnosus* SD11 ในลำไส้หลังได้รับเชื้อโพรไบโอติกในวันที่ 1 และวันที่ 2 ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 2.88±0.80 log10CFU/ml และ 2.80±0.71 log10CFU/ml ตามลำดับ และเริ่มมีปริมาณเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย เท่ากับ 3.67±0.65 log10CFU/ตัว และมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 5 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย เท่ากับ 4.19±0.90 log10CFU/ตัว) ดังแสดงในภาพที่ 13



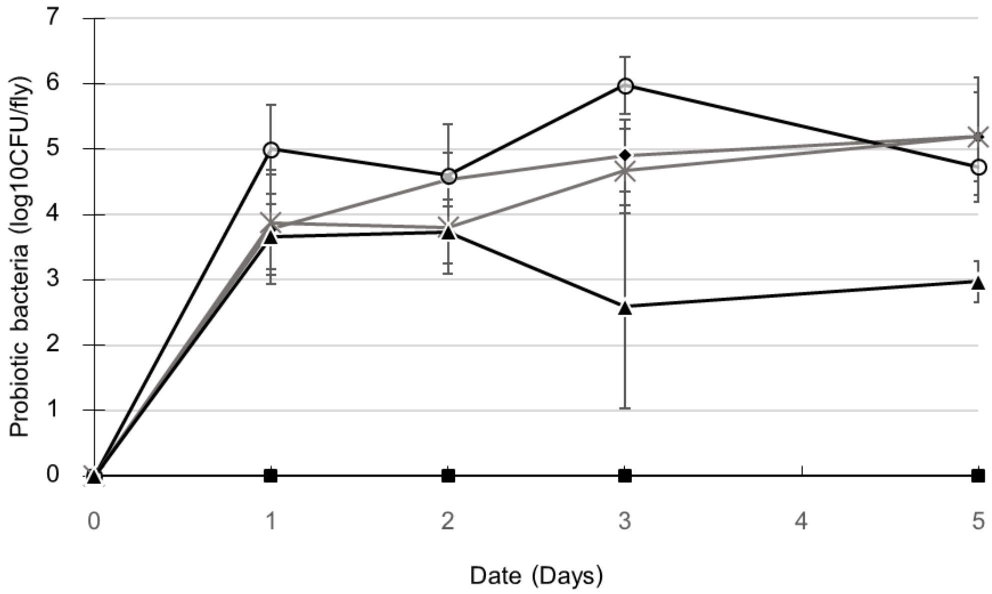
ภาพที่ 13 แสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. rhamnosus* SD11 ในลำไส้แมลงหวี่ (log10CFU/ตัว) ที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11 ในช่วงตัวเต็มวัย ข้อมูลแผนภาพกล่อง แสดงค่ามัธยฐาน ควอร์ไทล์ที่ 1 และ 3 และค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุดของข้อมูล ในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 ของการศึกษา (ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value $\leq$ 0.01 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Friedman's test และทดสอบ Post Hoc test โดยใช้สถิติ Bonferroni correction)

แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *L. gasseri* SD12 มีปริมาณเชื้อ *L. gasseri* SD12 ในลำไส้หลังได้รับเชื้อโพรไบโอติกใกล้เคียงกันทั้งในวันที่ 1และ 2 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 2.67$\pm$0.50 log10CFU/ตัว และ 2.74$\pm$0.49 log10CFU/ตัว ตามลำดับ และปริมาณเชื้อเริ่มลดลงในวันที่ 3 โดยมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.84$\pm$1.12 log10CFU/ตัว และพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.98$\pm$0.31 log10CFU/ตัว ดังแสดงในภาพที่ 14 โดยในวันที่ 3 เริ่มพบเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นร่วมด้วย



ภาพที่ 14 แสดงปริมาณเชื้อโพรไบโอติก *L. gasseri* SD12 ในลำไส้แมลงหวี่ (log10CFU/ตัว) ที่ได้รับเชื้อ *L. gasseri* SD12 ในช่วงตัวเต็มวัย ข้อมูลแผนภาพกล่อง แสดงค่ามัธยฐาน ควอร์ไทล์ที่ 1 และ 3 และค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุดของข้อมูล ในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 ของการศึกษา (ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p* value $\leq$ 0.001 เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Friedman’s test และทดสอบ Post Hoc test โดยใช้สถิติ Bonferroni correction)

จากข้อมูลทั้งหมดพบว่าแมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG *L. paracasei* SD1 และ *L. rhamnosus* SD11 มีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้เพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังได้รับเชื้อโพรไบโอติกในวันที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ยกเว้นแมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก *L. gasseri* SD12 โดยพบปริมาณเชื้อ *L. gasseri* SD12 ในลำไส้เพิ่มขึ้นสูงสุดตั้งแต่วันที่ 1 อย่างไรก็ตามพบว่าระดับปริมาณของเชื้อนี้ในลำไส้มีค่าต่ำกว่าปริมาณเชื้อในกลุ่มโพรไบโอติกอื่นในทุกระยะเวลาที่ศึกษา ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 กราฟเส้นแสดงปริมาณเฉลี่ยของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้แมลงหวี่แต่กลุ่มการศึกษาเมื่อได้รับโพรไบติกในช่วงตัวเต็มวัย (log10CFU/ตัว) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา ข้อมูลเป็นกราฟเส้นแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) (—■— กลุ่มควบคุม, —◆—กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG, —○— กลุ่มที่ได้รับ *L. paracasei* SD1, —✳— กลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* SD11 และ —▲— กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12)

บทที่ 4

บทวิจารณ์

การศึกษานี้เป็นรูปแบบการทดลอง ในโมเดลแมลงหวี่โดยเลือกใช้แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* ชนิด W^{1118} เพื่อศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อโฮสต์(แมลงหวี่)ในด้านระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนแมลงหวี่ที่พัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย และน้ำหนักตัวของแมลงหวี่ เมื่อได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอนและศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อน้ำหนักและการตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่เมื่อได้รับโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัยแล้ว โดยเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับอาหารปราศจากเชื้อ และกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG พบว่าโมเดลแมลงหวี่เป็นโมเดลที่เหมาะสมในการศึกษาเบื้องต้นถึงความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยระหว่างโฮสต์และจุลชีพในลำไส้ สามารถจำลองปฏิกิริยาระหว่างอาหาร เชื้อจุลชีพ และลักษณะทางชีวภาพของโฮสต์ (host biological trait) ได้[14] เนื่องจากแมลงหวี่มีระบบทางเดินอาหารที่คล้ายคลึงกับมนุษย์ จึงสามารถใช้เป็นโมเดลอย่างง่ายจำลองระบบทางเดินอาหารของมนุษย์[41] แต่อย่างไรก็ตามการใช้โมเดลแมลงหวี่ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากแมลงหวี่มีลักษณะทางกายภาพ ระบบพันธุกรรม และลักษณะทางเคมี (Biochemical) ที่แตกต่างจากมนุษย์ ทำให้ร่างกายเกิดการตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพหรือเชื้อไวรัสที่นำมาใช้ศึกษาแตกต่างกัน[45,46]

การศึกษาการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนแมลงหวี่ที่พัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย และน้ำหนักของแมลงหวี่ เมื่อได้รับอาหารที่มีเชื้อโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอนจนถึงตัวเต็มวัย พบว่าชนิดของเชื้อโพรไบโอติกไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่ ทุกกลุ่มการศึกษาใช้ระยะเวลาใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก มีระยะเวลาการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเร็วกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Newell และคณะ[47] พบว่าแมลงหวี่ที่ได้รับเชื้อโพรไบโอติกรวม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. pomorum A. tropicalis L. brevis L. fructivorans* และ *L. plantarum* มีระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเร็วกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเป็นแมลงหวี่ปราศจากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารปราศจากเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มประชากรที่ใช้มีจำนวนมากกว่าจึงพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Newell และคณะ[47] มีการสังเกตระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างวันละ 3 ครั้ง

ทำให้เห็นระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่ชัดเจน ในกลุ่มที่ได้รับ *L. plantarum* และ *L. brevis* มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตในระยะตัวหนอนสั้นกว่ากลุ่มแมลงหวี่ปราศจากเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับ *L. fructivorans* ไม่พบความแตกต่างของระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่แตกต่างจากกลุ่มแมลงหวี่ปราศจากเชื้อ แสดงถึงความจำเพาะของสายพันธุ์ของโพรไบโอติกส่งผลที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่ นอกจากนี้การที่แมลงหวี่ที่ได้รับโพรไบโอติกมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างสั้นกว่ากลุ่มควบคุม ทำให้มีโอกาสในการเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัยและมีโอกาสสืบพันธุ์เร็วกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลานานในการเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย

จากความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ ในการควบคุมการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหวี่[14] จึงอาจเป็นผลให้แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการพัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการที่แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 มีอัตราการพัฒนาเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม อาจเนื่องจาก *L. gasseri* SD12 ไม่มีผลส่งเสริมการรอดชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยของแมลงหวี่เหมือนโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่น และ *L. gasseri* SD12 สามารถคงอยู่ในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ในระยะเวลาสั้นกว่าเชื้อโพรไบโอติกชนิดอื่นที่ใช้ในการศึกษา

นอกจากนี้แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 ตั้งแต่ระยะตัวหนอนมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ซึ่งเป็นโพรไบโอติกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการคงอยู่ในลำไส้แมลงหวี่ สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแมลงหวี่ในระยะตัวหนอนและทำให้แมลงหวี่ตัวเต็มวัยมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น[48] และจากการศึกษาในหนูแรกเกิดที่ได้รับ *L. plantarum* ในอาหาร พบว่าหนูมีน้ำหนักและการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม[49] ทั้งนี้เนื่องจากโพรไบโอติกมีบทบาทในการส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อ ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และส่งเสริมกลไกการป้องกันของเยื่อบุลำไส้ (intestinal mucosal barrier function) ทำให้เสริมความสามารถในการดูดซึมสารอาหารและป้องกันการรุกรานของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค[50] อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าแมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่มที่ได้รับ *L. paracasei* SD1 และ *L. rhamnosus* SD11 มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกต่างสายพันธุ์กันมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแมลงหวี่ได้แตกต่างกัน และโพรไบโอติกสาย

พันธุ์ที่ใช้ในช่องปาก เช่น *L. paracasei* SD1 และ *L. rhamnosus* SD11 ก็มีผลดีต่อร่างกายแมลงหวี่ได้ไม่ต่างจากโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่มีเป้าหมายเพื่อสุขภาพร่างกายอย่าง *L. rhamnosus* GG

การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต เมื่อแมลงหวี่ผ่านระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสู่ระยะตัวเต็มวัยแล้ว โดยพิจารณาน้ำหนักของแมลงหวี่พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของแมลงหวี่ทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน และค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องจากโพรไบโอติกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแมลงหวี่หากได้รับเมื่อโตเต็มวัยแล้ว จากการวิเคราะห์อภิมาน (meta-analysis) ของ Million M และคณะ[51] พบว่า *Lactobacillus* มีผลต่อน้ำหนักของมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันไป ขึ้นกับสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* โดย *L. fermentum* และ *L. ingluviei* สัมพันธ์กับการมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นในสัตว์ที่โตเต็มวัย โดยจากการศึกษาในลูกไก่อายุ 1 สัปดาห์ ที่ได้รับอาหารที่มี *L. fermentum* และ *Lactobacillus* spp. (Autruche 4) พบว่าลูกไก่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับโพรไบโอติกเป็นเวลา 8 วัน และ 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม[52] แต่มีการศึกษาที่พบว่า *L. plantarum* มีผลในการลดน้ำหนักในสัตว์ทดลองที่อ้วนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลในการลดน้ำหนักในสัตว์ทดลองที่ไร้ไขมันเพียงเล็กน้อยใน ส่วน *L. gasseri* มีการศึกษาที่พบว่าเป็นโพรไบโอติกมีความสัมพันธ์กับการลดน้ำหนักในคนอ้วนและในสัตว์เช่นกัน ในขณะที่ *L. reuteri L. casei L. rhamnosus* และ *L. sporogenes* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักในสัตว์ทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[53] ทั้งนี้เนื่องจากสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* ที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโฮสต์ที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความจำเพาะของโฮสต์และสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* อีกทั้งจุลชีพที่ได้รับจากภายนอก เช่น จุลชีพที่ได้รับจากอาหาร ไม่สามารถตั้งถิ่นฐานในแมลงหวี่ตัวเต็มวัยได้ต้องได้รับเพิ่มเติมจากภายนอกเป็นระยะ[40] จึงอาจเป็นเหตุให้แมลงหวี่ที่ได้รับเชื้อโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัยแล้ว ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ชัดเจน เหมือนได้รับในช่วงที่กำลังมีการเจริญเติบโต นอกจากนี้การที่น้ำหนักของแมลงหวี่ที่ได้รับโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัยของแต่ละกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันนัก อาจเนื่องจากแมลงหวี่เป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็กและมีน้ำหนักเบา ทำให้การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักไม่ชัดเจน การทดสอบผลของโพรไบโอติกในการควบคุมน้ำหนักของแมลงหวี่ที่ถูกชักนำให้แมลงหวี่อ้วนโดยการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของไขมันในปริมาณสูง เช่น 30% น้ำมันมะพร้าว[54] อาจทำให้เห็นความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวได้ชัดเจนกว่า

จากการศึกษาการตั้งถิ่นฐานของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้แมลงหวี่ ติดตามปริมาณเชื้อจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่เมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกเมื่อโตเต็มวัย โดยนำลำไส้ของแมลงหวี่หลังได้รับโพรไบโอติกในวันที่ 1, 2, 3 และ 5 มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะกับเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus*

(MRS agar) พบว่าในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารปราศจากเชื้อ ไม่มีเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา แต่เมื่อพิจารณาเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นในลำไส้แมลงหวี่ในกลุ่มควบคุม พบว่าปริมาณเชื้อจุลชีพมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป แสดงถึงมีการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพจากภายนอก สอดคล้องกับการศึกษาของ Blum JE และคณะ[40] ที่พบเชื้อจุลชีพในลำไส้ของแมลงหวี่ปราศจากเชื้อที่ใช้ในการศึกษาที่ได้รับอาหารปราศจากเชื้อเช่นเดียวกัน เมื่อเพาะเชื้อใน MRS agar และ Nutrient agar ทั้งนี้เนื่องจากแมลงหวี่อาจได้รับเชื้อจุลชีพจากสิ่งแวดล้อมภายนอกด้วย ทำให้พบเชื้อจุลชีพในแมลงหวี่ปราศจากเชื้อได้ หรืออาจเนื่องจากในการเลี้ยงแมลงหวี่ปราศจากเชื้อ จะเลี้ยงในอาหารที่ผสมยาปฏิชีวนะ ทำให้เมื่อนำมาศึกษาแมลงหวี่ถูกเลี้ยงในอาหารปราศจากเชื้อที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ ทำให้ เชื้อจุลชีพที่เคยถูกยาปฏิชีวนะกดไว้ สามารถเจริญเติบโตได้

ในแมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG *L. paracasei* SD1 และ *L. rhamnosus* SD11 พบเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาในลำไส้แมลงหวี่ โดยพบในปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติกนั้น ๆ อยู่ โดยพบปริมาณเชื้อสูงสุดในวันที่ 3 แล้วจึงลดลงในวันต่อ ๆ ไปแสดงถึงความสามารถในการตั้งถิ่นฐานได้ในลำไส้แมลงหวี่ อีกทั้งไม่พบจุลชีพชนิดอื่นตลอดช่วงที่ได้รับโพรไบโอติก แสดงว่าเชื้อโพรไบโอติกดังกล่าวอาจมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลชีพชนิดอื่นได้ ในขณะที่แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 พบว่าในลำไส้มีปริมาณเชื้อ *L. gasseri* SD12 ที่ไม่สูงนัก มีการลดลงเร็วกว่าจนต่ำกว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่น และยังพบจุลชีพสายพันธุ์อื่นเจริญขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ที่ได้รับโพรไบโอติก ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *L. gasseri* SD12 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่นได้ และสภาวะแวดล้อมในลำไส้ของแมลงหวี่อาจไม่เหมาะสมกับการอยู่ของ *L. gasseri*

บทที่ 5

สรุป

จากการศึกษาผลของ *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosu* SD11 *L. gasseri* SD12 และ *L. rhamnosus* GG ต่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง อัตราแมลงหวี่ที่พัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย และน้ำหนักของแมลงหวี่ ตั้งแต่ระยะตัวหนอนถึงตัวเต็มวัย โดยนำไข่แมลงหวี่มาเลี้ยงในอาหารที่มีเชื้อโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosu* SD11 *L. gasseri* SD12 และ *L. rhamnosus* GG เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปราศจากเชื้อ พบว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างสั้นกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกทุกกลุ่มมีอัตราการพัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 ที่มีอัตราการพัฒนาจากตัวหนอนเป็นดักแด้และตัวเต็มวัยใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะตัวหนอนทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเมื่อตัวเต็มวัยมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ยของแมลงหวี่เมื่อได้รับโพรไบโอติกในช่วงตัวเต็มวัย ในแมลงหวี่ตัวเต็มวัยที่ได้รับโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG *L. paracasei* SD1 และ *L. rhamnosus* SD11 พบว่ามีปริมาณโพรไบโอติกในลำไส้เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติกนั้น ๆ โดยพบปริมาณเชื้อสูงสุดในวันที่ 3 แล้วจึงลดลงในวันต่อ ๆ ในขณะที่แมลงหวี่กลุ่มที่ได้รับ *L. gasseri* SD12 พบว่าในลำไส้มีปริมาณเชื้อ *L. gasseri* SD12 ที่ไม่สูงนัก และยังมีการลดลงเร็วกว่า และต่ำกว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่น ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 *L. rhamnosus* SD11 และ *L. gasseri* SD12 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยของแมลงหวี่เมื่อได้รับโพรไบโอติกในระยะตัวเต็มวัยได้เช่นเดียวกับ *L. rhamnosus* GG ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่มีการใช้ทั้งในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการคงอยู่ของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้แมลงหวี่ และผลของโพรไบโอติกต่อการมีอายุยืนของแมลงหวี่ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization [homepage on the internet]. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [cited 2016 Apr 10]. Available from: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
2. Parvez S, Malik KA, Kang SAh, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. ***J Appl Microbiol*** 2006; 100(6): 1171-85.
3. Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and gut feelings. ***Brain Behav Immun*** 2010; 24(1): 9-16.
4. Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health. ***Curr Opin Biotechnol*** 2010; 21(2): 157-67.
5. Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Garcia-Fruitós E. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. ***Microb Cell Fact*** 2015; 14(1): 1-12.
6. Wannun P, Piwat S, Teanpaisan R. Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. ***Anaerobe*** 2014; 27: 17-21.
7. Wannun P, Piwat S, Teanpaisan R. Purification characterization and optimum conditions of Fermencin SD11 a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus rhamnosus* SD11. ***Appl Biochem Biotechnol*** 2016; 179: 572-82.
8. Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. ***Lett Appl Microbiol*** 2015; 61(1): 98-105.
9. Vestman NR. *Lactobacillus* characterization and effects on oral biofilm composition [Dissertation]. Umeå: Umeå University; 2013.
10. Selle K, Klaenhammer TR. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. ***FEMS Microbiol Rev*** 2013; 37(6): 915-35.

11. Gomez-Llorente C, Munoz-Quezada S, Gil A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. The Proceedings of the Nutrition Society. 2010; 69(3): 381-89.
12. นงนุช เอื้อวงศ์. แมลงหวี่กับการทดลองทางพันธุศาสตร์. นครปฐม: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2555.
13. Apidianakis Y, Rahme LG. *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. ***Nat Protoc*** 2009; 4(9): 1285-94.
14. Matos RC, Leulier F. Lactobacilli-Host mutualism: "learning on the fly". Proceedings of the 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria; 2014 Aug 21-Sep 4; Egmond aan Zee, Netherland. Microb cell Fact, 2014.
15. Apidianakis Y, Rahme LG. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. ***Dis Model Mech*** 2011; 4(1): 21-30.
16. Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, et al. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. ***Science*** 2008; 319(5864): 777-82.
17. Wong CNA, Ng P, Douglas AE. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. ***Environ Microbiol*** 2011; 13(7): 1889-900.
18. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. ***Nature*** 2010; 464: 59-65.
19. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. ***Cell*** 2006; 124(4): 837-48.
20. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. ***Nat Rev Gastroenterol Hepatol*** 2010; 7(9): 503-14.
21. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. ***Therap Adv Gastroenterol*** 2013; 6(1): 39-51.

22. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. ***Gastroenterology*** 2008; 135(2): 568-79.

23. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. ***Arch Oral Biol*** 2002; 47(11): 799-804.

24. Meurman JH, Antila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. ***Eur J Oral Sci*** 1995; 103(4): 253-58.

25. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. ***Caries Res*** 2001; 35(6): 412-20.

26. Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. ***Oral Dis*** 2007; 13(5): 443-51.

27. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1987; 31(8): 1231-3.

28. Yli-Knuuttila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. ***Oral Microbiol Immunol*** 2006; 21(2): 129-31.

29. Kim B, Park KY, Ji Y, Park S, Holzapfel W, Hyun CK. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. ***Biochem Biophys Res Commun*** [Internet]. 2016 [cited 2016 April 10]. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.107.

30. Szajewska H, Kolodziej M. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children and adults. ***Aliment Pharmacol Ther*** 2015; 42(10): 1149-57.

31. Cruchet S, Furnes R, Maruy A, Hebel E, Palacios J, Medina F, et al. The use of probiotics in pediatric gastroenterology: a review of the literature and recommendations by Latin-American experts. ***Paediatr Drugs*** 2015; 17(3): 199-216.

32. Ritthagol W, Saetang C, Teanpaisan R. Effect of probiotics containing *Lactobacillus paracasei* SD1 on salivary Mutans Streptococci and Lactobacilli in orthodontic cleft patients: a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. ***Cleft Palate Craniofac J*** 2014; 51(3): 257-63.
33. Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus paracasei* SD1 a novel probiotic reduces mutans streptococci in human volunteers: a randomized placebo-controlled trial. ***Clin Oral Invest*** 2014; 18: 857-62.
34. Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmontree A, Dahlén G. *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. ***Mol Oral Microbiol*** 2010; 25(2): 157-64.
35. ปาริมา นันทรักษ์ชัยกุล, สุพัชรินทร์ พิวัฒน์, นุชนรี อัครชะนียากร, รวี เถียรไพศาล. ผลของโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัสเฟอเมนตุมเอสดี 11 ต่อเชื้อมิวแทนส์สเตรปโตคอคไคและเชื้อราในอาสาสมัคร. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ 2559; วันที่ 15 มกราคม 2559; อาคารพจน์ สารสิน. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2559. หน้า 858-65.
36. Koll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M, et al. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. ***Oral Microbiol Immunol*** 2005; 20(6): 354-61.
37. Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. ***Lett Appl Microbiol*** 2011; 53(4): 452-9.
38. Sakamoto I, Igarashi M, Kimura K, Takagi A, Miwa T, Koga Y. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. ***J Antimicrob Chemother*** 2001; 47(5): 709-10.
39. Fujimura S, Kato S, Oda M, Miyahara M, Ito Y, Kimura K, et al. Detection of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans. ***Lett Appl Microbiol*** 2006; 43(5): 578-81.
40. Blum JE, Fischer CN, Miles J, Handelsman J. Frequent Replenishment Sustains the Beneficial Microbiome of *Drosophila melanogaster*. ***mBio*** 2013; 4(6): e00860-13.

41. Broderick NA, Lemaitre B. Gut-associated microbes of ***Drosophila melanogaster***. ***Gut Microbes*** 2012; 3(4): 307-21.
42. Chandler JA, Lang JM, Bhatnagar S, Eisen JA, Kopp A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. ***PLoS Genet*** 2011; 7(9): e1002272.
43. Corby-Harris V, Pontaroli AC, Shimkets LJ, Bennetzen JL, Habel KE, Promislow DE. Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. ***Appl Environ Microbiol*** 2007; 73(11): 3470-9.
44. Sabat D, Johnson EM, Abhinay A, Jayabalan R, Mishra M. A protocol to generate germ free *Drosophila* for microbial interaction studies. ***Adv Tech Biol Med*** 2015; S1(1): 1-6.
45. Hughes TT, Allen AL, Bardin JE, Christian MN, Daimon K, Dozier KD, et al. *Drosophila* as a genetic model for studying pathogenic human viruses. ***Virology*** 2012; 423(1): 1-5.
46. Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. ***Pharmacol Rev*** 2011; 63(2): 411-36.
47. Newell PD, Douglas AE. Interspecies interactions determine the impact of the gut microbiota on nutrient allocation in *Drosophila melanogaster*. ***Applied Microbiology*** 2014; 80(2): 788-96.
48. Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signal through TOR-dependent nutrient sensing. ***Cell Metab*** 2011; 14: 403-14.
49. Schwarzer M, Makki K, Storelli G, Machuca-Gayet I, Srutkova D, Hermanova P, et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. ***Microbiome*** 2016; 351(6275): 854-6.
50. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. ***Nutr Rev*** 2015; 73 Suppl 1: 32-40.
51. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. ***Microb Pathog*** 2012; 53(2): 100-8.

52. Khan M, Raoult D, Richet H, Lepidi H, La Scola B. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. ***Br Poult Sci*** 2007; 48(6): 732-35.

53. Sibley CD, Duan K, Fischer C, Parkins MD, Storey DG, Rabin HR, et al. Discerning the complexity of community interactions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections. ***PLOS Pathog*** 2008; 4(10): 1-10.

54. Shirazi F, Farmakiotis D, Yan Y, Albert N, Do KA, Kontoyiannis DP. Diet modification and metformin have a beneficial effect in a fly model of obesity and mucormycosis. ***PLOS One*** 2014; 9(9): 1-9.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY
15 Karnjanawanij Road, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand
Tel (66-74) 286940 Fax (66-74) 286961
Website : www.psu.ac.th

MOE 0521.11/ 380 Ref.4/2017

April 20, 2017

This is to certify that the research project entitled " The role of probiotics *Lactobacillus paracasei* SD1,*Lactobacillus fermentum* SD11 and *Lactobacillus gasseri* SD12 in Hots-Microbe interactions in the Gastrointestinal Tract in *Drosophila* model " which was conducted by Miss.Monwadee Wonglapsuwan, Faculty of Science, Prince of Songkla University, has been approved by Institutional Animal Care and Use Committee, Prince of Songkla University.

Kitja Sawangjaroen, Ph.D.
Chairman,
Institutional Animal Care and Use Committee, Prince of Songkla University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810820022

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2560
2. ทุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์/ โครงการวิจัยสำหรับนักศึกษาหลังปริญญาจากเงินกองทุนวิจัย
3. ทุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์/ โครงการวิจัย/ โครงงานพิเศษสำหรับนักศึกษาหลังปริญญาจากเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ทันตแพทย์ปฏิบัติการ กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลรามัน อำเภอรามัน จังหวัดยะลา

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ภัสราพร เหล่ามงคลชัยศรี, สุพัชรินทร์ พิวัฒน์, รวี เถียรไพศาล, มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ. ผลของโพรไบโอติกในช่องปาก *Lactobacillus paracasei* SD1 และ *Lactobacillus gasseri* SD12 ต่อการเจริญเติบโตของแมลงหวี่. การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 7 เรื่อง “ประเทศไทย 4.0 นวัตกรรมสร้างสรรค์สู่การพัฒนาที่ยั่งยืน”; วันที่ 21-22 กรกฎาคม 2560; ณ ศูนย์มานุษยวิทยาสิรินธร (องค์การมหาชน); กรุงเทพฯ, ประเทศไทย; 2560:S491-S503.