นิพนธ์ต้นฉบับ

การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่มีผลยับยั้ง β-hemolytic *Escherichia coli* จากลูกสุกรท้องร่วง

ธารหทัย มาลาเวช[1] ดวงพร คันธโชติ[2] และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล[3]

Abstract

Malawach, T., Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W.

Selection of probiotic lactic acid bacteria able to inhibit β-hemolytic *Escherichia coli* isolated from diarrheal piglets

Songklanakarin J. Sci. Technol., May 2007, Suppl 2 : 269-279

A total of 306 isolates of lactic acid bacteria were isolated from 250 samples of piglet faeces. The strains were investigated for preliminary probiotic properties based on their stability in bile salts (0.30%) and high acidity (pH 3.0). Ability to utilize protein, fat and starch, growth in the absence of vitamin B12 and growth with both aerobic and anaerobic conditions were also considered. As a result of above criteria, 20 isolates were selected. Using an agar spot method, all isolates were able to inhibit β-hemolytic *Escherichia coli* 240/2 under aerobic and anaerobic condition. A further investigation using a co-culture technique showed that only six isolates inhibited β-hemolytic *E. coli* 240/2, *E. coli* K88 and *E. coli* K 99 by more than 90 percent. The selected isolates were resistant to the following antibiotics: amikacin, polymyxin B and nalidixic acid; however the strains were susceptible to erythromycin and chloramphenicol. All six active isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* by API 50 CH system.

Key words : lactic acid bacteria, probiotic, *Escherichia coli*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla, 90112 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาจุลชีววิทยา [2]Ph.D. (Soil Science) รองศาสตราจารย์ [3]วท.ม. (จุลชีววิทยา) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: wilawan.c@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2549 รับลงพิมพ์ 29 พฤศจิกายน 2549

บทคัดย่อ

ธารหทัย มาลาเวช ดวงพร คันธโชติ และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล

การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่มีผลยับยั้ง β-hemolytic *Escherichia coli* จากลูกสุกรท้องร่วง

ว. สงขลานครินทร์ วทท. พฤษภาคม 2550 ฉบับพิเศษ 2 : 269-279

การแยกแบคทีเรียแลกติกจากมูลสุกรจำนวน 250 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 306 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ การทนเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 0.30% การทนกรดที่ระดับพีเอช 3 การเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามิน B12 และความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติดังกล่าวได้ 20 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้ง β-hemolytic *Escherichia coli* 240/2 โดยวิธี agar spot พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลทสามารถยับยั้ง β-hemolytic *E. coli* 240/2 ได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน และเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ β-hemolytic *E. coli* 240/2 *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 มากกว่า 90% แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทดื้อต่อสารปฏิชีวนะ amikacin, polymyxin B และ nalidixic acid แต่ไวต่อ erythromycin และ chloramphenicol และเมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CH พบว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ เป็น *Lactobacillus plantarum*

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการผลิตสุกร ในแต่ละปีมีการผลิตสุกรได้ประมาณ 10 ล้านตัว โดยแหล่งที่เลี้ยงสุกรหลักของประเทศอยู่ในเขตภาคกลางและภาคตะวันออก ในจังหวัดราชบุรี นครปฐม ฉะเชิงเทรา และชลบุรี การผลิตสุกรส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ (ประมาณ 98-99%) การส่งออกยังมีน้อยมาก และจำกัดอยู่ในแถบเอเชีย เช่น ฮ่องกง ทั้งที่ยังมีประเทศผู้นำเข้าที่สำคัญอีกหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น รัสเซีย และสิงคโปร์ ดังนั้นจึงมีการส่งเสริมการเลี้ยงสุกรเป็นอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นเพื่อรองรับตลาดโลก แต่การผลิตสุกรแรกเกิดให้ได้จำนวนมาก และเหลือเมื่อหย่านมในอัตราสูง ซึ่งอย่างน้อยต้องได้ลูกหย่านมโดยเฉลี่ยแม่ละ 22 ตัว/ปีขึ้นไปจึงจะทำให้กิจการฟาร์มอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสามารถดำเนินกิจการไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ กระทำได้ไม่ง่ายนักเพราะมีปัญหามากมายที่ขัดขวางการผลิตจนไม่สามารถบรรลุเป้าหมายที่วางไว้ ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตไม่บรรลุเป้าหมาย ได้แก่ โรคท้องร่วงในลูกสุกรตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งหย่านมที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Escherichia coli* เนื่องจากสุกรขนาดเล็กมีโอกาสเป็นโรคง่ายกว่าสุกรขนาดใหญ่ เพราะความต้านทานต่อการติดเชื้อต่ำ ระบบการย่อยและการดูดซึมอาหารยังทำงานไม่ได้เต็มที่ โรคท้องเสียบางชนิดแม้มีอัตราการตายไม่สูงนัก แต่ความสำคัญทางเศรษฐกิจนั้นมีมาก ทั้งนี้เพราะสุกรป่วยจะซูบผอม แคระแกร็น อัตราการเจริญเติบโตลดลง และบางตัวอาจถึงตายได้ ทำให้ผู้เลี้ยงสิ้นเปลืองค่าอาหาร เวชภัณฑ์ แรงงาน และค่าใช้จ่ายอื่นๆ เพิ่มขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตลูกสุกรหย่านมสูงขึ้น (ถวัลย์, 2536) ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการป้องกัน และการรักษามีมากขึ้น นอกจากนี้ยังได้นำยาปฏิชีวนะมาเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตและควบคุมโรคในอาหารสัตว์ (antibiotic growth promotor, AGP) จึงมีการนำเข้าของผลิตภัณฑ์ AGP เป็นมูลค่าสูง และในช่วงที่ผ่านมามีการมุ่งเน้นการใช้ยาปฏิชีวนะจนกระทั่งละเลยการเอาใจใส่ แก้ไขสภาพการจัดการควบคู่กันไป หรือการใช้ยาไม่ถูกวิธีในการใช้ยาเสริมในอาหารเป็นปริมาณที่มากและระยะเวลานานตั้งแต่สุกรเล็กจนกระทั่งถึงสุกรขุน ก่อให้เกิดเชื้อโรคดื้อยา ยาที่ใช้เริ่มไม่ได้ผลอีกต่อไป ต้องมีการเปลี่ยนชนิดยา ซึ่งเป็นการเพิ่มภาระต้นทุนแก่เกษตรกรผู้เลี้ยง (ธนาคาร และคณะ, 2545) นอกจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นแล้ว ยังพบปัญหาสารตกค้างของสารเคมีและยาที่นำมาใช้ (สำนักงานกรรมการอาหารและยา, 2545) การใช้ยาปฏิชีวนะในการ

เลี้ยงสัตว์จึงเริ่มเป็นที่รังเกียจและต้องห้ามในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศที่พัฒนาแล้ว ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์กลายเป็นประเด็นทางการค้าที่ประเทศคู่ค้าจำต้องปฏิบัติตาม ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาใช้เสริมในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงและเพิ่มภูมิต้านทานแก่สัตว์ จึงเป็นแนวทางที่มีผู้สนใจศึกษากันมาก โปรไบโอติก (Probiotic) คือจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (Kontula, 1998) สำหรับประเทศไทยได้มีการประกาศใช้โปรไบโอติกไว้ในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยใช้ชื่อเรียกว่า สารเสริมชีวนะ (ศรีสุข, 2540) การที่ประเทศไทยประกาศใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ทำให้ต่างประเทศมั่นใจในคุณภาพเนื้อสัตว์ที่ส่งออกมากขึ้น (วิเชียร, 2541)

การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากมูลสุกรที่มีสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกและมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ β-hemolytic *E. coli* สาเหตุโรคท้องร่วงในลูกสุกร เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพแก่สุกรต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากมูลสุกร

เก็บมูลสุกรที่สดใหม่จากลูกสุกรสุขภาพปกติในแหล่งต่างๆ จำนวน 250 ตัว ได้แก่ ฟาร์มสุกรจังหวัดตรัง 100 ตัว ฟาร์มของสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 80 ตัว และจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา จำนวน 70 ตัว นำตัวอย่างมูลสุกรมา streak บนอาหารแข็ง MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตและเกลือน้ำดี 0.2% จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีสร้างกรดโดยเกิดวงใสรอบโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์แล้วย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกจะติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมหรือแท่ง การสร้างเอนไซม์คะตาเลส ให้ผลลบ (Axelsson, 1993) จากนั้นเก็บเชื้อใน MRS agar แล้วเก็บไว้ที่ 4°C

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไปทดสอบสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ดังนี้

2.1 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี (Toit, 1998)

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มา streak ลงบน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.30% (w/v) oxgall (Difco) บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

2.2 ความสามารถในการทนกรด (Toit, 1998)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS broth ที่มีปริมาตร 6 มล. ปรับ พีเอช ให้ได้เท่ากับ 3, 4, 5 และ 6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 นาโนเมตร

2.3 การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหารเหลว MRS broth แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ใส่ใน anaerobic jar พร้อม Gas Pak Anaerobic system (BBL) แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชุดที่ 2 นำไปบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญทั้งสองสภาวะ

2.4 ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามิน B12

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน vitamin B12

assay medium ของ Difco ปริมาตร 3 มล. บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นแสง 580 นาโนเมตร

2.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง (Michael and Pelezar, 1995)

นำแบคทีเรียแลกติกมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ milk agar 1% tributyrin และ starch agar นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีบนอาหาร milk agar ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีบนอาหาร 1% tributyrin และทดสอบการย่อยแป้งโดยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร starch agar ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

3. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ β-hemolytic *Escherichia coli*

3.1 การทดสอบการสร้าง β-haemolysin ของเชื้อ *E. coli*

นำ *E. coli* ที่แยกจากมูลสุกร จำนวน 60 สายพันธุ์ (Phongpaichit *et al.*, 2007) มาทดสอบการสร้าง β-hemolysin โดยนำ *E. coli* มา streak บนอาหาร blood agar บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือก *E. coli* ที่สร้าง β-hemolysin โดยเกิดวงใสรอบรอย streak ไว้ทดสอบต่อไป

3.2 การทดสอบการยับยั้งโดยใช้ agar spot method (Spellhaug and Harlander, 1989)

โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth จนมีอายุ 18 ชั่วโมง แล้วปรับให้มีจำนวน 10^7 CFU/ml หยดลงบนอาหารแข็ง MRS agar ไอโซเลทละ 5 ไมโครลิตร แต่ละไอโซเลทห่างกัน 3 ซม. จานละ 4 ไอโซเลท บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเททับด้วย BHI soft agar ที่มีวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มล. ซึ่งมี *E. coli* 10^6 CFU/ml ผสมอยู่ แล้วนำไปบ่มในสภาพ aerobic และใน anaerobic jar พร้อม Gas Pak Anaerobic system (BBL) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูผลการยับยั้งโดยวัดขนาดวงใสการยับยั้ง คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีไปทดสอบการยับยั้งโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน

3.3 การทดสอบการยับยั้งโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Gonzalez, 1993)

นำ β-hemolytic *E. coli* จากข้อ 3.1 และแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงในสุกรสายพันธุ์เปรียบเทียบ *E. coli* K 88 และ K99 ที่เลี้ยงใน MRS broth ปรับให้มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^4 CFU/ml และนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชั่วโมง แล้วทำการปรับให้มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^7 CFU/ml นำแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ๆ ละ 2 มล.มาเพาะเลี้ยงร่วมกัน ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติก หลังจากนั้นบ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำชุดการทดสอบ และชุดควบคุมมาตรวจนับจำนวน *E. coli* ด้วยวิธี pour plate ความเจือจางละ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mac Conkey agar (Difco, USA) หาร้อยละการยับยั้งโดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{CFU/ml in control}) - (\text{CFU/ml in associative culture})}{\text{CFU/ml in control}} \times 100$$

4. ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ (Charteris *et al.*, 1998)

ใช้ไม้พันสำลี ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่ความสามารถในการยับยั้ง β-hemolytic *E. coli* *E. coli* K 88 และ K99 ได้มากกว่าร้อยละ 90 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth ปรับให้มีความขุ่น 0.5 McFarland ให้มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/ml นำไปป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง MRS agar แล้วปล่อยให้แห้ง 3-5 นาที จากนั้นวางแผ่นสารปฏิชีวนะ จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ amoxycillin (30 μg) amikacin (30 μg) ampicillim (10 μg) penicillin G (10 μg) norfloxacin (10 μg) tetracycline (30 μg) chloramphenicol (30 μg) erythromycin (15 μg) gentamicin (10 μg) streptomycin (10 μg) polymycin B (300 μg) vancomycin (30 μg) nalidixic acid (30 μg) และ kanamycin (30 μg) มาวางบริเวณที่ป้ายแบคทีเรียไว้ บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์

กลางของวงใส (inhibition zone) มีหน่วยเป็นมม. แล้วนำผลที่ได้มาแปลผล ตาม Charteris และคณะ (1998) เช่นต้านต่อยาถ้ามีวงใสการยับยั้งเท่ากับหรือน้อยกว่า 19 มม. สำหรับ penicillin G 14 มม. สำหรับ vancomycin และ tetracycline 13 มม. สำหรับ kanamycin, chloramphenicol และ erythromycin

5. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CH (bioMerieux, France) โดยเขี่ยแบคทีเรียแลกติก 2-3 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ปรับความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland ถ่ายเชื้อที่เตรียมลงในหลอดบน API 50 Strip และหยดทับด้วย mineral oil ปลอดเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลหลังการบ่มที่ 24-48 ชั่วโมง โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ แปลผลโดยโปรแกรม API 50 CHL V 5.0 (bioMerieux, France)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากมูลลูกสุกรในแหล่งต่างๆ จำนวน 250 ตัว สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 306 ไอโซเลท นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ไปทดสอบสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการตามลำดับ ดังนี้คือ การอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารสุกร โดยการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30% พบว่าทนเกลือน้ำดีได้จำนวน 289 ไอโซเลท คิดเป็น 94.44% ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้ซึ่งความสามารถในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกระหว่างการเดินทางมายังทางเดินอาหารนั้นขึ้นกับความทนทานต่อน้ำดี (Gilliland *et al.*, 1984) เพราะน้ำดีเป็นสารอันตรายต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี (Jin *et al.*, 1998; Erkkila and Petaja, 2000) ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีจึงมีความสำคัญสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Kociubinski *et al.*, 1999) ถึงแม้ว่ากลไกความทนทานต่อน้ำดีของ Lactobacilli จะไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก แต่น่าจะเนื่องมาจากผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันน้ำดี จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายน้ำดีได้โดยเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส (bile salt hydrolase, BSH) ซึ่งช่วยลดความสามารถในการละลายของน้ำดี และทำให้การทำงานอ่อนฤทธิ์ลง (Erkkila and Petaja, 2000) แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ซึ่งรวมถึง Lactobacillus พบว่ามีกิจกรรมของ BSH (Gilliland, 1977)

ปัจจัยอีกประการหนึ่งในการควบคุมจำนวนและชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร คือความเป็นกรดในกระเพาะ ดังนั้นการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อเสริมการเจริญ ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรด ตลอดจนต้องสามารถมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Conway *et al.*, 1987) ซึ่งระดับพีเอชของลูกสุกรที่กำลังกินนมอายุ 10-60 วันจะอยู่ระหว่าง 3.46±0.23 - 5.02±0.34 (Kidder and Manners, 1978) จึงนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 289 ไอโซเลท ซึ่งคัดเลือกได้มาทดสอบสมบัติการทนต่อกรดที่ระดับ pH 3, 4, 5 และ 6 พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 146 ไอโซเลท คิดเป็น 50.52% ของจำนวนไอโซเลท ที่ทดสอบสามารถทนต่อพีเอช 4 (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตรมากกว่า 0.2) เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 146 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน เพื่อความสะดวกในการผลิตเชื้อจำนวนมาก รวมถึงการเก็บรักษาเชื้อและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อความจำเป็นในการนำไปใช้ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright, 1993) พบว่าแบคทีเรียแลกติกจำนวน 146 ไอโซเลท คิดเป็น 100% ของจำนวนไอโซเลทที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ (ทุกไอโซเลทมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตรมากกว่า 1.0) และเมื่อนำมาทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 พบว่ามีจำนวน 110 ไอโซเลท สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตรมากกว่า 1.0) ซึ่งวิตามินนี้เป็นสารที่มีความสำคัญในการเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นในการคัดเลือกโปรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารจึงต้องแน่ใจว่าแบคทีเรียดังกล่าวต้องไม่แย่งวิตามินบี 12 ในระบบทางเดินอาหารของสุกรซึ่งอาจทำให้สุกรขาดสารอาหารได้ และเมื่อนำมาทดสอบ

Table 1. Preliminary properties for selection of probiotic lactic acid bacteria.

Properties	Number of strains tested	Number of strains selected
Stability in bile salt (0.3%)	306	289
Stability at low pH	289	146
Growth aerobically and anaerobically	146	146
Ability to grow without vitamin B12	146	110
Utilization of protein, fat and starch	110	20

การย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าสามารถย่อยทั้งโปรตีน ไขมัน และแป้งได้จำนวน 20 ไอโซเลท คิดเป็น 18.18% ของจำนวนไอโซเลทที่ทดสอบ (Table 1) การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง จะช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหารทำให้สามารถดูดซึมอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วยิ่งขึ้น

จาก *E. coli* 60 สายพันธุ์ที่แยกจากมูลสุกร (Pongpaichit *et al.*, 2007) เมื่อนำมาทดสอบการสร้าง β- hemolytic บนอาหาร blood agar พบว่าเป็น β-hemolytic *E. coli* เพียง 1 สายพันธุ์ ได้แก่ β-hemolytic *E. coli* 240/2 จึงนำ *E. coli* ดังกล่าวมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 20 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อทดสอบโดยวิธี Agar spot พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้ง β-haemolytic *E. coli* 240/2 ได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยพบว่าสามารถยับยั้งในสภาพที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Figure 1) และเมื่อทดสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 6 ไอโซเลท ได้แก่ L74, L124, L125, L134, L164 และ L281 สามารถยับยั้ง β-hemolytic *E. coli* 240/2, *E. coli* K 88 และ *E. coli* K99 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 90% (Figure 2) ในขณะที่ Bloomberg และคณะ (1993) พบว่า *L. plantarum* 104R ซึ่งแยกจากกระเพาะสุกร สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* K 88 บนเยื่อเมือกลำไส้เล็กส่วน ileum ของลูกสุกรได้คิดเป็น 50% และ Chin Tsai และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกจากสุกรและสัตว์ปีก จำนวน 31 และ 15 สายพันธุ์ ตามลำดับ พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ LAP 5 และ LF 33 ซึ่งแยกได้จากลำไส้สุกรและสัตว์ปีก ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง สมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยป้องกันการบุกรุกหรือการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อโรคต่าง ๆ การแบ่งตัวแพร่พันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้จะไปขัดขวางกลไกการทำงานของเนื้อเยื่อภายในร่างกายสัตว์ แย่งดูดซึมอาหารจากสัตว์ และสร้างสารพิษหรือน้ำย่อยที่สามารถทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ควรมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งนอกจากจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคติดเชื้อในสัตว์แล้ว ยังสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาใช้ในระดับการรักษาโรคติดเชื้อได้ สาเหตุที่แบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งการจริญของแบคทีเรียอื่นได้นั้น มีผู้ศึกษาถึงสารที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น พอสรุปเป็น 3 ประการ คือ ประการแรกการยับยั้งการเจริญเกิดจากแบคทีเรียแลกติกสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก หรือกรดอะซิติก มีผลทำให้ระดับความเป็นกรดเป็นด่างลดลงไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด (Garriga *et al.*, 1998) หรือประการที่สองเชื้ออาจใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียสามารถทำลายโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลกรดนิวคลีอิคและโปรตีน นอกจากนี้การยับยั้งยังอาจเกิดจากผลร่วมกันระหว่างกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Collins and Aramaki, 1980 และ Talon *et al.*, 1980) และสาเหตุประการสุดท้ายเนื่องจากการสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นในกลุ่มที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ที่ผลิตสารนี้ บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Barefoot and Klaenharmmer, 1983; Gonzalez *et al.*, 1994) ทั้งนี้แม้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สร้างแบคเทอริโอซินได้ แต่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น ดังนั้นสารยับยั้งพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นจึงมี

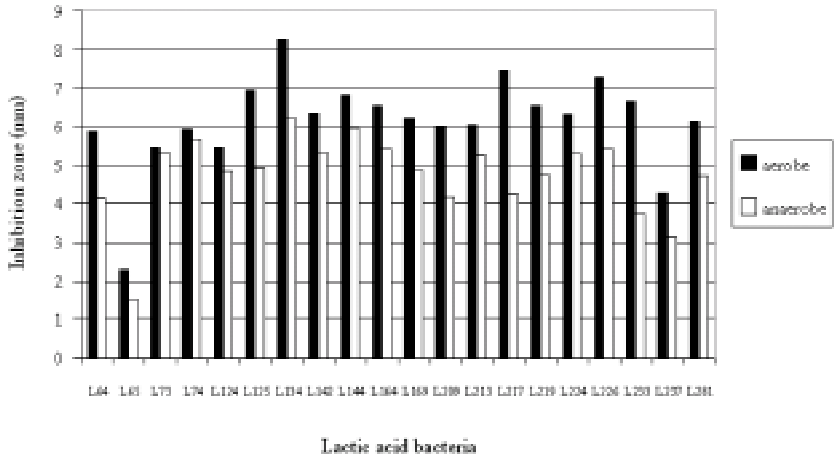

Figure 1. Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on *Escherichia coli* 240/2 by agar spot test.

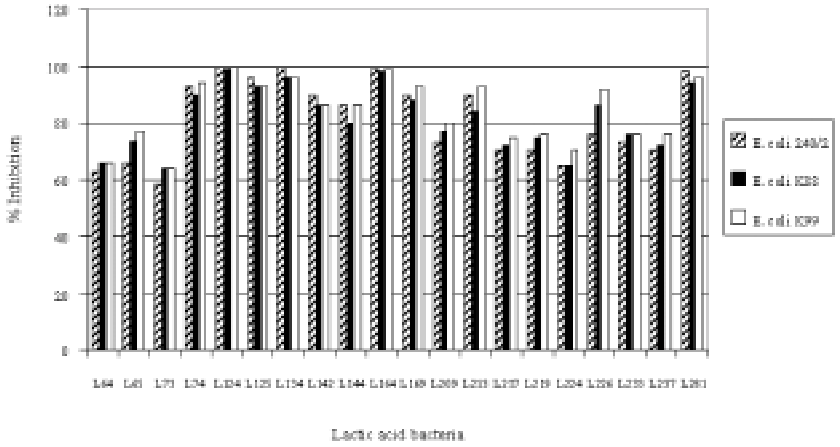

Figure 2. Inhibition percentage of selected lactic acid bacteria on *Escherichia coli* 240/2, *E. coli* 88 *E. coli* 99 after 6 hrs of incubation of associative cultures in MRS broth at 37°C.

ความสำคัญมากกว่าเนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งได้กว้างกว่าโดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค (Ogawa *et al.*, 2001) และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรไบโอติก (Saarela *et al.*, 2000)

การใช้สารปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์มักเกิดปัญหาขึ้นเนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินกว่าที่กำหนด การใช้นานเกินโดยไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อดื้อยาที่ใช้บางชนิด โดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคนจึงทำให้เกิดปัญหาการรักษาในภายหลัง ทำให้ลักษณะการดื้อยาของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่น่าเป็นห่วงมากในการรักษาโรคติดเชื้อ แต่สำหรับแบคทีเรียแลกติกพวกแลกโตบาซิลลัสแม้มีการดื้อยาโดยธรรมชาติอย่างกว้างขวางแต่การดื้อยาส่วนใหญ่ของแลกโตบาซิลลัสไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ นอกจากนี้พลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาก็พบได้ยากในแลกโตบาซิลลัส (Saarela *et al.*, 2000) ดังนั้นการนำแบคทีเรียแลกติกมาเสริมในอาหารเพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ สำหรับรูปแบบการดื้อยาของแลกโตบาซิลลัสแต่ละ

Table 2. Antibiotic susceptibility of selected lactic acid bacteria isolated from piglet faeces.

Antibiotics	Isolates of lactic acid bacteria					
	L74	L124	L125	L134	L164	L281
Ampicillin (10µg)	S	S	R	S	S	S
Amikacin (30µg)	R	R	R	R	R	R
Amoxycillin (30µg)	S	S	S	S	MS	R
Chloramphenicol (30µg)	S	S	S	S	S	S
Erythromycin (15µg)	S	S	S	S	S	S
Gentamicin (10µg)	MS	MS	MS	R	R	MS
Kanamycin (30µg)	MS	MS	MS	R	R	S
Nalidixic acid (30µg)	R	R	R	R	R	R
Norfloxacin (10µg)	R	R	R	R	S	R
Penicillin G (10µg)	MS	MS	MS	S	S	MS
Polymyxin B (300µg)	R	R	R	R	R	R
Streptomycin (10µg)	MS	R	MS	R	R	R
Tetracycline (30µg)	S	R	S	R	R	S
Vancomycin (30µg)	S	R	S	R	R	S

Results were interpreted according to the cut-off levels proposed by Charteris *et al.* (1998).
R : Resistant MS : Moderately Susceptible S : Susceptible

Table 3. Identification of selected lactic acid bacteria from piglet faeces by API 50 CH system (bioMerieux, France).

Strain designation	Source	Genus and species	% Similarity
L74	Pig farm in Rajamangala Institute of Technology, Nakorn Si Thammarat Campus	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L124	Pig farm in Prince of Songkla University, Hat Yai Campus	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L125	Pig farm in Prince of Songkla University, Hat Yai Campus	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L134	Pig farm in Prince of Songkla University, Hat Yai Campus	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L164	Pig farm in Prince of Songkla University, Hat Yai Campus	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L281	Pig farm in Trang Province	*Lactobacillus plantarum*	99.9

ชนิดมีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ร่วมกับสารปฏิชีวนะในการรักษาโรค (Charteris *et al.*, 1998) และการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในอาหารสัตว์ก็เป็นสมบัติอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก (Havenaar *et al.*, 1992; Nousiainen and Stela, 1998) ซึ่งจากการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก จำนวน 6 ไอโซเลทที่

คัดเลือกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion ตามวิธีของ Charteris และคณะ (1998) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ไวต่อสารปฏิชีวนะ erythromycin และ chloramphinicol และดื้อต่อสารปฏิชีวนะ amikacin, polymycin B และ nalidixic acid (Table 2)

ชนิดของ *Lactobacillus* ในระบบทางเดินอาหารสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (Gilliland *et al.*, 1975) *Lactobacillus* ที่มักพบในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *L. acidophilus, L.bifidus, L. casei, L. fermentum* และ *L. plantarum* (Gilliland, 1979) เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 ไอโซเลท ที่มีสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CH (Biomerieux, France) พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซนต์คล้ายคลึง 99.9% ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เป็น *Lactobacillus plantarum* (Table 3) โดยในปัจจุบันมีการศึกษาการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกหลายชนิดมาใช้เป็นอาหารเสริมเลี้ยงสุกร เช่น *Lactobacillus acidophilus* (Carlos *et al.*, 2002) *Lactobacillus johnsonii* และ *Lactobacillus reuteri* (Haberer *et al.*, 2003) *L. casei* shirota (LCS) (Ohashi *et al.*, 2004) *Enterococcus faecium* SF 68 (Scharek *et al.*, 2005) เป็นต้น สำหรับ *L. plantarum* จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกได้ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539

งานวิจัยนี้ได้แบคทีเรียแลกติก 6 ไอโซเลท ที่แยกจากมูลสุกรเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเบื้องต้นในการใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับสุกร กล่าวคือ สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3% ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในระดับพีเอช 3 สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่ต้องการวิตามิน 12 ในการเจริญเติบโต มีความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมันและแป้ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ β-hemolytic *E. coli* ซึ่งก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในสุกรได้ดี ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์สมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ได้จริงจึงจำเป็นต้องมีการทดลองนำแบคทีเรียแลกติก 6 ทั้งไอโซเลท ไปใช้ผสมอาหารเพื่อเลี้ยงลูกสุกรและติดตามผลเพื่อใช้ประกอบการยืนยันการเป็นโปรไบโอติกในสุกรจริง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2548 และทุนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

ถวัลย์ วรรณกุล. 2536. โรคลูกสุกร. ว. สุกรสาส์น. 20: 37-45.

ธนาคาร นะศรี นิยมศักดิ์ อุปทุม เนตรชนก จิวากานนท์ กิ่งกาญจน์ สาระชูม เจษฎา จิวากานนท์ ประภาพร ตั้งธนธานิช. 2545. การสำรวจการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ที่พบในลูกสุกรท้องเสียช่วงก่อนหย่านมในฟาร์มสุกรเขตจังหวัดขอนแก่น. ว. สัตวแพทยศาสตร์. ม.ขอนแก่น. 11 : 23-33.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. โปรไบโอติก อาหารเพื่อสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์. จาร์พา 41 : 50-53.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2545. ปัญหายาตกค้างในเนื้อสัตว์และแนวทางการแก้ไข ว. สุกรสาส์น. 29 : 42-51.

ศรีสุข โลหะชาละ. 2540. ผลดีและประโยชน์ของสารเสริมชีวนะ (Probiotics) ต่อการเลี้ยงสัตว์. สาส์นไก่และการเกษตร 45 : 21-28.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. **In** (ed. Salminen, S and Wright, A.V.), Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects., pp.1-72. Marcel Dekker, New York.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Enviro. Microbiol. 45 : 1801-1810.

Bloomberg, L., Henriksson, A. and Conway, P.L. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K 88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus sp*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 34-39.

Carlos, G., Marina, B. and Silvia, G. 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. ISSN 0378-1844 version impresa INCI v. 287 n. 8

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus species*. J. Food Prot. 61 : 1636 -1643.

Chin Tsai, C., Yee Hisih, H., Hui Chiu, H., Yu Lai, Y., Hau Liu, J., Yu, B. and Yang Tsen, H. 2005. Antagonistic activity against Salmonella infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. Int. J. Food Microbiol. 102 : 185- 194.

Collins, E.B. and Aramaki, K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 63 : 353-357.

Conway, P.L., Corback, S.L. and Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. J. Dairy Sci. 70 : 1-12.

Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. J. Dairy Sci. 70 : 1-12.

Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. 1998. Selection of Lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. J. Appl. Microbiol. 84 : 125-132.

Gilliland, S.E. 1977. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. J. Food Prot. 40 : 760-762.

Gilliland, S.E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Prot. 41 : 164-167.

Gilliland, S.E., Speck, M.L. and Morgan, C.G. 1975. Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans, pigs and chickens. J. Appl. Microbiol. 30 : 541-545.

Gilliland, S.E. and Speck, M.L., Staley, T.E. and Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67 : 3045-3051.

Gonzalez, S.N. 1993. Inhibition of enteropathogens by *Lactobacilli* strain used fermented milk. J. Food Prot. 56 : 773-776.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and Suarez., J.E. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2158-2163.

Haberer, P., Du Toit, M., Dicks, L.M.T., Ahrens, F. and Holzapfel, W.H. 2003. Effect of potentially probiotic lactobacilli on faecal enzyme activity in minipigs on a high-fat, high-cholesterol dietapreliminary *in vivo* trial. Int. J. Food Microbiol. 87 : 287-291.

Havenaar, R., Brink, B.T. and Huis, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use, pp. 209-221. **In** R. Fuller (ed.). Probiotic : The Scientific Basis. Chapman & Hall, London.

Hawley, H. B., Shepherd, P.A. and Wheater, D.M. 1959. Factors affecting the implantation of lactobacilli in the intestine. J. Appl. Bacteriol. 22 : 360- 367.

Jin, L.Z., Ho, Y.W., Ali, M.A., Abdullah, N., Ong, K.B. and Jalaludin, S. 1998. Effects of adherent effects of intestinal *Lactobacillus* culture on growth weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. Animal Feed Sci. Tech. 70 : 197-209.

Kidder, D.E. and Manners, M.J. 1978. Digestion in Pig. Old Field Park : Scientechnica Bristol Kingston Press.

Kociubinski, G., Perez, P. and De Antoni, G. 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J. Food Prot. 62 : 905-912.

Kontula, P. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product : effect on gastrointestinal microbiota. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50 : 246-252.

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of Polysaccharide Protein and Lipid. **In** Laboratory Exercises in Microbiology, pp. 126-188. Mc Graw-Hill, New York.

Nousiainen, J. and Setala, J. 1998. Lactic acid bacteria as animal probiotics, pp.431-473. **In** S.Salminen and A. von Wright (ed.). Lactic Acid Bacteria. 2nd ed., Mercel Dekker Inc., New York.

Ogawa, M., Shimizum, K., Nomotom. K., Tanakam, R., Hamabatam, T., Ymasaki, S., Takeda, T. and Takeda, Y. 2001. Inhibition of *in vitro* growth of shiga toxin-producing *Escherichia coli*

O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. Int. J. Food Microbiol., 68: 135-140.

Ohashi, Y., Umesaki, Y., and Ushida, K. 2004. Transition of the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract of a pig. Int. J. Food Microbiol. 96 : 61-66.

Phongpaichit, S., Liamthong, S., Mathew, A.G., and Chethanond, U. 2007. Prevalence of Class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* form pigs and pig farmers in Thailand. J. Food Prot. 70 : 292-299.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sand-holm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84 : 197-215.

Salminen, S and Right, A.V.W. 1993. Lactic acid bacteria, 442 p. New York : Marcel Dekker Inc.

Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M.F.G., Wieler, L.H., and Tedin, K. 2005. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development othe immune system of sows and piglets. Vet. Immunol. 105 : 151-161.

Spelhaug, S.R. and Halender, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentasaceous*. J. Food Prot. 52 : 856-862.

Talon, R., Labadie, J. and larpent, J.P. 1980. Charaterization of the inhibitory power of *Lactobacillus* of meat origin. Dairy Sci. Abstr. 42 : 5221.

Toit, M. 1998. Characterization and selection of probiotic *Lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. J. Food Microbiol. 40 : 93-104.