ผลของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

นางสาว เบญจวรรณ เลิศปันณะพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON GROWTH OF STREPTOCOCCI: IN VITRO STUDY

Miss Benjawan Lerdpunnapongse

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Pediatric Dentistry

Department of Pediatric Dentistry

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ
โดย	นางสาว เบญจวรรณ เลิศปันณะพงษ์
สาขาวิชา	ทันตกรรมสำหรับเด็ก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. บุษยรัตน์ สันติวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย
	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะทันตแพทยศาตร์
(รองศาสตรจารย์ ทันตแพทย์หญิง วัชราภรณ์ ทัศจันทร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง รุจิรา เผื่อนอัยกา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. บุษยรัตน์ สันติวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ทิพวรรณ ธราภิวัฒนานนท์)

เบญจวรรณ เลิศปันณะพงษ์: ผลของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ. (THE EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON GROWTH OF STREPTOCOCCI: IN VITRO STUDY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ทพญ.ดร. บุษยรัตน์ สันติวงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย และ รศ.ทพ. จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 51 หน้า.

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยและเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง เนื่องจากแนวคิดของสาเหตุของโรคฟันผุมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดการป้องกันโรคฟันผุวิธีใหม่ การใช้โพรไบโอติกเป็นวิธีใหม่ที่รักษาสมดุลของระบบนิเวศของเชื้อจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ เชื้อที่ได้รับความสนใจใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการวิจัยทางทันตกรรมคือ เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยนำผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ (เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สายพันธุ์ ATCC19258 เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842 เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค 5 สายพันธุ์ (เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 Ingbritt TPF-1 เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715) ด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้นด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 3 สายพันธุ์ ให้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ดังนี้ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt และ TPF-1 ได้มากกว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) ส่วนเชื้อแลคโต-บาซิลลัส แรมโนซัส ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ และ เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถสร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้บางสายพันธุ์

ภาควิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ทันตกรรมสำหรับเด็ก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4876111432 : MAJOR PEDIATRIC DENTISTRY
KEY WORD: PROBIOTICS / LACTIC ACID BACTERIA / CARIOGENIC BACTERIA
BENJAWAN LERDPUNNAPONGSE: THE EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON GROWTH OF STREPTOCOCCI: IN VITRO STUDY. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASST. PROF. BUSAYARAT SANTIWONG, Ph D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. EM-ON BENJAVONGKULCHAI, Ph D., ASSOC. PROF. JINTAKORN KUVATANASUCHATI, 51 pp.

Dental caries are the most common and costly forms of infections in humans. Due to the concept of changed dental caries causation, the new preventive method is introduced. Probiotic is a new preventive method that maintains the equilibrium of microbial ecology of human's body by using benefit microorganisms to eliminate pathogenic microorganisms. Lactic acid bacteria (LAB) has been the most interesting probiotic in using in dental research. The aim of the present research was to determine antimicrobial effect of LAB against mutans streptococci. Four strains of LAB (*Streptococcus thermophilus* ATCC19258, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842, *Lactobacillus bulgaricus* TUA093L, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469) were cultured in broth. The supernatant from each LAB cultural broth was prepared for testing in order to against 5 strains of mutans streptococci (*Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Streptococcus mutans* TPF-1 and *Streptococcus sobrinus* B13 and *Streptococcus sobrinus* 6715) by well agar diffusion method. The diameter of the bacterial inhibition zone was measured. The present study found that the supernatant from 3 strains of LAB, except *L. rhamnosus*, significantly inhibited growth of some mutans streptococci; *S. thermophilus* inhibited growth of *S. mutans* ATCC25175, *L. delbrueckii* inhibited growth of *S. sobrinus* B13, *L. bulgaricus* inhibited growth of *S. mutans* Ingbritt and TPF-1 more than *S. sobrinus* B13 ($p<.05$). The results suggest that *S. thermophilus, L. delbrueckii* and *L. bulgaricus* have some antimicrobial substance againsted some strains of mutans streptococci.

Department	Pediatric Dentistry	Student's signature……..
Field of study	Pediatric Dentistry	Principal Advisor's signature……..
Academic year	2008	Co-advisor's signature……
		Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.บุษยรัตน์ สันติวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ ตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ทิพวรรณ ธราภิวัฒนานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. ประทานพร อารีราชการัณย์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยทุกท่าน ที่กรุณาให้ข้อมูล และให้คำแนะนำในการเลี้ยงเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ไพพรรณ พิทยานนท์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำทางสถิติสำหรับการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คุณวันเพ็ญ ชินเฮง และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็กทุกท่าน และระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมด ตลอดจนเพื่อนๆ ที่ช่วยเหลือในการทำงานและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ..ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… ..จ

กิตติกรรมประกาศ……..ฉ

สารบัญ……..ช

สารบัญตาราง……ฌ

สารบัญภาพ……ญ

บทที่ 1 บทนำ……..1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..1

คำถามของการวิจัย……..3

วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..3

สมมติฐานของการวิจัย……..3

ขอบเขตของการวิจัย……..3

ข้อตกลงเบื้องต้น……..3

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย……..4

ข้อจำกัดของการวิจัย……..4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..5

กรอบแนวคิดการวิจัย……..5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..6

โรคฟันผุ……..6

เชื้อสเตรปโตคอคไค……..7

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย……..9

โพรไบโอติก……13

การจัดการโรคฟันผุด้วยโพรไบโอติก……16

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย……20

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย……..21

ประชากรและตัวอย่าง……21

สิ่งแทรกแซง……21

ขนาดตัวอย่างและการสุ่มตัวอย่าง……21

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย……..22

หน้า

วิธีดำเนินการวิจัย.....24
- การเตรียมเชื้อสเตรปโตคอคไค.....24
- การเตรียมผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย.....24
- การเตรียมตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ.....25
- การทดสอบด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น.....25

การเก็บและรวบรวมข้อมูล.....26
การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด.....26
การวิเคราะห์ข้อมูล.....26

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....28
ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค โดยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย.....28
การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด.....31

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....32
สรุปผลการวิจัย.....32
อภิปรายผล.....32
ข้อเสนอแนะ.....36

รายการอ้างอิง.....37

ภาคผนวก.....42
ภาคผนวก ก การตรวจสอบความถูกต้องของเชื้อจุลินทรีย์.....43
การตรวจสอบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์.....43
การปรับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์.....43
ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ.....45
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13.0.....46
ภาคผนวก ง การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด.....49

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....51

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาเป็นโพรไบโอติก.....13

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณที่ไม่มีเชื้อสเตรปโตคอคไคขึ้น (มิลลิเมตร) เมื่อทดสอบด้วยผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตัวควบคุมเชิงบวก และตัวควบคุมเชิงลบ.....28

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณเชื้อแต่ละชนิด.....44

ตารางที่ 4 ผลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค.....45

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค.....45

ตารางที่ 6 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค.....45

ตารางที่ 7 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค.....45

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13.....46

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt TPF-1 และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13.....47

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความแตกต่างของเส้นผ่านศูนย์กลาง บริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้นเมื่อวัดซ้ำ.....49

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ.....7

รูปที่ 2 การจำแนกเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก โดยเปรียบเทียบลำดับของยีน อาร์-อาร์เอนเอ ชนิด 16S.....8

รูปที่ 3 การใช้น้ำตาลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย.....11

รูปที่ 4 กลไกการทำงานของโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย.....14

รูปที่ 5 แนวทางการประเมินเชื้อแบคทีเรียสำหรับการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหาร.....16

รูปที่ 6 สมมติฐานกลไกการทำงานของโพรไบโอติกในช่องปาก.....19

รูปที่ 7 หมายเลขตำแหน่งหลุม 5 หลุม บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น.....22

รูปที่ 8 ตำแหน่งหลุม จำนวน 5 หลุม บนจานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร.....26

รูปที่ 9 จานเลี้ยงเชื้อที่ผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค.....29

รูปที่ 10 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณที่ไม่มีเชื้อสเตรปโตคอคไคขึ้น (มิลลิเมตร).....30

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดขึ้นกับประชากรทุกเพศทุกวัย ตั้งแต่มีฟันขึ้นมาในช่องปาก ถ้าไม่ได้รักษาและป้องกัน จะเกิดโรคฟันผุลุกลามได้อย่างรวดเร็ว อัตราความชุกของโรคจะเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ ผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543 - 2544 พบสภาวะฟันผุในฟันน้ำนม กลุ่มเด็กอายุ 3 ปี มีอัตราฟันผุร้อยละ 65.70 ค่าเฉลี่ยฟันผุถอนอุด 3.61 ซี่ต่อคน สำหรับกลุ่มเด็กอายุ 5 - 6 ปี มีอัตราฟันผุร้อยละ 87.40 ค่าเฉลี่ยฟันผุถอนอุด 5.97 ซี่ต่อคน สภาวะฟันผุในฟันถาวร กลุ่มเด็กอายุ 12 ปี มีอัตราฟันผุร้อยละ 57.30 ค่าเฉลี่ยฟันผุถอนอุด 1.64 ซี่ต่อคน สำหรับกลุ่มเด็กอายุ 15 ปี มีอัตราฟันผุร้อยละ 62.10 ค่าเฉลี่ยฟันผุถอนอุด 2.11 ซี่ต่อคน (กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2543 - 2544) ดังนั้นโรคฟันผุจึงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขในประเทศไทย ที่ควรดำเนินการป้องกันและแก้ไข

แนวคิดเกี่ยวกับสาเหตุของโรคฟันผุที่เปลี่ยนแปลง จากสมมติฐานของเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่จำเพาะในคราบจุลินทรีย์ (non specific plaque hypothesis) เป็นสมมติฐานของเชื้อแบคทีเรียชนิดจำเพาะในคราบจุลินทรีย์ (specific plaque hypothesis) และปัจจุบันเป็นสมมติฐานระบบนิเวศในคราบจุลินทรีย์ (ecological plaque hypothesis) ซึ่งอธิบายสาเหตุของโรคฟันผุว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะในช่องปากทำให้ระบบนิเวศไบโอฟิล์ม (biofilm) เสียสมดุล เช่น ความถี่ของการบริโภคน้ำตาลจะเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์สร้างกรดเกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) มากกว่าการคืนกลับของแร่ธาตุ (remineralization) และส่งผลต่อปริมาณประชากร หรือชุมชนของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยรอบๆ ผิวฟัน เป็นต้น ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการรักษาโรคฟันผุ นอกจากการกำจัดรอยโรคและบูรณะฟัน เป็นการป้องกันโดยหยุดการลุกลาม (arrest) และส่งเสริมให้เกิดการคืนกลับของรอยโรค (reverse process) โดยเน้นป้องกันด้วยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นสาเหตุ และขัดขวางปัจจัยที่ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศในคราบจุลินทรีย์ให้เกิดโรคฟันผุ (Marsh, 1994; Featherstone, 2004)

แนวทางการป้องกันโรคฟันผุมี 3 วิธีหลัก คือ การต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ เช่น การทำความสะอาดในช่องปากโดยการแปรงฟันและใช้ไหมขัดฟัน การใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในช่องปาก การใช้โพรไบโอติก (probiotics) และวัคซีน การปรับเปลี่ยนรูปแบบและพฤติกรรมในการบริโภค เช่น การลดปริมาณน้ำตาลในอาหารที่บริโภค และการลดความถี่ในการบริโภคอาหาร การเสริมความต้านทานการละลายตัวของฟัน เช่น การใช้ฟลูออไรด์ในรูปแบบต่างๆ เป็นต้น (Anusavice, 2005)

จากแนวคิดของโพรไบโอติกที่นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจากพืชหรือสัตว์ มาเป็นประโยชน์กับสิ่งมีชีวิตที่ถูกอาศัย (host) โดยเชื้อจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ปรับความสัมพันธ์ของสภาพแวดล้อม และส่งเสริมให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายมาใช้ทางการแพทย์ เพื่อลดความเสี่ยงของการดื้อยาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance) เช่น ป้องกันการติดเชื้อของระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ เพิ่มความต้านทานการติดเชื้อ เพิ่มความต้านทานโรคของผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับการรักษาแบบเคมีบำบัด ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ ลดระดับคอเลสเตอรอล ลดความดันโลหิต และลดอาการแพ้ เป็นต้น (Alvarez-Olmos และ Oberhelman, 2001) จึงนำมาสู่แนวคิดการป้องกันโรคฟันผุ ด้วยการกำจัดเชื้อโรคในช่องปากด้วยเครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์อาหารประเภทโพรไบโอติก เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว น้ำผลไม้ และหมากฝรั่งที่มีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีชีวิต เป็นต้น

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกและนำมาศึกษาเพื่อป้องกันโรคฟันผุ ได้แก่ เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส *(L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus)* เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส (*S. thermophilus*) เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG [*L. rhamnosus GG* (ATTCC53101)] เชื้อแลคโตบาซิลลัส รูทีไร SD2112 [*L. reuteri* SD2112 (ATCC55730)] เชื้อไวส์เสลล่า ซิบาเรีย CMS1 (*Weissella cibaria* CMS1) และเชื้อแบคทีเรียม S11 (bacterium S11) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านี้ผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial substance) เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) คาร์บอนเพอร์ออกไซด์ (carbon peroxide) กรดอินทรีย์ ไดอะซิติล (diacetyl) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคไคได้ (Meurman และคณะ, 1995; Näse และคณะ, 2001; Petti, Tarsitani และ D'Arca, 2001; Ahola และคณะ, 2002; Nikawa และคณะ, 2004) และยังมีผลต่อการยึดติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (Wei และคณะ, 2002; Comelli และคณะ, 2002; Chung และคณะ, 2004; Kang และคณะ, 2006) ดังนั้นโพรไบโอติกจึงช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกสามารถลดความเสี่ยงของการติดเชื้อราในช่องปาก (Hatakka และคณะ, 2007) และลดปัญหาเหงือกอักเสบ (Krasse และคณะ, 2005)

ปัจจุบันยังไม่ทราบผลของโพรไบโอติก ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากอย่างชัดเจน และข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งอาจนำมาใช้ให้เกิดเป็นประโยชน์ในช่องปากนั้นมีการศึกษายังไม่มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค ด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น (agar diffusion method) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น สำหรับเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการผลิตโพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพในช่องปาก

คำถามของการวิจัย

ผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ต่างๆ แตกต่างกันหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส แต่ละสายพันธุ์

สมมติฐานของการวิจัย

ผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตประชากร

ศึกษาผลของผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สายพันธุ์ ATCC19258 เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842 เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469 ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ 3 สายพันธุ์ คือ ATCC25175 Ingbritt และ TPF-1 และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส 2 สายพันธุ์ คือ B13 และ 6715

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรต้น: ผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842 เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สายพันธุ์ ATCC19258 เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469
2. ตัวแปรตาม: การเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 Ingbritt TPF-1 เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 Ingbritt TPF-1 เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715 เป็นตัวแทนของเชื้อสเตรปโตคอคไค ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการเกิดโรคฟันผุ

2. วิธีศึกษาผลการเจริญเติบโตของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส ใช้วิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น
3. การเปรียบเทียบความสามารถของผลิตผลจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส เปรียบเทียบจากขนาดวงใสรอบหลุมซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น (inhibition zone)

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อสเตรปโตคอคไค

หมายถึง เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคฟันผุในมนุษย์ ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 Ingbritt TPF-1 เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

หมายถึง เชื้อแบคทีเรียชนิดที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น ซึ่งหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส หรือ เชื้อแลคโตบาซิลลัส ซับสปีชีส์อื่นๆ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 289 พ.ศ. 2548 เรื่องนมเปรี้ยว)

โพรไบโอติก

หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ที่ทำหน้าที่ปรับความสัมพันธ์ของสภาพแวดล้อมและส่งเสริมให้เกิดลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ถูกอาศัย ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ควรมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 10^6 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร (Caglar, Kargul และ Tanboga, 2005)

ผลิตผล

หมายถึง สารที่ได้จากกระบวนการทางเคมีของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการดำรงชีพ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (broth) แล้วกรองเชื้อจุลินทรีย์ออก

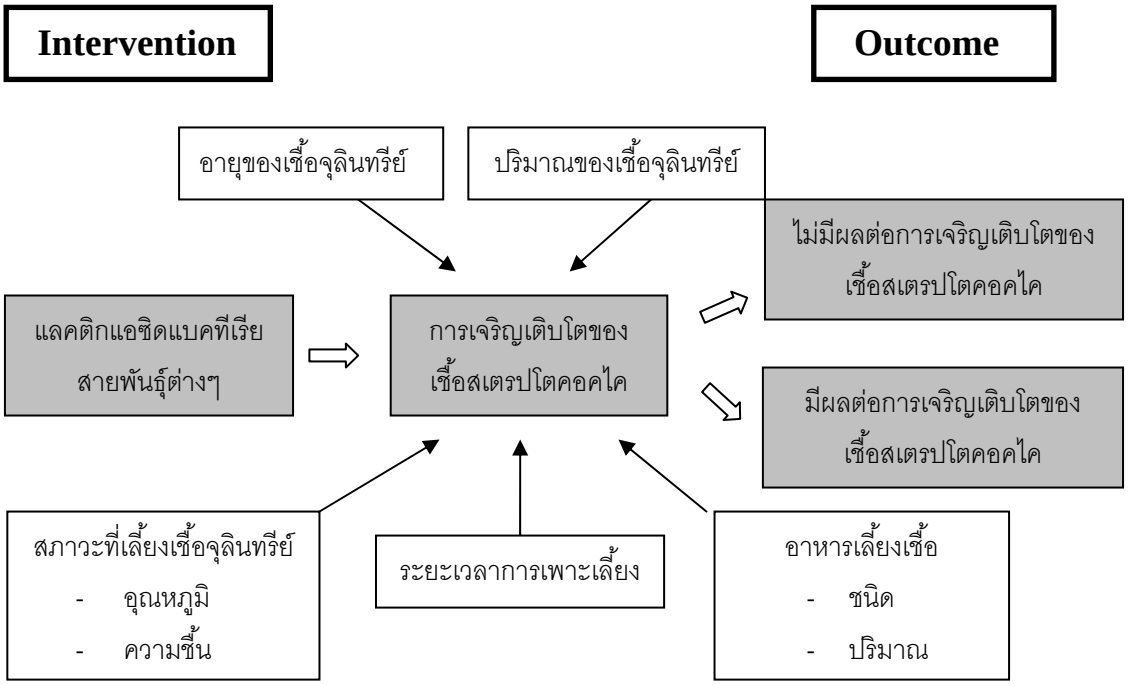
ข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ทดสอบผลิตผลจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งไม่ได้อยู่รวมกันเป็นไบโอฟิล์ม ดังนั้นจึงไม่เหมือนสภาวะช่องปากมนุษย์ทำให้ไม่สามารถอ้างอิงทางคลินิกได้โดยตรง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบบทบาทของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ให้ผลิตผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณาเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาผลิตและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพในช่องปากเพื่อป้องกันโรคฟันผุ

กรอบแนวคิดการวิจัย



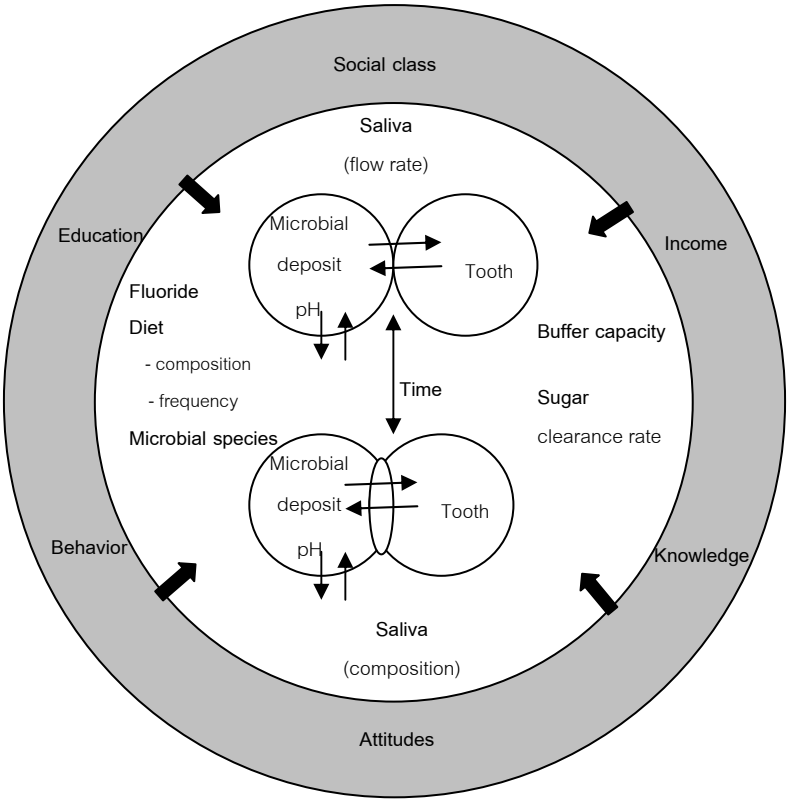
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคฟันผุ

โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถส่งผ่านจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่ง ผลของการเกิดโรคฟันผุทำให้มีการทำลายโครงสร้างของฟัน โดยรอยโรคในระยะเริ่มแรกจะมีลักษณะเป็นจุดด้ำขาว (white spots) ไม่ปรากฏโพรง (cavity) บนตัวฟัน เมื่อโรคฟันผุดำเนินต่อจะเกิดการทำลายชั้นเคลือบฟัน (enamel) และเนื้อฟัน (dentin) ปรากฏเป็นโพรงบนตัวฟัน และอาจลุกลามสู่เนื้อเยื่อใน (pulp) จนเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อใน เกิดอาการปวดอย่างรุนแรง โดยอาจจะปวดตลอดเวลาหรือปวดเป็นระยะๆ หากเชื้อลุกลามสู่ปลายรากฟันจะก่อให้เกิดการทำลายกระดูกที่รองรับฟัน เกิดเป็นฝีรอบปลายรากฟัน (periapical abscess) ซึ่งอาจลุกลามถึงช่องพังผืดต่างๆ ของใบหน้า (facial spaces infection) หากไม่ได้รับการรักษาหรือควบคุมการติดเชื้อ อาจลุกลามไปตามกระแสเลือดและน้ำเหลืองสู่อวัยวะอื่นๆ ดังนั้นผลตามมาของโรคฟันผุเป็นไปได้ตั้งแต่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด สูญเสียฟัน สูญเสียเศรษฐกิจและทรัพย์สิน ตลอดจนอันตรายถึงชีวิต

ด้วยความสำคัญของปัญหาโรคฟันผุ จึงมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุของโรคฟันผุเพิ่มมากขึ้น ในปี ค.ศ.1960 Paul H. Keyes ศึกษาปัจจัยที่มีต่อการเกิดฟันผุพบว่า กระบวนการเกิดโรคฟันผุมีสาเหตุหลายปัจจัยซึ่งประกอบด้วย 3 ปัจจัยหลักที่จำเป็นต่อการเกิดโรคฟันผุ เรียกว่า Keye's ring ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตถูกเปลี่ยนเป็นกรดฟันและสภาพของร่างกายที่เอื้ออำนวยต่อการเกิดโรคฟันผุ (susceptible host) โดยปัจจัยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในการส่งเสริมการเกิดโรคฟันผุ ซึ่งถ้าขาดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งจะไม่สามารถทำให้เกิดโรคฟันผุ (Keyes, 1960) ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 Ole Fejerskov พบว่านอกจากจะมีปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ยังมีปัจจัยที่มีส่วนสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคฟันผุอื่นๆอีก (determinant and confounder) ได้แก่ อัตราการไหลและองค์ประกอบของน้ำลาย ฟลูออไรด์ ระดับบัฟเฟอร์ของน้ำลาย และความถี่ในการบริโภคน้ำตาล รวมทั้งปัจจัยทางด้านพฤติกรรม ปัจจัยทางด้านสังคม และเศรษฐานะ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคฟันผุในระดับบุคคล และประชากร (Fejerskov, 2004) (รูปที่ 1)

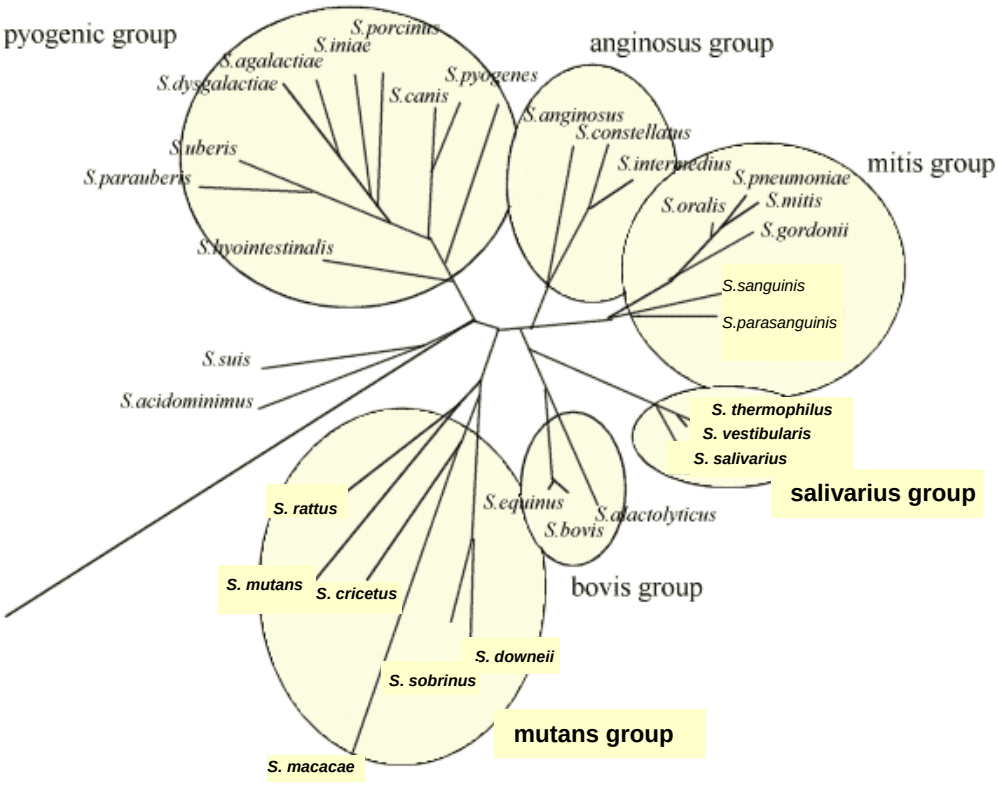


รูปที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ
ที่มา: Fejerskov, 2004

เชื้อสเตรปโตคอคไค

โดยปกติภายในช่องปากมีเชื้อจุลินทรีย์หลายๆ สายพันธุ์ ตั้งถิ่นฐานและอยู่รวมกันเป็นชุมชนในสภาวะสมดุล เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อมีปัจจัยเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมให้อยู่ในสภาวะไม่สมดุล ไบโอฟิล์มจะมีการเปลี่ยนแปลง เกิดสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อกระบวนการเกิดโรคฟันผุ เหมาะสำหรับการตั้งถิ่นฐาน และมีผลต่อประชากรเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ

เชื้อสเตรปโตคอคไค เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในช่องปากและทางเดินหายใจส่วนบน จัดเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก รูปร่างทรงกลม (spherical) หรือวงรี (ovoid) ขนาด 0.5-2.0 ไมโครเมตร อยู่เป็นคู่ (pairs) หรือสาย (chains) มีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลและผลิตสารบางอย่าง ดังนั้นเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปากจึงมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคฟันผุ สามารถจำแนกเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก แบ่งเป็นกลุ่มได้หลายลักษณะตามคุณสมบัติ นิยมจำแนกชนิดของเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก โดยเปรียบเทียบลำดับของยีน อาร์-อาร์เอนเอ ชนิด16S (16S rRNA) แบ่งได้เป็น 6 กลุ่มดังนี้ กลุ่มแองจิโนซัส (anginosus group) กลุ่มไมติส (mitis group) กลุ่มมิวแทนส์ (mutans group) กลุ่มซัลไลวาเรียส (salivarius group) กลุ่มโบวิส (bovis group) และกลุ่มไพโอจีนิก (pyogenic group) (Kawamura และคณะ, 1995) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การจำแนกเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก โดยเปรียบเทียบลำดับของยีน อาร์-อาร์เอนเอ ชนิด16S

ที่มา: Kawamura และคณะ, 1995

ด้วยความสัมพันธ์ของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ต่อการเกิดโรคฟันผุ จึงมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น สามารถแบ่งเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ด้วยวิธีการทางเซรุ่ม (serological technique) (Bratthall, 1970) โดยจำแนกจากคาร์โบไฮเดรต แอนติเจน (carbohydrate antigens) ของผนังเซลล์ ออกเป็น 5 ซีโรไทป์ คือ เอ บี ซี ดี และอี (serotype a b c d และe) ต่อมาค้นพบซีโรไทป์ เอฟ และจี (serotype f และ g) (Perch, Kjems และ Ravn, 1974) ส่วนซีโรไทป์ เอช (serotype h) ได้จากคราบจุลินทรีย์บนฟันของลิง (Beighton, Russell และ Hayday, 1981) จากคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่ต่างกัน ดังนั้นในปัจจุบันจึงจำแนกเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคเป็น 8 ซีโรไทป์ ดังนี้ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ จัดอยู่ในซีโรไทป์ ซี อี และเอฟ เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส จัดอยู่ในซีโรไทป์ ดี และจี เชื้อสเตรปโตคอคคัส ไครซีตัส จัดอยู่ในซีโรไทป์ เอ เชื้อสเตรปโตคอคคัส แรตตัส จัดอยู่ในซีโรไทป์ บี เชื้อสเตรปโตคอคคัส ดาวนิไอ จัดอยู่ในซีโรไทป์ เอช เชื้อสเตรปโต-คอคคัส มาเคซี จัดอยู่ในซีโรไทป์ ซี และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ฟีรัส จัดอยู่ในซีโรไทป์ ซี (Whiley และ Beighton, 1998)

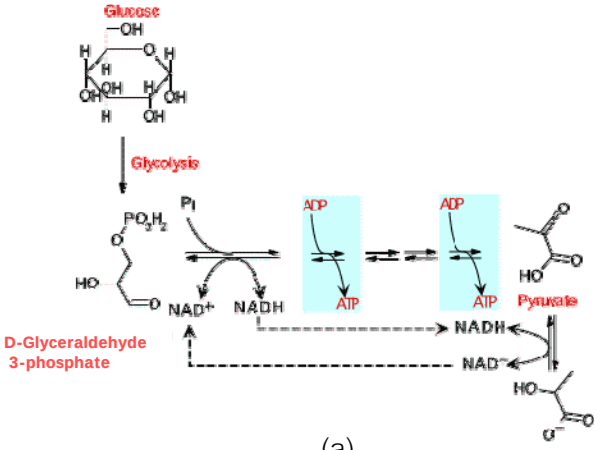
ปัจจุบันยอมรับว่าเชื้อแบคทีเรียที่เริ่มทำให้เกิดโรคฟันผุ คือ เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโต-คอคไค โดยเฉพาะเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ซีโรไทป์ ซี พบมากที่สุดในมนุษย์ และเชื้ออีกสายพันธุ์หนึ่ง ที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุบริเวณผิวด้านเรียบ และมักพบในฟันหลังมากกว่าฟันหน้าคือ เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส ในซีโรไทป์ ดี และจี คุณสมบัติสำคัญของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ (virulence factor) ได้แก่ ความสามารถในการยึดติดกับผิวเคลือบฟัน ด้วยการสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ที่เรียกว่า กลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ (water insoluble glucan) ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน โดยผ่านสองขั้นตอนคือ ขั้นแรกจะเกิดการยึดติดกันอย่างเฉพาะเจาะจง (specific binding) ระหว่างแอดฮีซิน (adhesins) บนผิวของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ กับโปรตีนในน้ำลาย เกิดเป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน ในระยะแรกเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ (reversible interaction) และไม่ขึ้นกับน้ำตาลซูโครส ในระยะต่อมาเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ใช้เอนไซม์กลูโคซิลทรานเฟอเรส (glucosyltransferase enzyme) สร้างกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำ จากน้ำตาลซูโครส เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ (irreversible interaction) ความสามารถในการสร้างกรด และทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้สูง ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถตั้งถิ่นฐานและคงสภาพได้ในสภาวะที่เป็นกรด ความสามารถของเชื้อในการสร้าง intracellular polysaccharides (IPS) สำหรับเป็นแหล่งสะสมอาหารในยามขาดแคลน ทำให้เชื้อสเตรปโตคอคไคผลิตกรดได้อย่างต่อเนื่อง ส่งเสริมให้เกิดโรคฟันผุ (Hamada และ Slade, 1980)

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

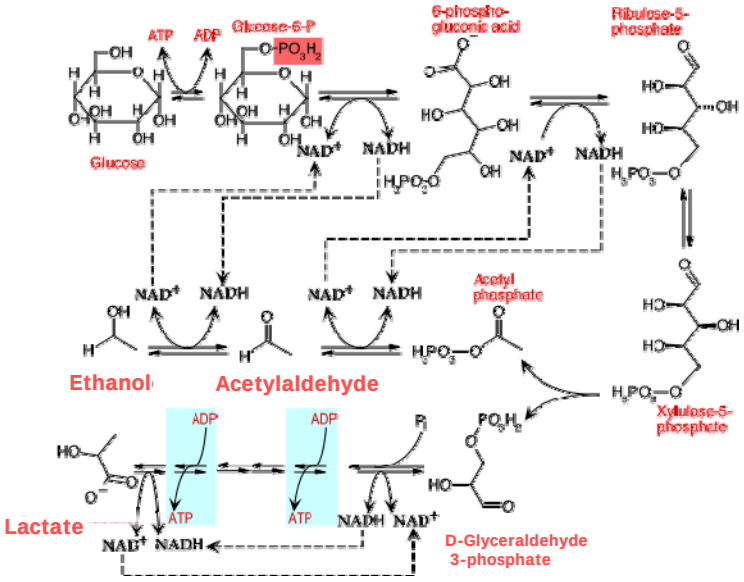
เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก รูปร่างท่อนยาว หรือ ท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศ (strictly anaerobe) ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นพลังงานและหมักน้ำตาลแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นกรดแลคติก ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญเติบโตได้ดีในที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และต้องการสารอนินทรีย์ปริมาณสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส พบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในธรรมชาติ ทั้งในอาหารหมักดองต่างๆ ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เนื่องจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ ดังนั้นเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจึงมีประโยชน์สำหรับการนำมาเป็นโพรไบโอติก และนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร พัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มีโครงสร้างส่วนประกอบของผนังเซลล์ รูปแบบและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสต่างกัน สามารถจำแนกกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลเป็นสองกลุ่ม (Lawrence และ Terence, 1979) กลุ่มที่หนึ่งคือ homofermentative lactic acid bacteria เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้ หมักน้ำตาลกลูโคหรือน้ำตาลที่มี 6 คาร์บอน ให้กรดแลคติกทั้งหมด โดยผ่านกระบวนการ homofermentative lactic

acid fermentation ซึ่งอาศัยเอนไซม์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ Phospho Enol-Pyruvate-dependent Phospho Transferase System (PEP-PTS) เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) อยู่ในรูป Glucose-6-phosphate ต่อมาผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส ใช้เอนไซม์ Aldolase เปลี่ยน Glucose-6-phosphate เป็น Glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางในกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway (EMP pathway) ในกระบวนการ EMP pathway จะเปลี่ยน Glyceraldehyde-3-phosphate เป็นแลคเตท (lactate) ทั้งหมด (รูปที่ 3a) ตัวอย่างของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้คือ เชื้อสเตรปโตคอคคัส (Streptococcus) เชื้อพีดิคอคคัส (Pedicoccus) และเชื้อแลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์ เช่น เชื้อแลคโตบาซิลลัส ซัลไลวาเรียส *(L. salivarius)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส จอห์นสันนิอิ *(L. johnsonii)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส *(L. acidophilus)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส *(L. bulgaricus)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส คริสพาตัส *(L. crispatus)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส แกซเซอริ *(L. gasseri)* และเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ *(L. casei)* เป็นต้น กลุ่มที่สองคือ heterofermentative lactic acid bacteria เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มี 6 คาร์บอน ให้กรดแลคติกและผลิตผล เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ โดยผ่านกระบวนการ heterofermentative lactic acid fermentation เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ไม่มีเอนไซม์ Aldolase สำหรับกระบวนการไกลโคไลซิส ดังนั้นจึงต้องออกซิไดซ์ Glucose-6-phosphate เป็น 6-Phosphogluconic acid ต่อมาจึงเกิดปฏิกิริยา decarboxylate ได้คาร์บอนไดออกไซด์ กับ Ribulose-5-phosphate แล้วเปลี่ยน Ribulose-5-phosphate เป็น Xylulose-5-phosphate ซึ่ง Xylulose-5-phosphate จะแตกตัวเป็น Acetyl-phosphate กับ D-Glyceraldehyde-3-phosphate โดย Acetyl-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิตอลดีไฮด์ (acetaldehyde) และ เอทานอล (ethanol) ตามลำดับ ส่วน D-Glyceraldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็นแลคเตท (รูปที่ 3b) ตัวอย่างของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ คือ เชื้อลิวโคนอสตอค มีเซนเทอรอยเดส (*Leuconostoc mesenteroides*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์ เช่น เชื้อแลคโตบาซิลลัส รูทีไร (*L. reuteri*) เชื้อแลคโตบาซิลลัส วาไจนาลิส (*L. vaginalis*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัส ออริส (*L. oris*) เป็นต้น



(a)



(b)

รูปที่ 3 การใช้น้ำตาลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

(a) การใช้น้ำตาลของ Homofermentative lactic acid bacteria

(b) การใช้น้ำตาลของ Heterofermentative lactic acid bacteria

ที่มา: http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php, 2007

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างผลิตผลที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จำแนกผลิตผลที่สร้างจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นสองชนิด คือ non-peptide inhibitor ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล peptide inhibitor ได้แก่ แบคทีริโอซิน

กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กรดซิติก สารทั้งสองชนิดนี้มีผลทำให้อาหารมีความเป็นกรด-ด่างลดลง เพียงพอสำหรับการป้องกันการเจริญของเชื้อแปลกปลอมอื่นๆ เช่น เชื้อบาซิลลัส (Bacillus) เชื้อซูโดโมแนส (Pseudomonas) และเชื้อเอสเชอรีเชีย โคไล *(Escherichia coli)* เป็นต้น กรดอินทรีย์มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นในการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และแตกตัวเป็น

อิออน ทำให้ระดับความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ลดลง หรือ ทำลายเซลล์ หรือ หน่วงเหนี่ยวการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นๆ (Silva และคณะ, 1987)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นผลิตผลที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน เพราะไม่มี catalase enzyme จึงเกิดการสะสมของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซูโดโมแนส และเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส *(Staphylococcus aureus)* (Ito และคณะ, 2003)

ไดอะซิติล เป็นผลิตผลตัวสุดท้ายที่เกิดจากไพรูเวท (pyruvate) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อยีสต์และเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียชนิดแกรมบวกจะมีความไวต่อไดอะซิติลมากกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Lanciotti และคณะ, 2003)

แบคทีริโอซิน จัดเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง เป็นสารจำพวกโปรตีนหรือโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบร่วม มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ออกฤทธิ์ทำลายอย่างจำเพาะกับตัวรับแบคทีริโอซินบนเซลล์แบคทีเรีย (bacteriocin receptor) เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างแบคทีริโอซินที่มีลักษณะทางชีวเคมี พันธุศาสตร์ และมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่างกัน (Soomro, Masud และ Anwaar, 2002)

เนื่องจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ สามารถป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในด้านต่างๆ ดังนั้นแนวทางการวิจัยจึงมุ่งศึกษาหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในร่างกายและอาหารชนิดต่างๆ เพื่อนำมาใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น ในอุจจาระของเด็กแรกเกิดสามารถแยกเชื้อแลคโต-บาซิลลัส แรมโนซัส *(L. rhamnosus)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอิ (*L. paracasei)* และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เฟอร์เมนตัม *(L. fermentum)* ได้ (Arici และคณะ, 2004) ในโยเกิร์ตสามารถแยกเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ ได้หลายสายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม *(Salmonella typhimurium)* เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส เชื้อเอสเชอรีเชีย โคไล และเชื้อซูโดโมแนส แอโรจิโนซา (*Pseudomonas aeroginosa)* เป็นต้น (Erdogrul และ Erbilir, 2006)

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ได้รับการยอมรับเป็นโพรไบโอติกให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส รวมทั้งเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียมสายพันธุ์ต่างๆ เป็นต้น (Senok, Ismaeel และ Botta, 2005) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาเป็นโพรไบโอติก

Lactobacillus spp.	*Bifidobacterium* spp.	Others
L. acidophilus	*B. bifidum*	*Escherichia coli* Nissle
L. casei	*B. breve*	*Saccharomyces boulardii*
L. crispatus	*B. infantis*	*Streptococcus thermophilus*
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	*B. longum*	*Enterococcus faecium*
L. fermentum	*B. lactis*	
L. gasseri	*B. adolescentis*	
L. johnsonii		
L. paracasei		
L. plantarum		
L. reuteri		
L. rhamnosus		

ที่มา: Senok, Ismaeel และ Botta, 2005

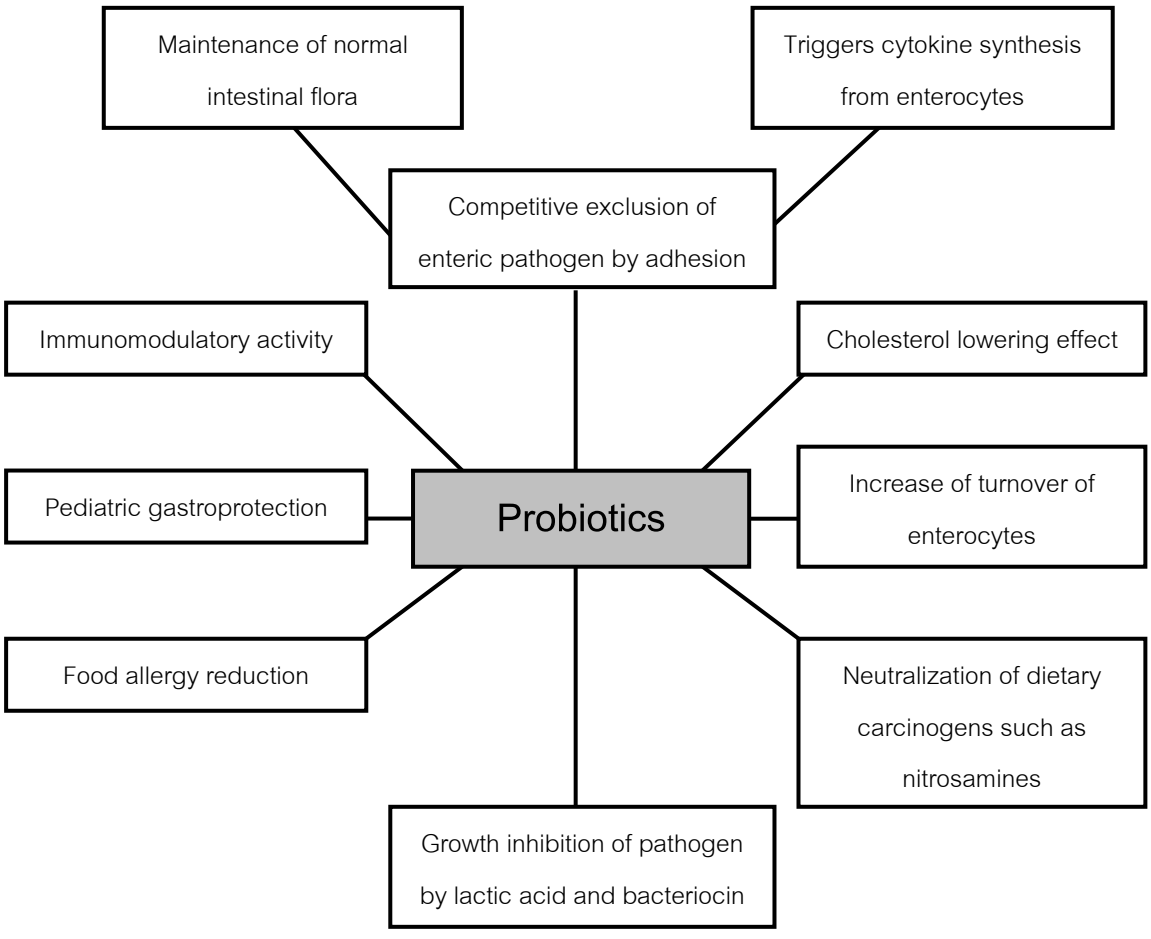
โพรไบโอติก

การพัฒนาความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี ทำให้มีความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ดีขึ้น ปกติภายในร่างกายของมนุษย์ มีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งที่มีประโยชน์และมีโทษต่อร่างกาย มนุษย์มักมีมุมมองต่อเชื้อแบคทีเรีย ในด้านที่ก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย เป็นสาเหตุโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น โรควัณโรค โรคคออักเสบ โรคท้องเสีย และโรคฟันผุ เป็นต้น แต่ยังมีเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์อีกมากมายที่ยังไม่ถูกค้นพบ จากการศึกษาของ Elie Metchnikoff ในปี ค.ศ. 1907 พบว่า การบริโภคโยเกิร์ตบัลแกเรียน (bulgarian yoghurt) ที่มีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ช่วยให้สุขภาพดีและอายุยืนนาน ต่อมาตั้งชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในโยเกิร์ตชนิดนี้ว่า เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ซึ่งภายหลังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตนมหมักชนิดต่างๆ ด้วยประโยชน์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อร่างกาย (Metchnikoff, 1907) จึงนำมาสู่แนวคิดการใช้เชื้อแบคทีเรียเพื่อการรักษา (bacteriotherapy) โดยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคแล้วแทนที่ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นในปัจจุบันจึงมุ่งศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในแหล่งต่างๆ ที่อาจมีประโยชน์ นำมาผลิตเป็นโพรไบโอติกได้

คำจำกัดความของ โพรไบโอติก ในระยะแรก หมายถึง สารที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง (Lilly และ Stillwell, 1965) ซึ่งลักษณะการทำงานจะตรงข้ามกับยาปฏิชีวนะที่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ต่อมาความหมายมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น โดยหมายถึงสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ (Fuller, 1991) อาจจะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวหรือส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมกัน ทำหน้าที่ปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตเพื่อเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย โพรไบโอติก

จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในลักษณะต่างๆ กัน เช่น สร้างสารที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ แย่งอาหารและพื้นที่ในการยึดติดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มระดับแอนติบอดี้ และต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ เป็นต้น (Havenaar และ Huis in't Veld, 1992; Anuradha และ Rajeshwari, 2005)

ประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อร่างกายมีหลายด้าน ตั้งแต่ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ รักษาระดับความเป็นกรด-ด่างของลำไส้หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะ และระบบการขับถ่ายดีขึ้นเพราะลดการสะสมของเสียในร่างกาย ดังนั้นจึงลดอัตราเสี่ยงของโรคลำไส้อักเสบและลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมให้กลับเข้าสู่สมดุล ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด รักษาโรคหอบหืด ระบบภูมิ-ต้านทานทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ย่อยน้ำตาลในนมเพื่อป้องกันอาการท้องอืดจากการดื่มนม ดูซึมแคลเซียมได้เพิ่มขึ้น ลดระดับน้ำตาล และระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (joint FAO/WHO, expert consultation, October 1-4, 2001) (รูปที่ 4)



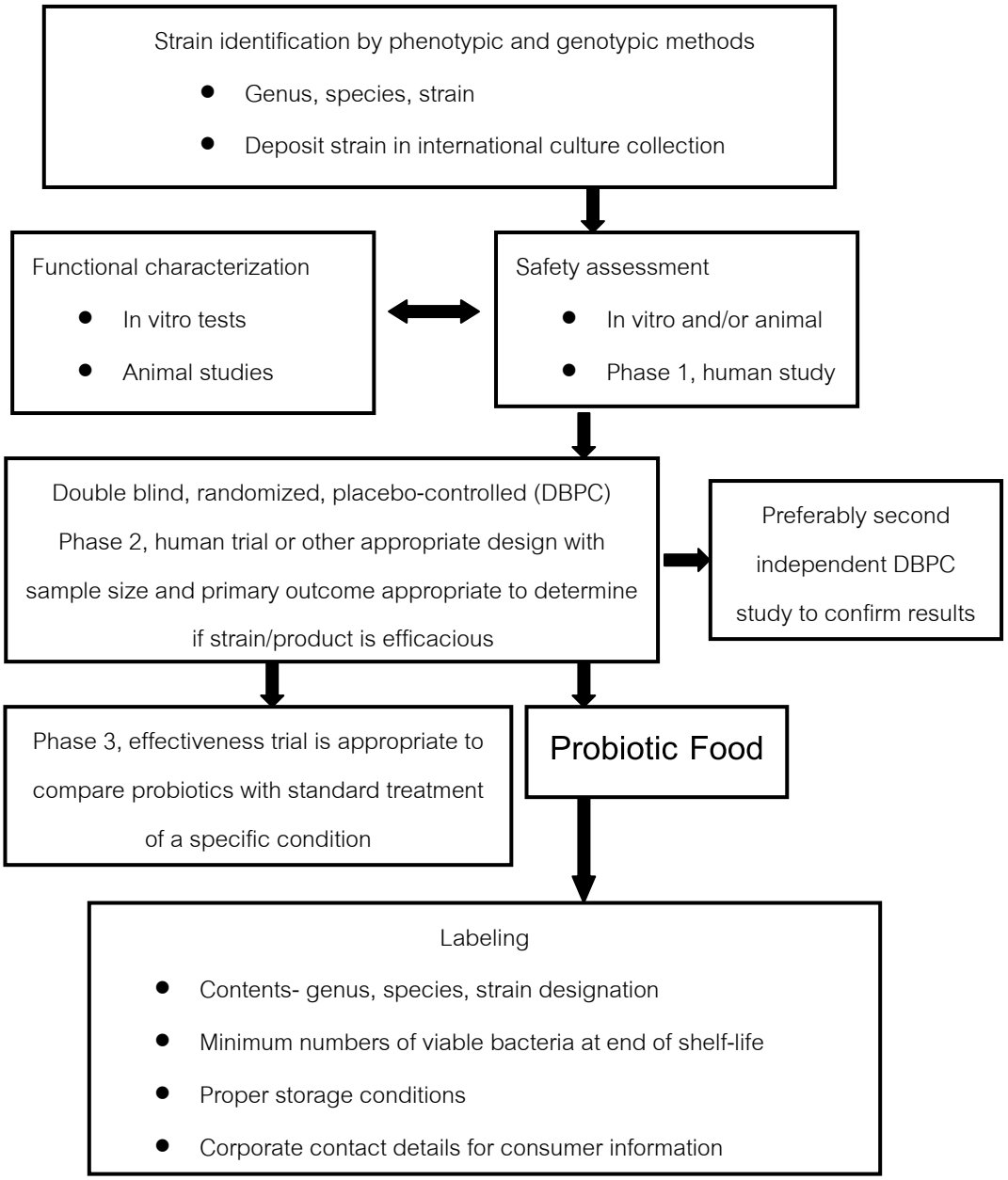
รูปที่ 4 กลไกการทำงานของโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

ที่มา: joint FAO/WHO, expert consultation, October 1-4, 2001

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะแนวทางการประเมินเลือกเชื้อแบคทีเรียสำหรับการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหาร ตามลำดับดังนี้ ควรทราบรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย รู้ชื่อสายพันธุ์ ทั้งชื่อสกุล และสปีชีส์ เพื่อศึกษาด้านระบาดวิทยา (epidemiological) การเฝ้าระวัง (surveillance) และประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่อร่างกายได้อย่างถูกต้อง เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ควรผ่านการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงาน และตรวจสอบความปลอดภัย (phase 1 safety) โดยทดลองในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งที่มีชีวิต (in vivo) เช่น สัตว์ทดลองและมนุษย์ เพื่อประเมินผลของการใช้โพรไบโอติก (phase 2 efficacy) แล้วนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้โพรไบโอติกกับรูปแบบการรักษาตามมาตรฐานเดิม (standard treatment) (phase 3 effectiveness) ติดตามผลการฟื้นตัวจากโรค และความเสี่ยงของการเกิดโรคซ้ำในระยะยาว (phase 4 surveillence) เมื่อผ่านกระบวนการประเมินขั้นตอนข้างต้นแล้วจึงผลิตเป็นอาหารโพรไบโอติก (probiotic food) ซึ่งควรมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เพียงพอตลอดอายุการบริโภค เก็บรักษาได้นาน และผู้ผลิตควรแสดงข้อมูลของเชื้อโพรไบโอติกอย่างละเอียด (joint FAO/WHO, working group, April 30 และ May 1, 2002) (รูปที่ 5)

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในอาหารโพรไบโอติกต้องไม่มีผลข้างเคียง เช่น ทำให้เกิดการติดเชื้อทางระบบ เมแทบอลิซึมของร่างกายเสื่อมลง เปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของร่างกาย และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมากเกินไป เป็นต้น ดังนั้น FAO และ WHO จึงกำหนดคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย (GRAS =Generally Regarded As Safe) อย่างน้อยควรผ่านการทดลองเกี่ยวกับการดื้อยาเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะ มีข้อมูลเกี่ยวกับระบบเมแทบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียเมื่ออยู่ในร่างกาย เช่น การผลิต D-แลคเตท การแตกตัวของเกลือน้ำดี (bile salt deconjugation) และผลข้างเคียงการใช้โพรไบโอติกในมนุษย์ ตลอดจนติดตามผลข้างเคียงของการบริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่จำหน่ายในท้องตลาด (joint FAO/WHO, working group, April 30 และ May 1, 2002)

ปัจจุบันมีการศึกษาและยอมรับความปลอดภัยในการนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง ส่วนใหญ่จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และมีการพัฒนาโพรไบโอติกรูปแบบอื่นๆ นอกเหนือจากผลิตภัณฑ์นม เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผักและผลไม้ แคปซูลโพรไบโอติก และหมากฝรั่ง



รูปที่ 5 แนวทางการประเมินเชื้อแบคทีเรียสำหรับการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหาร
ที่มา: joint FAO/WHO, working group, April 30 และ May 1, 2002

การจัดการโรคฟันผุด้วยโพรไบโอติก

จากวงการแพทย์ ที่นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสู้กับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อต่างๆ ผลิตเป็นโพรไบโอติก เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และป้องกันการเกิดภาวะดื้อยา โรคฟันผุมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นทางทันตกรรมจึงสนใจนำโพรไบโอติกมาจัดการกับโรคฟันผุด้วยเช่นกัน การวิจัยเพื่อนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ต่อโรคฟันผุ แบ่งเป็น 2 ทาง ทางแรก คือ การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อเชื้อสเตรปโตคอคไคในห้องปฏิบัติการ และทางที่สองคือ การค้นหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในร่างกาย เพื่อศึกษาคุณสมบัติการป้องกันโรคฟันผุ

การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อเชื้อสเตรปโตคอคไคในห้องปฏิบัติการ โดยนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ทดสอบกับเชื้อสเตรปโตคอคไค เช่น การศึกษาของ Comelli และคณะ ที่นำเชื้อแบคทีเรียซึ่งใส่ในนม มาวิเคราะห์หาเชื้อที่สามารถเป็นโพรไบโอติกสำหรับช่องปาก พบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส NCC1561 (*S. thermophilus* NCC1561) และเชื้อแลคโตคอคคัส แลคติส NCC2211 (*Lactococcus lactis* NCC2211) สามารถลดการยึดติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส *OMZ176* บนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย และเชื้อแลคโตคอคคัส แลคติส NCC2211 สามารถลดปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ออราลิส อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (Comelli และคณะ, 2002) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Nikawa และคณะ ยังพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส รูทีไร SD2112 ในโยเกิร์ต สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ Ingbritt ได้ (Nikawa และคณะ, 2004)

การค้นหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในร่างกาย เช่น อุจจาระ ลำไส้ใหญ่ เยื่อเมือกในช่องปาก และน้ำลายในช่องปากของผู้มีสุขภาพดี เพื่อนำเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ มาศึกษาคุณสมบัติการป้องกันโรคฟันผุ เช่น ในปี ค.ศ. 1987 Silva และคณะ คัดแยกเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG จากอุจจาระของมนุษย์ พบคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้หลายสปีชีส์ ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส เชื้อซูโดโมแนส เชื้อบิฟิโดแบคทีเรียม เชื้อแบคทีรอยดีส (Bacteroides) และเชื้อคลอสตริเดียม (Clostridium) (Silva และคณะ, 1987) ในปี ค.ศ. 1998 Ahrne และคณะ พบเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส แพลนทารัม *(Lactobacillus plantarum)* และเชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอิ ซับสปีชีส์พาราคาเซอิ *(L. paracasei* subsp. *paracasei)* ในลำไส้ใหญ่และเยื่อเมือกช่องปากของผู้ที่มีสุขภาพดี ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการนำเชื้อเหล่านี้เป็นโพรไบโอติก (Ahrne และคณะ, 1998) สำหรับในประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2001 Sookkhee และคณะ คัดแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากน้ำลายอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาช่องปากดี ได้เชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอิ ซับสปีชีส์พาราคาเซอิ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส ที่มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ เชื้อสเตรปโตคอคคัส ซัลไลวาเรียส เชื้อสเตรปโตคอคคัส แซนควินิส และเชื้อรา เป็นต้น (Sookkhee, Chulasiri และ Prachyabrued, 2001) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 Haukioja และคณะ นำเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ ชิโรตา *(L. casei* Shirota*)* เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัสจากอุจจาระ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถลดการยึดติดของเชื้อฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอทัม *(Fusobacterium nucleatum)* บนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย (Haukioja และคณะ, 2006) และในปีเดียวกัน Kang และคณะ ค้นพบเชื้อไวส์เสลล่า ซิบาเรีย CMS1 จากน้ำลายเด็กสุขภาพช่องปากดี ที่สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์ม แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ Ingbritt ได้ (Kang และคณะ, 2006)

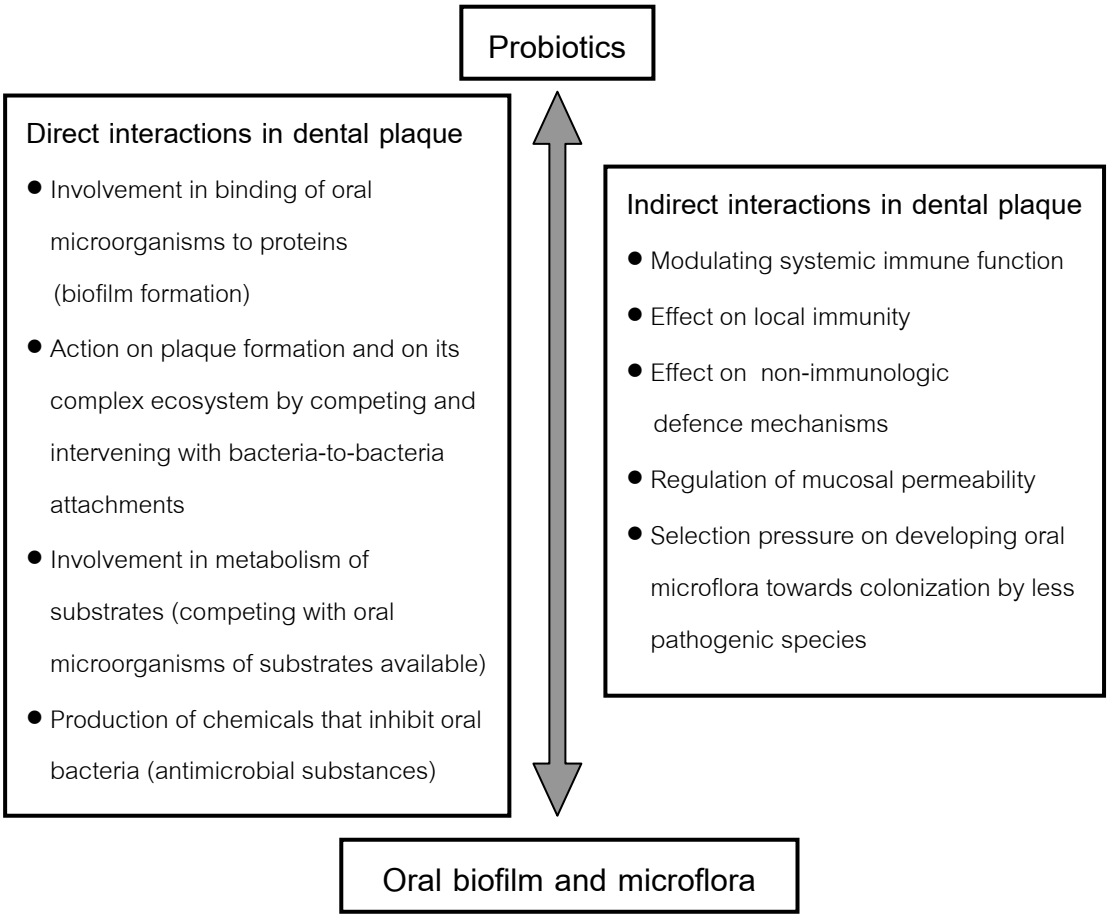
เมื่อผลการศึกษาของโพรไบโอติกต่อเชื้อสเตรปโตคอคไคในห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าสามารถนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในช่องปากได้ จึงนำมาสู่การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อ

เชื้อในช่องปากโดยตรง เช่น การศึกษาของ Näse และคณะ พบว่ากลุ่มเด็กอายุ 1 - 6 ปี ที่ดื่มนมชนิดที่มีเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG 5 วันต่อสัปดาห์ นาน 7 สัปดาห์ พบปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายลดลง และมีฟันผุลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ดื่มนมธรรมดา (Näse และคณะ, 2001) การศึกษาของ Wei และคณะ พบว่า กลุ่มที่รับประทานนมเปรี้ยวจากการหมักด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG และกลุ่มที่ได้รับนมวัวซึ่งแม่วัวถูกกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สามารถลดการยึดติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาดังกล่าว นำมาเป็นข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG ต่อการเกิดโรคฟันผุเป็นสองประเด็น คือ ประเด็นแรกเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG แย่งจับพื้นที่ยึดติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในช่องปาก ประเด็นที่สองเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG ผลิตสารบางชนิดยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และเข้าไปแทนที่เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (Wei และคณะ, 2002) กลุ่มที่บริโภคโยเกิร์ตผลไม้ที่หมักด้วยเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส ปริมาณ 125 กรัม 5 วันต่อสัปดาห์ นาน 8 สัปดาห์ มีปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลายน้อยกว่ากลุ่มที่บริโภคไอศกรีมถั่วเหลืองผสมผลไม้ (Petti และคณะ, 2001) สอดคล้องกับการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าหลังจากได้รับอาหารร่วมกับโยเกิร์ตซึ่งหมักด้วยเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส หรือร่วมกับเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส B445 ที่สัปดาห์แรกจะพบปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลายน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหาร และเมื่อได้รับโยเกิร์ตต่อเนื่องทุกวัน นาน 3 สัปดาห์ ไม่พบเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลาย (Zaazou และคณะ, 2007)

จากข้อมูลการศึกษาเบื้องต้น จึงสามารถตั้งสมมติฐานกลไกการทำงานของโพรไบโอติกในช่องปาก ดังนี้ โพรไบโอติกมีผลโดยตรงต่อคราบจุลินทรีย์ โดยแย่งที่ยึดติดเพื่อสร้างคราบจุลินทรีย์ การแย่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ และการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค นอกจากนี้โพรไบโอติกมีผลโดยอ้อมต่อคราบจุลินทรีย์ โดยมีผลต่อกลไกการป้องกันของร่างกาย ทั้งระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ (local immunity) และระบบการป้องกันแบบอื่น เช่น การควบคุมการผ่านเข้าออกของเยื่อเมือก (regulation of mucosal permeability) (Meurman, 2005) เป็นต้น (รูปที่ 6)

เมื่อศึกษาผลของการรับประทานโพรไบโอติก ต่อจำนวนเชื้อในช่องปากที่ลดลงอย่างต่อเนื่องยังเป็นที่ขัดแย้งกัน กล่าวคือการรับประทานโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG ประจำทุกวัน ภายหลังจากหยุดรับประทานโยเกิร์ต สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในน้ำลายอีก 2 สัปดาห์ (Meurman และคณะ, 1995) แต่บางการศึกษาพบว่า การรับประทานโยเกิร์ตไม่มีผลต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำลายอย่างต่อเนื่องคือ การรับประทานโพรไบโอติกเป็นประจำจะสามารถลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อแลคโตบาซิลลัสในน้ำลายได้ แต่เมื่อหยุดการบริโภค

ประสิทธิภาพของการต้านเชื้อจะหมดตามไปด้วย (Petti และคณะ, 2001) และในบางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการใช้โพรไบโอติก กับการลดจำนวนเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุในระหว่างที่รับประทาน แต่กลับให้ผลหลังรับประทาน เช่น การรับประทานชีสที่มีส่วนประกอบของเชื้อแลคโต-บาซิลลัส แรมโนซัส GG และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส LC705 ในกลุ่มอายุ 18-35 ปี ปริมาณ 15 กรัมต่อวัน นาน 3 สัปดาห์ ช่วงที่รับประทานชีส ไม่พบการลดลงของปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และยีสต์ในน้ำลาย แต่หลังการรับประทานชีสพบว่า กลุ่มที่รับประทานโพรไบโอติกชีสมปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และยีสต์ในน้ำลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่รับประทานชีสธรรมดา (Ahola และคณะ, 2002)



รูปที่ 6 สมมติฐานกลไกการทำงานของโพรไบโอติกในช่องปาก
ที่มา: Meurman, 2005

เมื่อศึกษาผลของการบริโภคโยเกิร์ต ต่อปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัสในช่องปาก พบว่าการบริโภคไบโอโยเกิร์ต (bio-yoghurt) ที่ใส่เชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส มีชีวิต วันละ 2 ถ้วย ถ้วยละ 100 มิลลิลิตร หลังอาหารเช้า และอาหารเย็น นาน 1 สัปดาห์ ไม่พบว่ามีเชื้อแลคโตบาซิลลัสในน้ำลายและคราบจุลินทรีย์ที่ซอกฟัน (Busscher, Mulder และ van der Mei, 1999)

เมื่อศึกษาผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส ต่อการเกิดโรคฟันผุ ในงานวิจัยของ Montalto และคณะ ตัดต่อพันธุกรรมของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่ใส่ในโยเกิร์ต เพื่อต่อต้านเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ พบว่า หนูทดลองที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่มีการดัดแปลงสายพันธุ์ จะมีฟันผุลดลง ดังนั้นการใส่เชื้อแบคทีเรียที่ต่อต้านเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุในอาหารหรือเครื่องดื่ม สามารถช่วยป้องกันโรคฟันผุ และต่อต้านเชื้อโรคในช่องปากและทางเดินอาหาร การให้เชื้อแลคโตบาซิลลัส ทั้งในรูปของเหลวหรือแคปซูล สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อแลคโตบาซิลลัสในน้ำลายได้ แต่ไม่มีผลต่อระดับเชื้อสเตรปโต-คอคคัส มิวแทนส์ การใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัสเป็นโพรไบโอติก ทำให้เชื้อแลคโตบาซิลลัส ในน้ำลาเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงควรตรวจสุขภาพช่องปากในผู้ป่วยที่ได้รับโพรไบโอติก เป็นระยะเวลานาน แม้ว่ารูปแบบของการให้จะไม่ได้สัมผัสกับตัวฟันโดยตรง (Montalto และคณะ, 2004)

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย (Murray และคณะ, 1995)

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบและหาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต หรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แบ่งเป็นสองวิธี ดังนี้ วิธีหนึ่งคือ การทดสอบด้วยวิธีการเจือจาง (dilution susceptibility method) เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ด้วยการเจือจางยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว หรือการเจือจางยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น แล้วจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bacteriocidal concentration; MBC) ตามลำดับ วิธีที่สองคือ การทดสอบด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น เป็นวิธีทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial susceptibility testing; AST) โดยเปรียบเทียบขนาดวงใสบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น ซึ่งเป็นผลการแพร่ของยาปฏิชีวนะในกระดาษกรองหรือในหลุม ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแบบวุ้น กับค่ามาตรฐานที่รวบรวมจากองค์การ NCCLS (the National Committee for Clinical Laboratory Standards) ค่าที่อ่านได้เป็น 3 แบบ คือ เชื้อจุลินทรีย์ไวต่อยามาก (susceptibility) เชื้อจุลินทรีย์ไวต่อยาปาน-กลาง (intermediate susceptibility) และเชื้อจุลินทรีย์ต้านยา (resistance) (NCCLS, 2007)

การทดสอบด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการทดสอบเชื้อที่เจริญเติบโตเร็ว เช่น เชื้อสเตรปโตคอคไค แปลผลได้เร็ว ทำซ้ำได้ ไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษ สารที่ใช้ในการทดลองมีราคาพอสมควร ดังนั้นจึงนิยมนำมาใช้หาความจำเพาะของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรีย และนำมาทดสอบความไวของเชื้อต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตทางทันตกรรม เช่น การทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของยาสีฟันที่มีสารระงับเชื้อ ยาฆ่าเชื้อในคลองรากฟัน และวัสดุอุดฟันชนิดต่างๆ เป็นต้น (Lee, Zhang และ Li, 2004; Turkun และคณะ, 2005; Vermeersch และคณะ, 2005)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย เชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก

ตัวอย่าง เชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก จำนวน 5 สายพันธุ์ ดังนี้

1. เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175
2. เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt
3. เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ TPF-1
4. เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13
5. เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ 6715

(จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง

การสุ่มตัวอย่างตามจุดมุ่งหมาย (purposive sampling)

หลักเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเลือกมาจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ กับเชื้อสเตรป-โตคอคคัส โซไบรนัส แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคฟันผุของมนุษย์

สิ่งแทรกแซง

ตัวอย่าง เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จำนวนเชื้อ 4 สายพันธุ์ ดังนี้

1. เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สายพันธุ์ ATCC19258
2. เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842
3. เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L
4. เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469

(จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

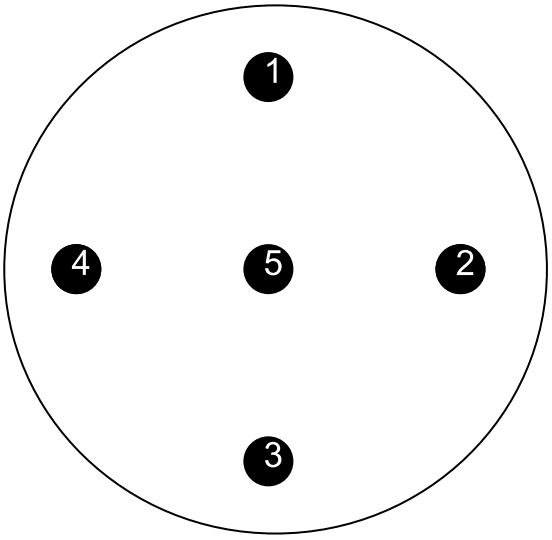
นำมาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก

ขนาดตัวอย่างและการสุ่มตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่ไม่สามารถคำนวณเพื่อกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างได้ ดังนั้นจึงกำหนดจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3 (n=3) และในแต่ละตัวอย่างทดลองทำซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่าง

การจัดสรรกลุ่มตัวอย่าง (subject allocation) ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple randomization) โดยให้ผู้ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการทดลอง จับฉลากกำหนดสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษ A B C D และ E และติดสัญลักษณ์แก่เชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปากแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^{8} ซีเอฟยู/มิลลิลิตร และกำหนดสัญลักษณ์ตัวเลข 1 2 3 และ 4 ติดสัญลักษณ์แก่เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ที่ผ่านการปรับปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^{6} ซีเอฟยู/มิลลิลิตร พร้อมบันทึกข้อมูลลงซองปิดผนึก โดยผู้ทำการทดลองไม่ทราบ

กำหนดตำแหน่งหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแต่ละจาน ทั้งหมด 5 หลุม (รูปที่ 7) ทดสอบด้วยตัวควบคุมเชิงบวก (ยาน้ำแอมม็อกซีซิลิน) ที่ตำแหน่งหมายเลข 5 สุ่มตำแหน่งตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว) 1 หลุม และหลุมที่เหลือเป็นเชื้อแลคติกแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน 3 ตำแหน่ง บันทึกหมายเลขตำแหน่งของสารทดสอบแต่ละชนิดในแต่ละจาน



รูปที่ 7 หมายเลขตำแหน่งหลุม 5 หลุม บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลลัส สายพันธุ์ ATCC19258 (TISER894) เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842 (TISER892) เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L (TISER451) และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469 (TISER047)
2. เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 (American Type Culture Collection, USA) Ingbritt และ TPF-1 (ซีโรไทป์ ซี; สายพันธุ์ไทยได้รับจาก Professor Douglas Bratthall. Malmo University, Sweden)
3. เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 (ซีโรไทป์ ดี) และ 6715 (ซีโรไทป์ จี)

4. Brain-heart infusion broth (BHI broth; Britania, Argentina)
5. Columbia Blood Agar (CBA; Difco, USA)
6. Human blood (สภากาชาดไทย)
7. Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth; Britania, Argentina)
8. Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar; Britania, Argentina)
9. สารมาตราฐานแมคฟาแลนด์ 0.5 (0.5 McFarland turbidity standard) เตรียมโดยผสมแบเรียมคลอไรด์ (barium chloride) ร้อยละ 1 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร กับ กรดซัลฟูริก ร้อยละ 1 ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร
10. ยาน้ำแอมม็อกซีซิลิน (amoxicillin syrup) ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BH2; Olympus Optical Company Limited, Japan)
2. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (digital camera; Sony DSC-F828, Japan)
3. โปรแกรมคอมพิวเตอร์นับจำนวนโคโลนี (Hui Photo Pro, ประเทศไทย)
4. โปรแกรมคอมพิวเตอร์วัดขนาดวงใสบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น (Image Pro Plus 4.5 software; Media Cybernetics, Silver Spring, USA)
5. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS spectrophotometer; Ultrospec 3000 pro; Pharmacia Biotech®, England)
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave; Rexall®, LS-2D; Rexall Industries Co. Ltd., Taiwan)
7. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า (METLER AT261 DeltaRange®, Switzerland)
8. เครื่องสั่นไฟฟ้า (Vortex; Genie 2; Scientific Industries, USA)
9. เพลทให้ความร้อนและกวนด้วยแม่เหล็ก (IKAMAG®, Germany)
10. แท่งแม่เหล็กผสมสาร (magnetic bar)
11. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar air flow; Forma Scientific, B.H.A.120; Forma Scientific, USA)
12. ตู้บ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (infra-red CO_2 incubator; Forma Scientific, 3194; Forma Scientific, USA)
13. ตู้แช่แข็ง (freezer; Revco®, ULT 1340-7-VBA; Revco Scientific Inc., USA)
14. ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
15. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร
16. Biopsy punch ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Stiefel®, Wächtersbach, Germany)

17. กรวยกรอง และเยื่อกรองขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร (cellulose acetate membrane; Sartorius®, Germany)
18. อีเลนเมเยอร์ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาดต่างๆ ได้แก่ 250 300 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
19. หลอดทดลองแก้วปราศจากเชื้อ (sterile test tubes) ขนาด 20 และ 50 มิลลิลิตร
20. ไมโครปิเปตต์ (micro pipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร
21. ปิเปตต์ (pipette) ขนาดต่างๆ ได้แก่ 1 5 10 20 และ 25 มิลลิลิตร
22. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 6 มิลลิลิตร
23. คิวเวท (cuvette)
24. แท่งแก้วกวนสาร (glass rod)
25. เม็ดแก้ว (spreader glass beads) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
26. ห่วงเขี่ยเชื้อ (sterile loop)
27. ไม้โปรแทรกเตอร์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อสเตรปโตคอคไค

นำเชื้อสเตรปโตคอคไค 5 สายพันธุ์ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 25175, Ingbritt และ TPF-1 กับเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715 มาย้อมสีแกรม (Gram stain) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยดูรูปร่างและลักษณะการเรียงตัวของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพาะเลี้ยงเชื้อบน CBA ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ เดือน และส่วนหนึ่งเก็บรักษาในกลีเซอรีนกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำเชื้อมาใช้ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงเชื้อ (subculture) 3 รุ่น เพื่อให้เชื้อมีความสมบูรณ์สำหรับการทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในแต่ละครั้งไม่เกิน 6 วัน และไม่นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อเกิน 20 ครั้งมาใช้ เพราะเชื้ออาจเป็นเชื้อกลายพันธุ์

เลือกเชื้อที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-4 โคโลนี จาก CBA เลี้ยงใน BHI broth 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาณเชื้อด้วย BHI broth ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 1×10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร (รายละเอียดที่ภาคผนวก ก)

2. การเตรียมผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ดัดแปลงจากวิธีของ Lin และคณะ, 2007)

นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสภาพแห้งแข็ง มาเพาะเลี้ยงใน MRS broth 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลานาน 48 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเชื้อ 3 รุ่น เพื่อให้เชื้อมีความสมบูรณ์สำหรับการทดลอง เลือกเชื้อที่มีลักษณะเป็น

โคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-4 โคโลนี จาก MRS agar เลี้ยงใน MRS broth 30 มิลลิลิตร แล้วนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เข้าตู้บ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ปรับปริมาณเชื้อด้วย MRS broth ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 1×10^{6} ซีเอฟยู/มิลลิลิตร (รายละเอียดที่ภาคผนวก ก) กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บอาหารเหลวที่ได้ไว้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3. การเตรียมตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ

เตรียมตัวควบคุมเชิงบวก ยาน้ำแอมม็อกซีซิลิน ความเข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมน้ำกลั่นใส่ยาแอมม็อกซีซิลินผงตามสัดส่วนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ได้ความเข้มข้นยาน้ำ 125 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร ปิเปตต์ยาน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เป็นสัดส่วนหนึ่งในสิบส่วน เจือจางความเข้มข้นเป็นลำดับ (serial dilution) ถึง 10^{4} สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

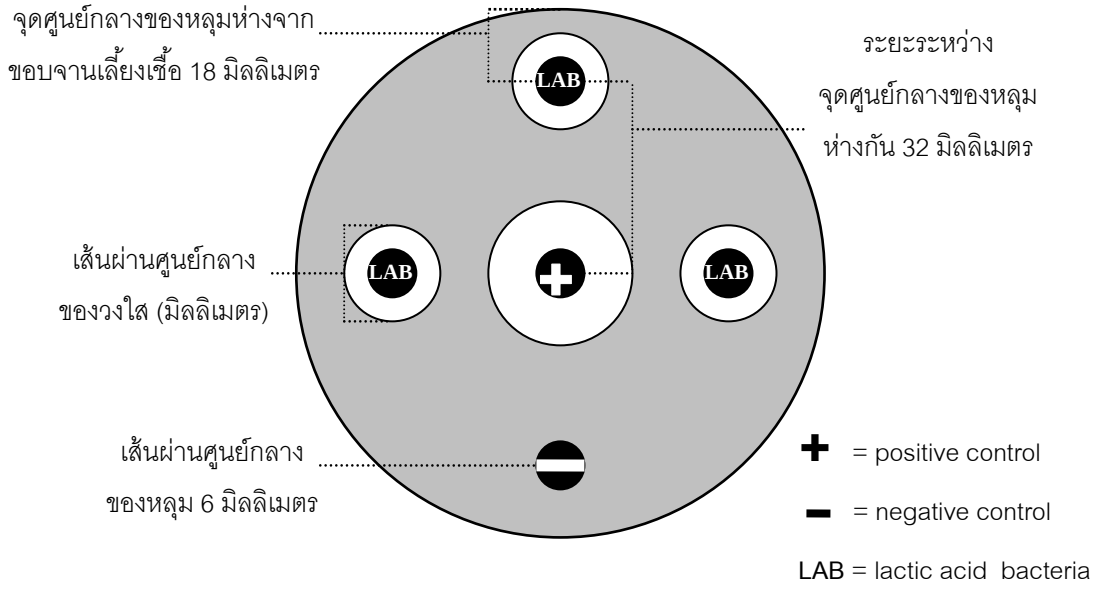
เตรียมตัวควบคุมเชิงลบ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MRS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและบ่มเชื้อด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมากรองด้วยเยื่อกรองขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4. การทดสอบด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น (ดัดแปลงจากวิธี Kirby-Bauer: NCCLS, 2007)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CBA (ตามสูตรที่บริษัทแนะนำ) ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร ได้ความหนาของวุ้นสม่ำเสมอตามแนวระนาบนอน ประมาณ 4 ± 0.5 มิลลิเมตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ วางจานเลี้ยงเชื้อในตู้ลามินาโฟลว์ รอจนวุ้นแข็งและไอน้ำที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อระเหยจนหมด เก็บจานเลี้ยงเชื้อคว่ำเรียงใส่ถุงปิดมิดชิดในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นำมาใช้ภายใน 4 สัปดาห์ ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นมาใช้ ควรวางในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไอน้ำที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อ และบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น ระเหยออกหมด

ปิเปตต์เชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปากแต่ละสายพันธุ์ ที่ได้ปรับปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^{8} ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบน CBA แล้วจึงใส่เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 15–20 เม็ด เขย่าให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วบนผิวอาหารแบบวุ้นด้วยเม็ดแก้ว เทเม็ดแก้วออก ปิดฝาและคว่ำจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแห้งพอหมาด ประมาณ 30 นาที แล้วจึงใช้ biopsy punch ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะหลุมจำนวน 5 ช่อง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นตามตำแหน่งที่กำหนด (รูปที่ 8) ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่มีผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งผ่านการกรองด้วยเยื่อกรองขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเชื้อ

แลคติกแอซิดแบคทีเรียออก ปิเปตต์ตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงตามตำแหน่งที่กำหนด นำเชื้อบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง



รูปที่ 8 ตำแหน่งหลุม จำนวน 5 หลุม บนจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร

การเก็บและรวบรวมข้อมูล

บันทึกผลโดยถ่ายรูปจานเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ ด้วยกล้องถ่ายรูปดิจิตอล ความละเอียดของภาพ 8 ล้านพิกเซล ซึ่งมีไม้โปรแทรกเตอร์เป็นมาตราวัดสำหรับเปรียบเทียบเพื่อคำนวณสัดส่วนหาขนาดรูปจริงในแต่ละรูป วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สั้นที่สุดของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลุมวัดครั้งเดียว ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 4.5 บันทึกค่าเป็นหน่วยมิลลิเมตร ทศนิยม 2 ตำแหน่ง วัดและจดบันทึกค่าที่วัดได้โดยนักวิจัยคนเดียวตลอดการทดลอง

การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด

การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด ความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคไค ทำโดยการวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 4.5 โดยวัดซ้ำ 2 ครั้งในเวลาที่ต่างกันและค่าที่วัดได้ทั้ง 2 ครั้งมาทดสอบสมมติฐานหาความแตกต่างกันของเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้ ถ้าค่าที่วัดได้ซ้ำ 2 ครั้งนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แสดงถึงการยอมรับได้ของความเที่ยงของการวัด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบหลุมในแต่ละสายพันธุ์ จากผลการทดลองซ้ำ 5 ครั้งมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยผลการยับยั้งของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

สเตรปโตคอคไคแต่ละสายพันธุ์ มาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) วัดแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง ได้แก่ ค่าเฉลี่ย วัดความผันแปร ได้แก่ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองที่ได้ในเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละชนิด และนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงอนุมาน (inferencial statistics) โดยนำเฉพาะสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไคได้ มาเปรียบเทียบความสามารถของผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ดังนี้ ในกรณีที่ข้อมูลพบว่ามีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไคมีการแจกแจงแบบปกติ วิเคราะห์ด้วยสถิติ Paired-sample t test และกรณีที่มีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมากกว่า 2 สายพันธุ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค มีการแจกแจงแบบปกติ วิเคราะห์ด้วยสถิติ oneway-ANOVA เพื่อหาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ และหาคู่ของสายพันธุ์เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย Post Hoc multiple comparison และกรณีที่ข้อมูลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 หรือมากกว่า 2 สายพันธุ์ มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค วิเคราะห์ด้วยสถิติ Mann Whitney U test และ Kruskal Wallis test ตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไคโดยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค 5 สายพันธุ์ แสดงเป็นค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของบริเวณที่ไม่มีเชื้อสเตรปโตคอคไค ซึ่งค่าที่วัดได้รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของหลุมที่เจาะด้วย ดังนั้นค่าที่มีผลการยับยั้งจะต้องมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่มากกว่า 6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2)

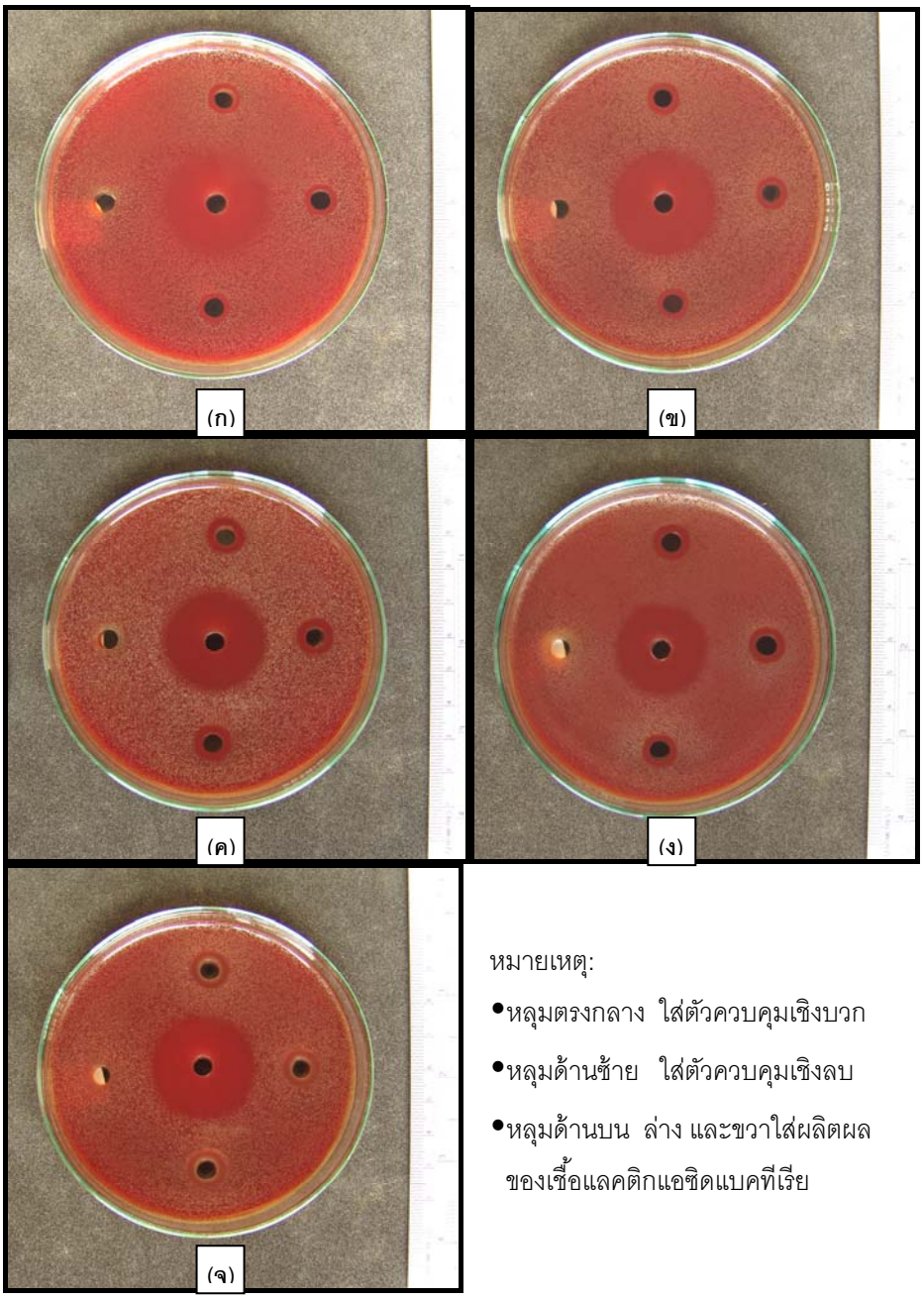
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อสเตรปโตคอคไคขึ้น (มิลลิเมตร) เมื่อทดสอบด้วยผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตัวควบคุมเชิงบวก และตัวควบคุมเชิงลบ

	S. mutans			*S. sobrinus*	
Lactic acid bacteria	ATCC 25175	Ingbritt	TPF-1	B13	6715
S. thermophilus	9.27 ± 0.07*	5.95 ± 0.04	5.99 ± 0.04	5.98 ± 0.05	6.01 ± 0.05
L. delbrueckii	5.99 ± 0.06	6.00 ± 0.03	5.96 ± 0.02	9.07 ± 0.13*	6.00 ± 0.02
L. bulgaricus	5.97 ± 0.04	10.72 ± 0.08*	9.58 ± 0.09*	10.76 ± 0.04*	5.96 ± 0.03
L. rhamnosus	5.97 ± 0.06	5.95 ± 0.04	5.99 ± 0.03	5.96 ± 0.04	6.01 ± 0.05
Positive control (Amoxicillin 0.0025 mg/ml)	29.54 ± 1.00	28.80 ± 0.69	25.97 ± 3.85	29.75 ± 0.26	11.37 ± 0.68
Negative control (MRS broth)	6.00 ± 0.05	5.98 ± 0.05	5.98 ± 0.04	5.99 ± 0.06	6.00 ± 0.05

* ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค (เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากกว่า 6 มิลลิเมตร)

จากการทดลองพบว่า ในเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ มีเพียง 3 สายพันธุ์ ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ส่วนเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ตัวอย่างจานเลี้ยงเชื้อที่ผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค แสดงในรูปที่ 9

เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ของตัวควบคุมเชิงบวก พบว่า ตัวควบคุมเชิงบวก มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคไคแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยสามารถยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC25175 (29.54 ± 1.00 มม.) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส B13 (29.75 ± 0.26 มม.) ได้มากใกล้เคียงกัน แต่ยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส 6715 (11.37 ± 0.68 มม.) ได้น้อยที่สุด



รูปที่ 9 จานเลี้ยงเชื้อที่ผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

(ก) ผลิตผลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC25175

(ข) ผลิตผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส B13

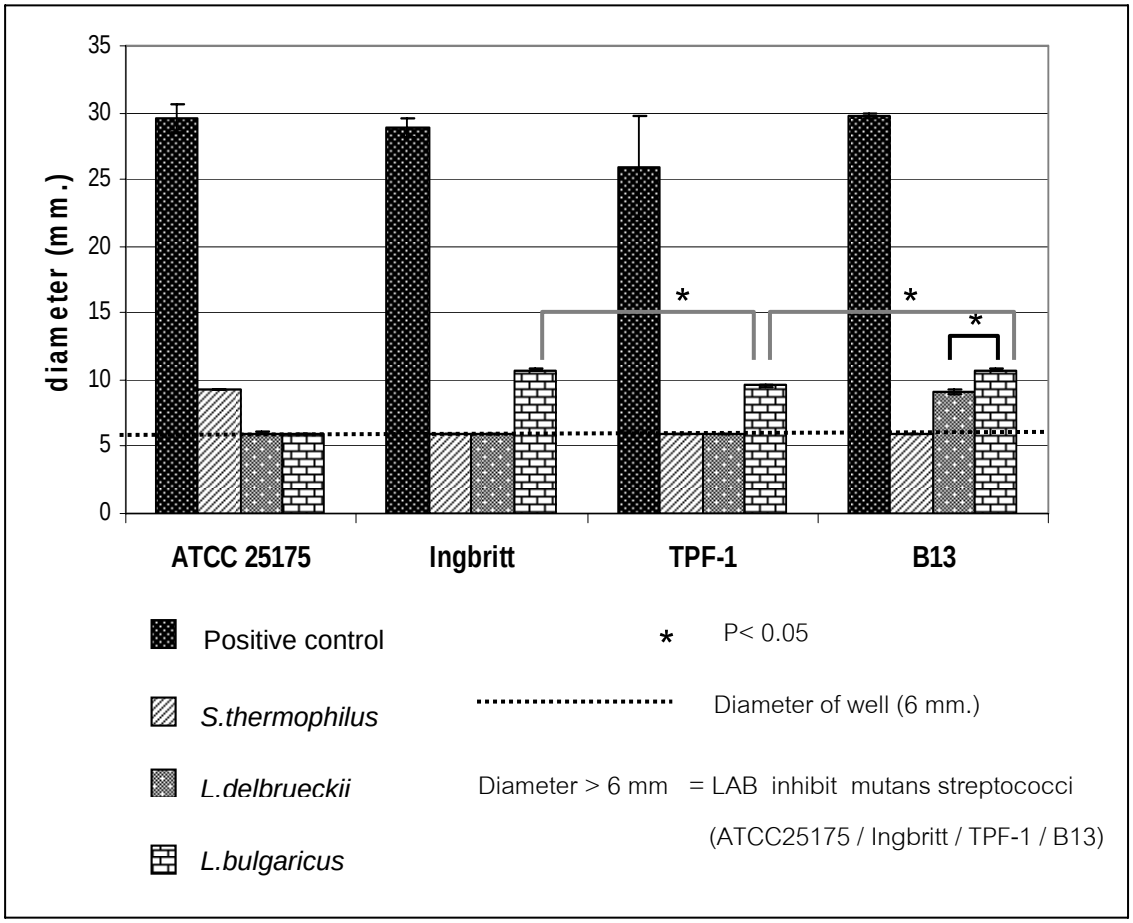
(ค) ผลิตผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ Ingbritt

(ง) ผลิตผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ TPF-1

(จ) ผลิตผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส B13

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้แตกต่างกัน เมื่อนำข้อมูลมาทดสอบการกระจายของข้อมูล พบว่าข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ ดังนั้นจึงใช้สถิติพาราเมตริกมาทดสอบสมมติฐาน เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt (10.72 ± 0.08 มม.) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 (10.76 ± 0.04 มม.) ได้มากกว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ TPF-1 (9.58 ± 0.09 มม.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณที่ไม่มีเชื้อสเตรปโต-คอคไคขึ้น (มิลลิเมตร)

จากการเปรียบเทียบผลการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส (10.76 ± 0.04 มม.) สามารถยับยั้งได้มากกว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ (9.07 ± 0.13 มม.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 10)

การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด

การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 4.5 ซ้ำ 2 ครั้งในวันเวลาที่ต่างกัน พบว่า ค่าที่วัดได้ทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของการวัดที่ยอมรับได้ของผู้วัด (รายละเอียดที่ภาคผนวก ง)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส โดยเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโต-คอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt TPF-1 และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ได้

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ได้ใกล้เคียงกัน โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ได้มากกว่ายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ TPF-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค พบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส มากกว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อภิปรายผล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของผลิตผล ที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สายพันธุ์ ATCC19258 เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842 เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L และเชื้อแลคโต-บาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคฟันผุในมนุษย์ ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 Ingbritt TPF-1 เชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715

วิธีทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้วิธีเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วใส่ผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียลงในหลุม การแพร่ของผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปในการประเมินความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ และประเมินความสามารถของผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ต่อการยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น เชื้อสเตรปโตคอคคัส เชื้อซูโดโมแนส เชื้อเอสเชอรีเชีย โคไล และเชื้อซาลโมเนลลา เป็นต้น (Silva และคณะ, 1987; Arici และคณะ, 2004; Erdogrul และ Erbilir, 2006; Lin และคณะ, 2007) ส่วนการวิจัยทางทันตกรรมวิธีนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุและสารต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น (Lee, Zhang และ Li, 2004; Turkun และคณะ, 2005; Vermeersch และคณะ, 2005) วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่เหมาะสมและง่าย สำหรับใช้เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

ในการทดลองนี้เลือกยาน้ำแอมม็อกซีซิลินเป็นตัวควบคุมเชิงบวก เนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนนิซิลิน ซึ่งใช้ได้ดีสำหรับเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งของแอมม็อกซีซิลินต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค พบว่าเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโต-คอคไค แต่ละสายพันธุ์ มีความไวต่อแอมม็อกซีซิลินได้แตกต่างกัน จากมากไปหาน้อยตามลำดับ ดังนี้ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC25175 และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส B13 ได้มากใกล้เคียงกัน ถัดมาเป็นเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ Ingbritt TPF-1 และเชื้อสเตรปโต-คอคคัส โซไบรนัส 6715 ได้น้อยที่สุด

เนื่องจาก FAO และ WHO ได้แนะแนวทางสำหรับการเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก ควรทราบชื่อสายพันธุ์ ทั้งสกุล และสปีชีส์ เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายและผลข้างเคียงของการใช้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต และผ่านการตรวจสอบสายพันธุ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาทดลองในงานวิจัยนี้ ซึ่งดีกว่าการคัดแยกเชื้อจากในร่างกาย เช่น ลำไส้ และช่องปาก ที่ต้องตรวจสอบสายพันธุ์และศึกษาความปลอดภัยก่อนนำมาใช้ นอกจากนี้ข้อมูลจากการทดลอง จะทำให้ทราบคุณสมบัติด้านการป้องกันโรคฟันผุของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต

เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 สอดคล้องกับการศึกษาการบริโภค

โยเกิร์ตที่มีเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ สามารถลดปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคัส มิวแทนส์ ในน้ำลายได้ (Petti และคณะ, 2001; Zaazou และคณะ, 2007) ซึ่งเป็นไปได้ว่าในโยเกิร์ตที่บริโภค มีผลิตผลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ เช่น กรดแลคติก กรดแอซิติก ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ไดอะซิติล และแบคทีริโอซิน เป็นต้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (Silva และคณะ, 1987; Sookkhee และคณะ, 2001)

เมื่อพิจารณาเชื้อแลคโตบาซิลลัส ซับสปีชีส์อื่นๆ ที่นำมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตแทนการใช้เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส และเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ผู้วิจัยจึงนำเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ค้นพบในประเทศไทย และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469 ซึ่งเป็นเชื้อแลคโตบาซิลลัส ในสปีชีส์แรมโนซัส ที่มีในประเทศและสามารถนำมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตได้ มาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ระหว่างเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ กับเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคได้หลายสายพันธุ์ คือ เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt TPF-1 และเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ในขณะที่เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตเฉพาะเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13 ได้มากกว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นการนำเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส มาเป็นหัวเชื้อในการผลิตแทนเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ น่าจะมีประโยชน์ในการป้องกันโรคฟันผุได้มากกว่า

ในการวิจัยนี้พบว่า ผลิตผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Silva และคณะ ที่พบว่าผลิตผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค เนื่องจากสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส และปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ตั้งต้นมีความแตกต่างกัน กล่าวคือในการวิจัยได้ใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469 และผลิตผลที่นำมาทดสอบนั้นมาจากเชื้อปริมาณ 10^6 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ในขณะที่การศึกษาของ Silva และคณะ นำผลิตผลที่ได้จากเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส GG ปริมาณเชื้อ 10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร (Silva และคณะ, 1987)

ผลการศึกษานี้พบว่า ผลิตผลจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียของสายพันธุ์ต่างๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะ

ผลิตผลจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน และเป็นที่น่าสังเกตในการทดลองนี้ว่า ถึงแม้ผลิตผลจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยาน้ำแอมม็อกซีซิลิน ความเข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเจือจางเป็น 10^4 เท่า จากยาน้ำแอมม็อกซีซิลิน ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค น้อยกว่ายาน้ำแอมม็อกซีซิลินอยู่มาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทดลองมีปริมาณน้อย ผลิตผลที่ได้จึงน้อย ดังนั้นในการประยุกต์นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค เพื่อป้องกันโรคฟันผุ อาจต้องใช้ปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มากกว่า 1×10^6 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร หรืออาจสกัดเฉพาะผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นมากขึ้นมาศึกษา

แต่อย่างไรก็ตามควรพิจารณาคุณสมบัติของผลิตผลต่างๆ ที่นำมาใช้ด้วย เพราะผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค เพื่อป้องกันโรคฟันผุ อาจทำให้ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.5 ส่งเสริมการสูญเสียแร่ธาตุจากตัวฟัน ดังนั้นควรต้องคำนึงถึงรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ใช้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติก เช่น ชีสและโยเกิร์ตรสธรรมชาติ (plain yoghurt) เป็นรูปแบบของอาหารที่นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาใช้แปรรูปนม ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ต่อช่องปาก เพราะนมจะเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีสำหรับลดความเป็นกรดในช่องปาก ยังมีแคลเซียมที่ส่งเสริมให้คืนกลับสู่ตัวฟัน (Weiss และ Bibby, 1966)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ให้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้บางสายพันธุ์ ประโยชน์จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับหาสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งให้ผลิตผลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์แยกผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุโรคฟันผุอย่างเฉพาะเจาะจงในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก และหมากฝรั่ง

การศึกษานี้มีข้อจำกัดเพราะเป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ และศึกษาผลิตผลรวมที่สร้างจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคสายพันธุ์หนึ่ง ซึ่งไม่ได้เลียนแบบสภาวะในช่องปากที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่รวมกันเป็นไบโอฟิล์ม ดังนั้นจึงไม่ทราบกลไกการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่รวมกัน เช่น ผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีต่อกัน ผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ทั้งด้านการแย่งที่ยึดติดเพื่อสร้างคราบจุลินทรีย์ การแย่งอาหารเพื่อดำรงชีพของเชื้อจุลินทรีย์ และผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ที่สามารถ

ช่วยลดปริมาณเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคในช่องปากได้ ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นสำหรับเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการผลิตโพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพช่องปาก ไม่สามารถนำไปขยายผลทางคลินิกได้โดยตรง ดังนั้นก่อนนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาใช้ป้องกันโรคฟันผุ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง เพื่อทำความเข้าใจ กลไกการทำงานของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรป-โตคอคไค ก่อนนำมาใช้จริงในมนุษย์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาวิเคราะห์แยกผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค
2. ควรศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ในห้องปฏิบัติการซึ่งจำลองรูปแบบของไบโอฟิล์มในช่องปาก เพื่อนำผลการศึกษามาสู่การศึกษาทางคลินิกต่อไป
3. ควรศึกษาหาสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารด้านอื่นๆ เพื่อค้นหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพช่องปาก
4. ควรศึกษาผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ในด้านอื่นๆ เช่น การขัดขวางการยึดติดของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เพื่อป้องกันโรคฟันผุ
5. ควรมีการศึกษาผลของส่วนผสมของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียหลายชนิดรวมกัน เพื่อทราบกลไกการทำงานของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีต่อกัน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สาธารณสุข, กระทรวง. กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย. รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543-2544.

สาธารณสุข, กระทรวง. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 289) พ.ศ. 2548 เรื่องนมเปรี้ยว ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 122 ตอนพิเศษ ลงวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2548.

ภาษาอังกฤษ

Ahola, A. J.; Yli-Knuuttila, H.; Suomalainen, T.; Poussa, T.; Ahlström, A.; Meurman, J. H.; and Korpela, R. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol. 47 (2002): 799-804.

Ahrne, S.; Nobaek, S.; Jeppsson, B.; Adlerberth, I.; Wold, A. E.; and Molin, G. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. J Appl Microbiol. 85 (1998): 88-94.

Alvarez-Olmos, M. I. and Oberhelman, R. A. Probiotic agents and infectious disease: a modern perspective on a traditional therapy. Clin Infect Dis. 32 (2001): 1567-1576.

Anuradha, S. and Rajeshwari, K. Probiotics in health and disease. J Ind Acad Clin Med. 6 (2005): 67-72.

Anusavice, K. J. Present and future approaches for the control of caries. J Dent Educ. 69 (2005): 538-554.

Arici, M.; Bilgin, B.; Sagdic, O.; and Ozdemir, C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. Food Microbiol. 21 (2004): 19-24.

Beighton, D.; Russell, R. R.; and Hayday, H. The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys. J Gen Microbiol. 124 (1981): 271-279.

Bratthall, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Revy. 21 (1970): 143-152.

Busscher, H. J.; Mulder, A.F.J.M.; and van der Mei, H. C. In vitro adhesion to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by Lactobacillus from a bio-yoghurt. Caries Res. 33 (1999): 403-404.

Caglar, E.; Kargul, B.; and Tanboga, I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. Oral Dis. 11 (2005): 131-137.

Chung, J.; Ha, E. S.; Park, H. R.; and Kim, S. Isolation and characterization of Lactobacillus species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Oral Microbiol Immunol. 19 (2004): 214-216.

Comelli, E. M.; Guggenheim, B.; Stingele, F.; and Neeser, J. R. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. Eur J Oral Sci. 110 (2002): 218-224.

Erdogrul, O. and Erbilir, F. Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. Turk J Biol. 30 (2006): 39-44.

FAO/WHO. Health and nutritional probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. pp.1-23. Cordoba, Argentina, October 1-4, 2001.

FAO/WHO. Guidelines for evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for evaluation of probiotics in food, pp.1-8. London Ontario, Canada, April 30 to May 1, 2002.

Featherstone, J. D. B. The continuum of dental caries-evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 83 (2004): 39-42.

Fejerskov, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res. 38 (2004): 182-191.

Fermentation of glucose by homofermentative and heterofermentative bacteria. Items in the microbiology textbook are copyright, Timothy Paustian© 1999-2006. [Online]. Available from: http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php. [2007, Mar 10]

Fuller, R. Probiotics in human medicine. Gut. 32 (1991): 439-442.

Hamada, S. and Slade, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *streptococcus mutans*. Microbio Rev. 44 (1980): 331-384.

Hatakka, K.; Ahola, A. J.; Yli-Knuuttila, H.; Richardson, M.; Poussa, T.; Meurman, J. H.; and Korpela, R. Probiotics reduce the prevalence of oral Candida in the elderly. Am J Clin Nutr. 85 (2007): 816 - 823.

Haukioja, A.; Yli-Knuuttila, H.; Loimaranta, V.; Kari, K.; Ouwehand, A. C.; Meurman, J. H.; and Tenovuo, J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Oral Microbiol Immunol. 21 (2006): 326-332.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J. Probiotics: a general view. The lactic acid bacteria in health and disease. In Wood (ed.), London: Elsevier Applied Science, 1992.

Ito, A.; Sato, Y.; Kudo, S.; Sato, S.; Nakajima, H.; and Toba, T. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. Curr Microbiol. 47 (2003): 231-236.

Kang, M. S.; Chung, J.; Kim, S. M.; Yang, K. H.; and Oh, J. S. Effect of *Weissella cibria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Caries Res. 40 (2006): 418-425.

Kawamura, Y.; Hou, X.; Sultana, F.; Miura, H.; and Ezaki, T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetics relationships among members of genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol. 45 (1995): 406-408.

Keyes, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: Findings and implications. Arch Oral Biol. 1 (1960): 304-320.

Krasse, P.; Carlsson, B.; Dahl, C.; Paulsson, A.; Nilsson, A.; and Sinkiewicz, G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri.* Swed Dent J. 30 (2005): 55-60.

Lanciotti, R.; Patrignani, F.; Bagnolini, F.; Guerzoni, M. E.; and Gardini, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* Food Microbiol. 20 (2003): 537-543.

Lawrence, R. C. and Terence, T. D. Microbial Technology: Current state future prospects : the fermentation of milk by lactic acid bacteria. Cambridge: Cambridge University Press, 1979.

Lee, S.B.; Zhang, W.; and Li, F. The antimicrobial potential of 14 herbal dentifrices. J Am Dent Assoc. 135 (2004): 1133-1141.

Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147 (1965): 747-748.

Lin, W. H.; Yu, B.; Jang S. H.; and Tsen, H. Y. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe. 13 (2007): 107-113.

Marsh, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. 8 (1994): 263-271.

Metchnikoff, E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life: optimistic studies. In Chalmers Mitchell P (ed.), London: G. P. Putman's & Sons, 1907.

Meurman, J. H.; Antila, H.; Korhonen, A.; and Salminnen, S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. Eur J Oral Sci. 103 (1995): 253-258.

Meurman, J. H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? Eur J Oral Sci. 113 (2005): 188-196.

Montalto, M.; Vastola, M.; Marigo, L.; Covino, M.; Graziosetto, R.; Curigliano, V.; Santoro, L.; Cuoco, L.; Manna, R.; and Gasbarrini, G. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. Digestion. 69 (2004): 53-56.

Murray, R. P.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; and Yolken H. R. Manual of clinical microbiology. 6 th ed. American Society for Microbiology. Washington: ASM Press, DC, 1995.

Näse, L.; Hatakka, K.; Savilahti, E.; Saxelin, M.; Pönkä, A.; Poussa, T.; Korpela, R.; and Meurman, J. H. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus GG*, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Res. 35 (2001): 412-420.

National committee for clinical laboratory standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. 27(2007): 64-68, 130-132.

Nikawa, H.; Makihira, S.; Fukushima, H.; Nishimura, H.; Ozaki, Y.; Ishida, K.; Darmawan, S.; Hamada, T.; Hara, K.; Matsumoo, A.; Takemoto, T.; and Aimi, R. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. Int J Food Microbiol. 95 (2004): 219-223.

Perch, B.; Kjems, E.; and Ravn, T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 82 (1974): 357-370.

Petti, S. I.; Tarsitani, G.; and D'Arca, A. S. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. Arch Oral Biol. 46 (2001): 705-712.

Senok, A. C.; Ismaeel, A. Y.; and Botta, G. A. Probiotics: facts and myths. Clin Microbiol Infect. 11 (2005): 958-966.

Silva, M.; Jacobus N. V.; Deneke, C.; and Gorbach, S. L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrob Agents Chemother. 31 (1987): 1231-1233.

Sookkhee, S.; Chulasiri, M.; and Prachyabrued, W. *Lactic acid bacteria* from healthy oral cavity of thai volunteers: inhibition of pathogens. J Appl Microbiol. 90 (2001): 172-179.

Soomro, A.H.; Masud T.; and Anwaar, K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. Pak J Nutr. 1 (2002): 20-24.

Turkun, M.; Ozata, F.; Uzer, E.: and Ates, M. Antimicrobial substantivity of cavity disinfectants. Gen Dent. 53 (2005): 182-186.

Vermeersch, G.; Leloup, G.; Delmee, M.; and Vreven, J. Antibacterial activity of glass–ionomer cements, compomers and resin composites: relationship between acidity and material setting phase. J Oral Rehabil. 32 (2005): 368-374.

Wei, H.; Loimaranta, V.; Tenovuo, J.; Rokka, S.; Syväoja, E.L.; Korhonen, H.; Joutsjoki, V.; and Marnila, P. Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* strain GG or treated at ultra-high temperature. Oral Microbiol Immunol. 17 (2002): 9-15.

Weiss, M. E. and Bibby B. G. Effect of milk on enamel solubility. Arch Oral Biol. 11 (1966): 49-57.

Whiley, R. A. and Beighton, D. Current classification of oral streptococci. Oral Microbiol Immunol. 13 (1998): 195-216.

Zaazou, M.H.; Abu El-Yazeed, M.; Galal, M.; Abd Elrahman, M.; and Mehanna. N.S. A study of the effect of probiotic bacteria on level of *Streptococcus mutans* in rats. Appl Sci Res. 3 (2007): 1835-1841.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบความถูกต้องของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดลองเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องด้วยการศึกษาลักษณะรูปร่างของจุลินทรีย์ โดยย้อมแกรมแล้วนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบด้วยการดูรูปร่างลักษณะและสีของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น รวมทั้งผ่านการตรวจสอบจากผู้เชี่ยวชาญทางด้านจุลินทรีย์

การตรวจสอบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (Murray และคณะ, 1995)

การตรวจสอบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์มีหลายวิธี เช่น วิธีที่หนึ่งคือ เปรียบเทียบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์จากความขุ่นของสารมาตราฐานแมคฟาแลนด์ (McFarland standard) ซึ่งสารมาตราฐานแมคฟาแลนด์ 0.5 จะมีความหนาแน่นของเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 150 x 10^6 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร วิธีนี้บอกจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โดยประมาณ วิธีที่สองคือ การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยตรง (direct count) โดยหยดเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ภายในพื้นที่ 1 ตาราง-เซนติเมตรของแผ่นสไลด์ แล้วจึงนับเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึงและย้อมสี วิธีนี้ทำได้รวดเร็ว ง่าย และไม่เสียค่าใช้จ่ายสูง แต่เป็นการนับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิตรวมกัน (total count) วิธีที่สามคือ การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น (dilution plate count) โดยทั่วไปจะเลือกนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25–250 โคโลนี เพื่อให้ได้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว จึงต้องเจือจางเชื้อเริ่มต้นเป็นลำดับแล้วนำเชื้อที่ระดับการเจือจางต่างๆ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น เพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มาคำนวณค่าซีเอฟยู/มิลลิลิตร วิธีนี้เป็นการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable count)

การปรับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

การทดลองนี้มีการปรับปริมาณเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ในกลุ่มเชื้อสเตรปโตคอคไค และในกลุ่มเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มีจำนวนเท่ากับ 1×10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร และ 1×10^6 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าเชื้อแต่ละชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงไม่เท่ากัน จึงมีการปรับปริมาณเชื้อแสดงผล ดังนี้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณเชื้อแต่ละชนิด

Bacteria	Optical density (600 nm)	Concentration (CFU/ml)
Streptococci		
S. mutans ATCC25175	0.60	1×10^8
S. mutans Ingbritt	0.60	1×10^8
S. mutans TPF-1	0.70	1×10^8
S. sobrinus B13	0.96	1×10^8
S. sobrinus 6715	0.90	1×10^8
Lactic acid bacteria		
S. thermophilus	0.47	1×10^6
L. delbrueckii	0.35	1×10^6
L. bulgaricus	0.50	1×10^6
L. rhamnosus *	0.55*	2×10^6

* นำไปเจือจางเป็น 2 เท่าด้วย MRS broth ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 1×10^6 CFU/ml

ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบ

ความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค [เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น (มิลลิเมตร)]

ตารางที่ 4 ผลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

Streptococci	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Mean	SD
S. mutans ATCC25175	9.18	9.24	9.37	9.25	9.29	9.27	0.07
S. mutans Ingbritt	5.99	5.92	5.98	5.95	5.90	5.95	0.04
S. mutans TPF-1	5.93	6.01	5.97	6.04	6.00	5.99	0.04
S. sobrinus B13	5.99	5.94	6.03	5.93	6.02	5.98	0.05
S. sobrinus 6715	6.03	6.03	5.97	5.95	6.06	6.01	0.05

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

Streptococci	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Mean	SD
S. mutans ATCC25175	6.03	5.96	5.93	5.97	6.06	5.99	0.06
S. mutans Ingbritt	5.97	6.02	5.97	6.02	6.03	6.00	0.03
S. mutans TPF-1	5.94	5.95	5.97	5.96	5.99	5.96	0.02
S. sobrinus B13	9.05	9.24	9.14	8.90	9.03	9.07	0.13
S. sobrinus 6715	6.00	6.00	6.02	5.98	5.99	6.00	0.02

ตารางที่ 6 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

Streptococci	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Mean	SD
S. mutans ATCC25175	5.95	6.03	5.97	5.98	5.93	5.97	0.04
S. mutans Ingbritt	10.64	10.84	10.70	10.72	10.69	10.72	0.08
S. mutans TPF-1	9.56	9.45	9.65	9.66	9.58	9.58	0.09
S. sobrinus B13	10.79	10.79	10.74	10.69	10.78	10.76	0.04
S. sobrinus 6715	5.97	5.98	5.95	5.99	5.93	5.96	0.03

ตารางที่ 7 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

Streptococci	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Mean	SD
S. mutans ATCC25175	5.94	6.06	5.93	5.94	5.97	5.97	0.06
S. mutans Ingbritt	6.01	5.92	5.98	5.92	5.94	5.95	0.04
S. mutans TPF-1	6.01	6.00	5.95	6.02	5.95	5.99	0.03
S. sobrinus B13	5.91	5.93	5.99	5.96	6.00	5.96	0.04
S. sobrinus 6715	5.98	5.95	5.99	6.09	6.01	6.01	0.05

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 13.0

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ และเชื้อแลคโต-บาซิลลัส บัลแกริคัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13

Tests of Normality

	Lactobacillus	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Inhibit LAB	*L. delbrueckii*	.986	5	.964
	L. bulgaricus	.825	5	.126

Descriptive statistics

	Lactobacillus	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Inhibit LAB	*L. delbrueckii*	5	9.0720	.12716	.05687
	L. bulgaricus	5	10.7580	.04324	.01934

Independent Samples Test

Inhibit LAB	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Diff.	Std. Error Diff.	95% Confidence Interval of the Diff.	
								Lower Bound	Upper Bound
Equal variances assumed	3.320	.106	-28.069	8	.000	-1.68600	.06007	-1.82451	-1.54749
Equal variances not assumed			-28.069	4.913	.000	-1.68600	.06007	-1.84123	-1.53077

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ Ingbritt TPF-1 และเชื้อสเตรป-โตคอคคัส โซไบรนัส สายพันธุ์ B13

Tests of Normality

	Streptococci	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Inhibit LAB	*S. mutans* TPF-1	.910	5	.466
	S. mutans Ingbritt	.890	5	.356
	S. sobrinus B13	.825	5	.126

Descriptive statistics

Streptococci	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
					Lower Bound	Upper Bound		
S. mutans TPF-1	5	9.5800	.08456	.03782	9.4750	9.6850	9.45	9.66
S. mutans Ingbritt	5	10.7180	.07430	.03323	10.6257	10.8103	10.6	10.8
S. sobrinus B13	5	10.7580	.04324	.01934	10.7043	10.8117	10.7	10.8
Total	15	10.3520	.56896	.14691	10.0369	10.6671	9.45	10.8

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.453	2	12	.646

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.474	2	2.237	461.542	.000
Within Groups	.058	12	.005		
Total	4.532	14			

Multiple Comparisons

	Streptococci (I)	Streptococci (J)	Mean Diff. (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	*S. mutans* TPF-1	*S. mutans* Ingbritt	-1.13800(*)	.04403	.000	-1.2555	-1.0205
		S. sobrinus B13	-1.17800(*)	.04403	.000	-1.2955	-1.0605
	S. mutans Ingbritt	*S. mutans* TPF-1	1.13800(*)	.04403	.000	1.0205	1.2555
		S. sobrinus B13	-.04000	.04403	.645	-.1575	.0775
	S. sobrinus B13	*S. mutans* TPF-1	1.17800(*)	.04403	.000	1.0605	1.2955
		S. mutans Ingbritt	.04000	.04403	.645	-.0775	.1575
Scheffe	*S. mutans* TPF-1	*S. mutans* Ingbritt	-1.13800(*)	.04403	.000	-1.2607	-1.0153
		S. sobrinus B13	-1.17800(*)	.04403	.000	-1.3007	-1.0553
	S. mutans Ingbritt	*S. mutans* TPF-1	1.13800(*)	.04403	.000	1.0153	1.2607
		S. sobrinus B13	-.04000	.04403	.671	-.1627	.0827
	S. sobrinus B13	*S. mutans* TPF-1	1.17800(*)	.04403	.000	1.0553	1.3007
		S. mutans Ingbritt	.04000	.04403	.671	-.0827	.1627
Bonferroni	*S. mutans* TPF-1	*S. mutans* Ingbritt	-1.13800(*)	.04403	.000	-1.2604	-1.0156
		S. sobrinus B13	-1.17800(*)	.04403	.000	-1.3004	-1.0556
	S. mutans Ingbritt	*S. mutans* TPF-1	1.13800(*)	.04403	.000	1.0156	1.2604
		S. sobrinus B13	-.04000	.04403	1.000	-.1624	.0824
	S. sobrinus B13	*S. mutans* TPF-1	1.17800(*)	.04403	.000	1.0556	1.3004
		S. mutans Ingbritt	.04000	.04403	1.000	-.0824	.1624

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

	Streptococci	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Tukey HSD(a)	S. mutans TPF-1	5	9.5800	
	S. mutans Ingbritt	5		10.7180
	S. sobrinus B13	5		10.7580
	Sig.		1.000	.645
Scheffe(a)	S. mutans TPF-1	5	9.5800	
	S. mutans Ingbritt	5		10.7180
	S. sobrinus B13	5		10.7580
	Sig.		1.000	.671

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

ภาคผนวก ง

การทดสอบความเที่ยงตรงของการวัด

การทดสอบความแม่นยำของวิธีการวัด โดยการวิเคราะห์หาความแตกต่างของการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น ซ้ำ 2 ครั้งในวันเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยสถิติ pair t-test พบว่าวัดครั้งที่ 1 และ 2 มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวก โดยมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 1 และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความแตกต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้นเมื่อวัดซ้ำ

Tests of Normality

	Group of well	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
วัดครั้งที่ 1	1. negative control	.947	25	.212
	2. positive contol (*S. mutans* ATCC25175)	.978	5	.924
	3. positive control (*S. sobrinus* B13)	.936	10	.508
	4. positive control (*S. mutans* Ingbritt)	.895	5	.381
	5. positive control (*S. mutans* TPF-1)	.981	5	.941
	6. *S. thermophilus* & *S. mutans* ATCC25175	.933	15	.303
	7. *L. delbrueckii* & *S. sobrinus* B13	.900	15	.094
	8. *L. bulgaricus* & *S. sobrinus* B13	.904	15	.110
	9. *L. bulgaricus* & *S. mutans* Ingbritt	.907	15	.123
	10. *L. bulgaricus* & *S. mutans* TPF-1	.894	15	.078
วัดครั้งที่ 2	1. negative control	.957	25	.358
	2. positive contol (*S. mutans* ATCC25175)	.989	5	.976
	3. positive control (*S. sobrinus* B13)	.860	10	.076
	4. positive control (*S. mutans* Ingbritt)	.914	5	.492
	5. positive control (*S. mutans* TPF-1)	.942	5	.678
	6. *S. thermophilus* & *S. mutans* ATCC25175	.899	15	.091
	7. *L. delbrueckii* & *S. sobrinus* B13	.936	15	.337
	8. *L. bulgaricus* & *S. sobrinus* B13	.901	15	.100
	9. *L. bulgaricus* & *S. mutans* Ingbritt	.951	15	.548
	10. *L. bulgaricus* & *S. mutans* TPF-1	.895	15	.079

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair	วัดครั้งที่ 1 & วัดครั้งที่ 2	125	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Diff. Lower Bound	95% Confidence Interval of the Diff. Upper Bound			
Pair	วัดครั้งที่ 1-วัดครั้งที่ 2	.00200	.04145	.00371	-.00534	.00934	.540	124	.590

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว เบญจวรรณ เลิศปันณะพงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 14 มิถุนายน พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีพ.ศ. 2545 และบรรจุทำงานเข้ารับราชการที่วิทยาลัยสาธารณสุข-สิรินธร จังหวัดชลบุรี ใช้ทุนเป็นระยะเวลา 3 ปี ในปีการศึกษา 2548 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตและวุฒิบัตร สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปัจจุบันทำงานในคลินิกเอกชน