



รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อคัดเลือก
โปรไบโอติกแบคทีเรียที่สามารถยึดเกาะกับ
เยื่อผนังลำไส้และยับยั้งเชื้อก่อโรค

IN VITRO ADHESION AND INHIBITION OF PROBIOTIC
CANDIDATE AGAINST PATHOGENIC BACTERIA

โดย

มงคล ธิรบุญยานนท์ ปิยะนุช เนียมทรัพย์

2550



รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย
ที่สามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้และยับยั้งเชื้อก่อโรค

IN VITRO ADHESION AND INHIBITION OF PROBIOTIC CANDIDATE
AGAINST PATHOGENIC BACTERIA

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550

จำนวน 311,500 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายมงคล ธิรบุญยานนท์

ผู้ร่วมโครงการ

นางปิยะนุช เนียมทรัพย์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

20 / 3 / 2551



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักงาน
คณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2550
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
วัสดุและอุปกรณ์	9
วิธีการทดลอง	13
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24



(ก)

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1 คุณสมบัติของโปรไบโอติกเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ

6



(๒)

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพการเจริญของเซลล์ Caco-2 ที่มีอายุ 15 วัน	18
2 ภาพการเจริญของเซลล์ Caco-2 ที่มีอายุ 42	19
3 อัตราการยึดเกาะของ <i>B. subtilis</i> MP9 และ <i>B. subtilis</i> MP10 กับเซลล์ Caco-2	20
4 อัตราการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ <i>S. enteritidis</i>	21



การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อคัดเลือก
โปรไบโอติกแบคทีเรียที่สามารถยึดเกาะกับ
เยื่อผิวลำไส้และยับยั้งเชื้อก่อโรค

IN VITRO ADHESION AND INHIBITION OF PROBIOTIC
CANDIDATE AGAINST PATHOGENIC BACTERIA

มงคล ธิรบุญยานนท์ ปิยะนุช เนียมทรัพย์
MONGKOL THIRABUNYANON PIYANUCH NIAMSUP

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนาวิธีการคัดเลือกในเชิงคุณภาพที่คาดว่าจะได้โปรไบโอติกแบคทีเรียที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคที่จะเข้าสู่เซลล์ของร่างกายได้ดี ผลการศึกษาพบว่าอัตราการเจริญของเซลล์ Caco-2 นั้นจะเจริญเติบโตค่อนข้างช้าและเมื่อเซลล์เติบโตเต็มที่แล้วเซลล์จะเจริญแล้วยึดเกาะกับวัสดุเพาะเลี้ยงเป็นแผ่นชั้นเดียว ทั้งนี้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 35 - 42 วัน ความสามารถของ *Bacillus subtilis* MP9 และ MP10 ที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 นั้นจะพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ค่อนข้างสูง คือมีอัตราการยึดเกาะเท่ากับ 3.35 และ 3.37 log cfu/ml ในขณะที่มีเชื้อเริ่มต้น 6.39 และ 6.38 log cfu/ml ตามลำดับ ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* NC ต่อการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ของ

S. enteritidis พบว่าทั้งการใช้เซลล์ *B. subtilis* NC โดยตรง หรือ Cell free supernatant หรือ Cell free supernatant ที่มีการปรับ pH 7 มีความสามารถในการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* เท่ากับ 3.95, 4.16 และ 4.07 log cfu/ml ตามลำดับในกลุ่มทดลอง ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการบุกรุกเซลล์สูงถึง 4.84 log cfu/ml

ผลจากการทดลองครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียในเชิงคุณภาพได้ดี

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the application of Caco-2 cell culture as in the quality selective model of probiotic bacteria which has ability to adhesion and inhibition the pathogenic bacteria invade into epithelial cells of the hosts. The growth rates of Caco-2 cells were observed a rather slowly growth, the fully differentiation time were about 35 – 42 days. Morphological differentiation of this Caco-2 cells were found in different stages, but fully differentiate show attach as cell monolayer to the culture flasks. The adhesive ability of *Bacillus subtilis* MP9 and MP10 to Caco-2 cells were exhibited in a rather high, which were adhere about 3.35 and 3.37 log cfu/ml, respectively. The original concentrations of *B. subtilis* MP9, MP10 were 6.39 and 6.38 log cfu/ml, respectively. The protective efficiencies of *Bacillus subtilis* NC on the inhibition of *Salmonella enteritidis* invade to Caco-2 cells. The results showed that not only the direct *B. subtilis* NC cells but also the cell free supernatant or cell free supernatant adjust pH 7 groups had ability to inhibit the invasion rate ($P < 0.05$) compare to that of control group. The invasion rates of *S. enteritidis* were about 3.95, 4.16 and 4.07 log cfu/ml, respectively. The control group was 4.84 log cfu/ml as the control group.

The results in this study indicate that the application of Caco-2 cell culture could be applied as the quality selection of probiotic bacteria.

คำนำ

มาตรการความปลอดภัยของอาหาร (Food safety) เป็นข้อกำหนดของประเทศไทยและนานาชาติ ในการที่จะควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานและมีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค โปรไบโอติกและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโปรไบโอติกนับว่ามีประโยชน์ต่อผู้บริโภคหลายประการ อาทิเช่น ได้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากโปรไบโอติกในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก หรือเซลล์ที่มีชีวิตของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยตรงในแง่การป้องกันหรือรักษาโรคในมนุษย์และสัตว์

โปรไบโอติก (probiotic) เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตและนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในมนุษย์และสัตว์ โดยที่บทบาทของจุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อความสมดุลของ จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ (Fuller, 1989) การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกเริ่มมีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารหรือการป้องกันและรักษาโรคในมนุษย์มากขึ้นเรื่อยๆ โดยปกติแล้วพวกเรารับประทานโปรไบโอติกอยู่เสมอ ซึ่งโปรไบโอติกเหล่านี้จะอยู่ในรูปแบบของหลายๆ ผลิตภัณฑ์ เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น บทบาทและหน้าที่ของโปรไบโอติกที่สำคัญ อาทิเช่น บทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค (Shu and Gill, 2001) ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหาร (Jin et al., 2000) ลดการผลิตแอมโมเนียในเลือด (Samanya and Yamauchi, 2002) ป้องกันโรคท้องร่วง (Maruta et al., 1996) หรือใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง (Lee et al., 2004; Zabala et al., 2001)

การคัดเลือกเพื่อให้ได้โปรไบโอติกที่ดีนั้น จะต้องมีการคัดเลือกเพื่อหาเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียที่ดีและยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดีที่สุด ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นตอเพื่อศึกษาการมีคุณสมบัติของโปรไบโอติก ที่จะไปยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผิว (epithelial cell) ของลำไส้ นั้นเป็นเทคนิคที่สำคัญมากอีกวิธีการหนึ่งในการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย (Brassart et al., 1994; Salminen et al., 1996; Tuomola and Salminen, 1998) เมื่อโปรไบโอติกแบคทีเรียถูกนำเข้าไปสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์แล้ว โปรไบโอติกเหล่านี้จะแสดงบทบาทตามหน้าที่ได้มากมาย

เพียงใด ก็ขึ้นอยู่กับ การยึดเกาะกับเนื้อเยื่อผิวของลำไส้เป็นประเด็นสำคัญ (Printo et al., 1983; Blay et al., 2004) และนอกจากนั้นโอกาสที่เชื้อก่อโรคจะมีพื้นที่เกาะกับเนื้อเยื่อผิวในลำไส้ได้นั้น ก็มีโอกาสน้อยตามไปด้วยหากโปรไบโอติกเกาะกับเยื่อผิวได้ดี (Greene and Klaenhammer, 1994; Bibiloni et al., 1999) เพราะฉะนั้นนับว่าวิธีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอิมูโนโมดูเลเตอร์เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติกนั้น เป็นวิธีที่เหมาะสมในการคัดเลือกโปรไบโอติก เพื่อการนำไปสู่การคัดเลือกโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพที่ดี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นตอชนิดอิมูโนโมดูเลเตอร์ของลำไส้
2. เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในการคัดเลือกโปรไบโอติกแบบที่เรียกว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นตอชนิดอิมูโนโมดูเลเตอร์ของลำไส้
2. ได้ทราบถึงวิธีการคัดเลือกโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพโดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์
3. ได้รับโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

การตรวจเอกสาร

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เรานั้นมีความซับซ้อน และมีความหลากหลายอย่างมาก อาทิเช่น มีปริมาณจุลินทรีย์ จำนวน 50 สกุล หรือหากจะนับจำนวนชนิดของแบคทีเรียแล้ว ก็อาจจะพบมากถึง 400 ชนิด (Finegold et al., 1974) ในจำนวนของจุลินทรีย์เหล่านี้ก็มีกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนั้นบางชนิดก็เป็นแบคทีเรียที่มีโทษ เช่นพบในกลุ่ม *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. เป็นต้น ถึงแม้จะมีแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของคนเรานั้น แต่โดยปกติแล้วร่างกายของคนเราก็มีการปรับสภาวะให้มีสัดส่วนของแบคทีเรียที่เหมาะสม ระหว่างกลุ่มที่มีประโยชน์และกลุ่มที่เป็นโทษ ดังนั้นกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ก็จะเป็นพิษเป็นภัยต่อมนุษย์เรา แต่เนื่องจากสภาวะการณปัจจุบัน จะพบว่าการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคต่างๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นมีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงมีรายงานการป่วยใช้โดยมีสาเหตุจากเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารอยู่บ่อยครั้ง ในขณะเดียวกันหากเราได้รับประทานจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์โดยตรงหรือเป็นส่วนเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารแล้วนั้น จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ดังกล่าวก็จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร และสามารถหยุดยั้งการทำหน้าที่ของเชื้อก่อโรคได้ ด้วยหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ดังกล่าวก็จะทำให้ร่างกายของเราสามารถปกป้องเชื้อก่อโรคต่างๆ ได้

โปรไบโอติก (probiotic) หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตและนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในมนุษย์และสัตว์ โดยที่บทบาทของจุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในลำไส้ (Fuller, 1989) ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียในการป้องกันและรักษาโรคในมนุษย์ หรือในอุตสาหกรรมอาหารกันอย่างกว้างขวาง การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในด้านการแพทย์นั้น ถือว่าโปรไบโอติกมีบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคในมนุษย์หลายประการ Naaber et al. (1998) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ในหนูทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pinchuk et al. (2001) ที่พบว่าโปรไบโอติกในกลุ่ม *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งเชื้อโรคในกลุ่ม *Helicobacter pylori* ได้ดี การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกยังสามารถนำมาเป็นแนวทางในการป้องกันโรคเกี่ยวกับหัวใจ ที่มีสาเหตุมาจากปริมาณโคเลสเตอรอลสูงในมนุษย์ได้ (Usman and Hosono, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย สามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้เพิ่มปริมาณในระดับที่สูงขึ้นในคนไข้ (Fuller and Gibson, 1997) ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นพบว่าบทบาทของโปรไบโอติกก็มีส่วนสำคัญในหลายๆ ผลิตภัณฑ์ อาทิเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต นมหมัก แหนม เนื้อหมัก เป็นต้น

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของโปรไบโอติกเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	ปฏิชีวนะ
1. เป็นสิ่งมีชีวิต	1. เป็นสารเคมีบริสุทธิ์
2. ไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร	2. ดูดซึมในทางเดินอาหาร
3. เพิ่มการเจริญและเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ อาหาร	3. เพิ่มการเจริญและเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ อาหาร
4. ไม่ตกค้างในเนื้อเยื่อ	4. ตกค้างในเนื้อเยื่อ
5. ไม่เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา	5. ทำให้เชื้ออื่นเกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา
6. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฉพาะที่	6. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ทั่วร่างกายและออก ฤทธิ์ต่อเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด
7. เจริญได้ในทางเดินอาหารและแข่งการเจริญ กับเชื้อก่อโรคได้	7. ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์, DNA, RNA และโปรตีนของแบคทีเรีย

ที่มา : Parker (1974) และ Fuller (1989)

แนวคิดในการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย

การคัดเลือกเพื่อให้ได้โปรไบโอติกที่ดีนั้นต้องผ่านการทดสอบคุณสมบัติหลาย ๆ ข้อ อาทิเช่น โปรไบโอติกนั้นจะต้องไม่ใช่เชื้อก่อโรค ไม่มีความสามารถในการถ่ายทอดยีนต้านทานยาปฏิชีวนะให้แบคทีเรียอื่น ๆ คือจะต้องมีพันธุกรรมที่คงที่ โปรไบโอติกจะต้องมีความสามารถในการมีชีวิตรอดจากน้ำย่อยและเกลือแร่ ทนทานต่อเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อย มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อผิวของลำไส้ สามารถผลิตสารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น กรดอินทรีย์ แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล อะซิติกไฮดรอกไซด์ แลคโตเปอร์ออกซิเดส แลคโตเนส สามารถผลิตสารต่อต้านสารก่อมะเร็ง และรวมไปถึงมีความสามารถในการสร้างความสมดุลของจุลินทรีย์ท้องถิ่นในลำไส้หลังจากเกิดความผิดปกติ เนื่องมาจากการเกิดโรคท้องร่วง การรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะหรือการรักษาโรคด้วยการฉายรังสี (Ouwehand et al., 1999; Zubillaga et al., 2001; Holzapfel and Schilling, 2002) ซึ่งหากขบวนการทดสอบปรากฏว่าเชื้อใดเชื้อหนึ่งสามารถมีคุณสมบัติดังกล่าวครบถ้วนหรือมากที่สุด เราสามารถนำเชืวดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกที่ดีได้

ขั้นตอนการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย (Verschuere et al. 2000)

ในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกนั้น มีปัจจัยหลายประการที่ต้องคำนึงถึง โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อให้ได้เชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดี

1. การศึกษาเอกสาร ศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่สนใจ โดยสำรวจจากเอกสารงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ และต้องทราบถึงแหล่งที่พบของแบคทีเรียชนิดนั้นด้วย เนื่องจากการนำแบคทีเรียจากแหล่งที่เพาะเลี้ยง หรือจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกับการนำไปใช้จะได้ประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียที่นำมาจากต่างถิ่น เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว

2. การทดสอบในหลอดทดลอง

2.1. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เป็นการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค หรือการผลิตสารบางชนิดเพื่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยทำการทดสอบได้ทั้งในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวและแบบแข็ง นอกจากนี้มีความสามารถผลิตสารต้านจุลชีพบางชนิดได้แล้ว ยังมีความสามารถสูงกว่าในการแย่งสารอาหารกับแบคทีเรียก่อโรค มีการผลิตสาร Primary metabolite หรือการเปลี่ยนแปลง pH ก็ได้

2.2. การยึดเกาะเยื่อผิวของลำไส้ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะผนังลำไส้ หรือสามารถแย่งพื้นที่ส่วนใหญ่ในลำไส้ หรือยึดเกาะพื้นที่ผิวของเจ้าบ้านจากแบคทีเรียก่อโรคได้ดีก็จะมีคุณสมบัติที่ดีอีกประการของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

3. ศึกษาความเป็นพิษกับสัตว์ ก่อนการนำแบคทีเรียที่สนใจไปใช้กับสัตว์ต้องทำการศึกษาเพื่อให้ทราบว่า แบคทีเรียที่นำมาใช้ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์ตายทั้งในภาวะปกติและภาวะเครียด

4. ศึกษารูปแบบการนำไปใช้และผลกระทบ ศึกษาโดยนำแบคทีเรียเป้าหมายไปใช้จริงในสัตว์ทดลอง ศึกษาผลต่อการเจริญหรืออัตราการรอดของสัตว์ที่ได้เห็นยวนำให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียก่อโรค

5. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตแบคทีเรียที่สนใจ ทั้งในด้านอุตสาหกรรม อาจรวมไปถึงด้านเทคโนโลยีในการผลิต ต้นทุน และข้อกฎหมาย

การยึดเกาะที่เยื่อผิวลำไส้ของโปรไบโอติกและเชื้อก่อโรค

การเพิ่มขึ้นของโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารนั้น จะสามารถลดโคลิฟอร์มก่อโรคในบริเวณทางเดินอาหารได้ (Francis et al., 1978; Jin et al., 1996; Watkins and Miller, 1983; Adami

and Cavazzoni, 1999; Maruta et al., 1996) การศึกษาในรายละเอียดพบว่ามีผลต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรค (Bernet, 1993; Coconnier et al., 1993) โดยการแข่งขันในการยึดเกาะที่ตำแหน่งของการยึดเกาะ การรวมกันของแบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคและการแข่งขันในการแย่งอาหาร

การแข่งขันกันจับที่ตำแหน่งของการยึดเกาะบริเวณเยื่อบุผิวของลำไส้ นั้น โปรไบโอติกจะมีความสามารถในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวของลำไส้ได้ดี การจับกับตำแหน่งของโปรไบโอติกในการยึดเกาะกับเซลล์อพิทีเลียมของลำไส้เล็กนั้น จะเป็นกลไกที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรียก่อโรค โดยที่โปรไบโอติกจะแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะตำแหน่งบนผิวของลำไส้ (Conway et al., 1987; Fuller, 1978) Gusils et al. (1999) รายงานว่า *L. animalis* และ *L. fermentum* จะมีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ของอพิทีเลียมของกระเพาะ ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ และกลุ่มของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสจะกีดขวางการจับที่ตำแหน่งของการยึดเกาะของเชื้อก่อโรค *Salmonella* การจับเกาะกันระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อก่อโรค แลคโตบาซิลลัสจะเกาะจับกันกับเชื้อก่อโรคของบริเวณกระเพาะปัสสาวะจะเป็นส่วนสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อก่อโรค (Reid et al., 1988) การเกาะจับกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อก่อโรคของลำไส้ นั้น คาดการณ์ว่าจะเป็นการป้องกันเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ (Spencer and Chesson, 1994)

การประยุกต์ใช้เซลล์ Caco-2 เป็นรูปแบบจำลองความสามารถของโปรไบโอติกในการยึดเกาะหรือทำลายเชื้อก่อโรคไม่ให้บุกรุกกับเยื่อบุผิวของลำไส้

ในการคัดเลือกโปรไบโอติกในเชิงคุณภาพ หรือเพื่อให้ได้โปรไบโอติกที่ดีในขั้นตอนลำดับท้าย ๆ นั้น นักวิจัยนิยมใช้เซลล์ต้นตอของอพิทีเลียมเซลล์ของลำไส้ (Caco-2) มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อตรวจสอบความสามารถในการยึดเกาะของโปรไบโอติก (Tuomola and Salminen, 1998; Morelli, 2000; Tuomola et al., 2001; Maragkoudakis et al., 2006) หรือความสามารถในการครอบครองพื้นที่แล้วทำลายเชื้อก่อโรคไม่ให้เข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ได้ (Gagnon et al., 2004; Tsai et al., 2005; Matijasic et al., 2006; Golowczyc et al., 2007) หากเชื้อตัวไหนมีความสามารถดีที่สุด นักวิจัยก็จะเลือกตัวนั้นเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ได้หรือทดสอบในสิ่งมีชีวิตในขั้นตอนถัดไป

วัสดุและอุปกรณ์

เซลล์ต้นตอ

เซลล์ Caco-2 ซื้อมาจาก (CLS, Germany)

อาหารและสารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich, USA)
2. Fetal calf serum (Hyclone, USA)
3. Non-essential amino acid (Hyclone, USA)
4. Penicillin-streptomycin (Hyclone, USA)
5. Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA)
6. Triton X-100 (Merck, Germany)
7. Trypsin EDTA (Hyclone, USA)

วัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์

1. ถาดหลุมขนาด 24 หลุม
2. ขวดเลี้ยงขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ขวดเลี้ยงขนาด 500 มิลลิลิตร
4. หลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร

แบคทีเรียทดสอบ

1. *Bacillus subtilis* MP9
2. *Bacillus subtilis* MP10
3. *Bacillus subtilis* NC

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นแล้ว (ทดสอบในห้องปฏิบัติการของ ดร.มงคล ธิรบุญยานนท์) และเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ผ่านการตรวจสอบชนิดสายพันธุ์ด้วยชุดทดสอบ API 50 B และเปรียบเทียบการหาลำดับ 16S rRNA แล้ว

เชื้อก่อโรค

1. *Salmonella enteritidis* (DMST 15676)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient broth (Merck, Germany)
2. Brilliant green agar (Criterion, USA)

สารเคมี

1. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Merck, Germany)
2. ผงวุ้น
3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 และ 5 นอร์มอล (Merck, Germany)
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (Merck, Germany)
5. เอทานอล 70 %
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Merck, Germany)
7. ชุดสีย้อมแกรม (gram's stain set) (Bio-Medical Laboratory, ประเทศไทย)
8. Emulsion oil (Merck, Germany)
9. Permout

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (Forma Scientific, Model 3111, USA)
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) (Olympus, ULWCD 0.30)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus รุ่น UM 500)
4. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic[®] GENESYS[™] Spectrophotometer, USA)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (BENCH Top Refrigerated centrifuge ยี่ห้อ Sanyo GLENKAMP PLC รุ่น HARRIER 18/80, United Kingdom)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (HETTICH รุ่น EBA 12R, Germany)
7. ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Memmert, Germany)

8. ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240 (E2), USA)
9. ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115 (E2) , USA)
10. ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น FD240 (E2) , USA)
11. ตู้แช่แข็ง – 80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)
12. ตู้เขี่ยเชื้อ (Horizontal type laminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3, ประเทศไทย)
13. เครื่องเขย่า (Orbital Incubator, ยี่ห้อ Sanyo GLENKAMP PLC รุ่น IOX 400.xx2.C, Japan)
14. เครื่องเขย่า (Forma Scientific รุ่น 4520, USA)
15. พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)
16. เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)
17. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง (OHAUS)
18. ไมโครปิเปตขนาด 2, 10, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
19. Transluminator (ยี่ห้อ Bio-rad)
20. Waterbath (Unsteirred digital bath, ยี่ห้อ Julabo Labortechnik GMBH รุ่น TW12)
21. ถังไนโตรเจนเหลว (TAYLOR-WHARTON, XT-20, USA)

เครื่องแก้วและวัสดุประจำห้องปฏิบัติการ

1. ปีกเกอร์ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
2. ฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
3. หลอดทดลอง
4. จานเพาะเชื้อ
5. แท่งแก้ว
6. ขวดแก้ว (ยี่ห้อ Duran)
7. ปิเปตแก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
8. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
9. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
10. หลอดเก็บเชื้อขนาด 1.5, 2 และ 4 มิลลิลิตร
11. ไมโครปิเปตทิฟ
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์

13. ห่วงถ่ายเชือก
14. ถาดสแตนเลส
15. หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 150 มิลลิลิตร
16. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
17. กล่องพลาสติก
18. ขวดแก้วเก็บเชือกขนาด 1, 2 และ 7 แดรม



วิธีการทดลอง

1. ศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ Caco-2

เซลล์ Caco-2 ที่ซื้อจากศูนย์เก็บเซลล์ต้นตอ (CLS, Germany) จะถูกนำมาเลี้ยงเพื่อทำการเก็บสำรองไว้เป็นหลายๆ หลอดที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำเซลล์ที่เก็บไว้มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตดังนี้

1.1. อาหารเลี้ยงเซลล์และสารเพิ่มการเจริญเติบโต

นำเซลล์ Caco-2 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส มา 2 หลอด (หลอดละ 2 มิลลิลิตร) มาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich, USA), แล้วเติม Fetal calf serum 10% (Hyclone, USA) (ก่อนเติมต้องนำไปให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีก่อนใช้), 1%(v/v) Non essential amino acid (Hyclone, USA), และยาปฏิชีวนะ 1% Penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml, และ 10,000 µg/ml; (Hyclone, USA) จากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารไปใส่ในขวดเลี้ยงขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด โดยในแต่ละหลอดจะมีอาหารที่มีเซลล์อยู่ด้วยปริมาณ 10 มิลลิลิตร

1.2. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์

นำเซลล์ที่อยู่ในหลอดไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ โดยปรับสภาวะที่หลอดเชื้อ มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นจะศึกษาจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตและลักษณะรูปร่างของเซลล์ ทุกๆ 7 วัน จนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มที่ ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 42 วัน

2. ศึกษาอัตราการยึดเกาะของ *Bacillus subtilis* MP กับเซลล์ Caco-2

เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบคือ *Bacillus subtilis* MP9 และ *Bacillus subtilis* MP10 ได้ผ่านการทดสอบการมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย

2.1. การเตรียมเซลล์ Caco-2

เซลล์ Caco-2 ที่จะนำไปใช้จะนำมาจากเซลล์ต้นตอที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยนำเซลล์มา 4 หลอด (หลอดละ 2 มิลลิลิตร) มาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich, USA), แล้วเติม Fetal calf serum 10% (Hyclone, USA) (ก่อนเติมต้องนำไปให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีก่อนใช้), 1%(v/v) Non essential amino acid (Hyclone, USA), และยาปฏิชีวนะ 1% Penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml, และ 10,000 µg/ml; (Hyclone, USA) จากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารไปใส่ในขวดเลี้ยงขนาด

250 มิลลิลิตร จำนวน 1 ขวด โดยมีปริมาณอาหารที่มีเซลล์อยู่ 50 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่อยู่ในหลอดไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ โดยปรับสภาวะที่ปลอดเชื้อ มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นทำการสังเกตการเจริญ การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และเลี้ยงจนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มที่โดยดูจากเซลล์จะยืดยาวบริเวณพื้นที่ด้านล่างของขวดเลี้ยงเซลล์เป็นชั้นเดียว นอกจากนั้นก็สังเกตขนาดของเซลล์ประกอบคือเซลล์จะมีขนาดใหญ่มีรูปร่างคล้ายๆ กับสี่เหลี่ยมรูปกระสวย ซึ่งขั้นตอนที่เลี้ยงจนถึงเซลล์โตเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 42 วัน จากนั้นจะเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จะเหลือเฉพาะเซลล์ Caco-2 ที่ติดอยู่ที่ขวดเลี้ยงเซลล์ นำ Trypsin EDTA จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเทบนเซลล์แล้วกระจายให้ทั่วเซลล์ เพื่อย่อยเซลล์ที่ติดขวดให้แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ นำเซลล์ไปล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์ไปตรวจนับจำนวน โดยการย้อมด้วยสี Trypan blue แล้วนับด้วย Haemocytometer แล้วทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีปริมาณ 10^5 cells/ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

2.2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว NB (nutrient broth) เช้าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในสภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะนำแบคทีเรียมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.50 A นำเชื้อแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที แล้วล้างเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้ด้วยน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง โดยปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีปริมาณ 10^8 cfu/ml ในอาหาร DMEM เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.3. การยัดเกาะของ *Bacillus subtilis* MP กับเซลล์ Caco-2

การหาอัตราการยัดเกาะของแบคทีเรียดัดแปลงตามวิธีการของ Gagnon et al. (2004) และ Maragkoudakis et al. (2006) โดยการนำเซลล์ Caco-2 ที่เตรียมไว้ไปหยอดลงในถาดหลุมขนาด 24 หลุม ให้มีปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำการเปลี่ยนอาหารทุก 48 ชั่วโมง ซึ่งจะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน เพื่อให้เซลล์โตและยัดเกาะที่ก้นหลุมของถาดหลุม ทำการเปลี่ยนด้วยอาหาร Non-supplemented DMEM ก่อนนำมาวิเคราะห์การยัดเกาะเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดเอาอาหารออก แล้วล้างเซลล์ที่อยู่ก้นหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 2 รอบ จึงเติมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไป 0.5 มิลลิลิตรในแต่ละหลุม นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยัดเกาะกับ Caco-2 โดยการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟต

บัพเฟอร์จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้นจะทำให้เซลล์ Caco-2 แยก โดยการเติม 0.1% Trion X-100 (Merck, Germany) ในอาหาร DMEM ปั่นต่ออีกนาน 5 นาที ทำการนับแบคทีเรียที่มีชีวิตและยัดเกาะเซลล์ Caco-2 ด้วยอาหาร NA แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ อัตราการยัดเกาะเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียจะแสดงโดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและแบคทีเรียที่รอดชีวิต ซึ่งการวิเคราะห์การยัดเกาะดังกล่าวจะทำทั้งหมดจำนวน 3 ซ้ำ

3. ศึกษาการยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *Salmonella enteritidis* โดย *Bacillus subtilis* NC

เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบคือ *Bacillus subtilis* NC ได้ผ่านการทดสอบการมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย ส่วนแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้คือ *Salmonella enteritidis*

3.1. การเตรียมเซลล์ Caco-2

การเตรียมเซลล์ Caco-2 เริ่มต้นจากการนำมาจากเซลล์ต้นต่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยง โดยการนำเซลล์มา 3 หลอด (หลอดละ 2 มิลลิลิตร) มาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich, USA), แล้วเติม Fetal calf serum 10% (Hyclone, USA) (ก่อนเติมต้องนำไปให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีก่อนใช้), 1%(v/v) Non essential amino acid (Hyclone, USA), และยาปฏิชีวนะ 1% Penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml, และ 10,000 µg/ml; (Hyclone, USA) จากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารไปใส่ในขวดเลี้ยงขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 1 ขวด โดยมีปริมาณอาหารที่มีเซลล์อยู่ 40 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่อยู่ในหลอดไปปั่นในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ โดยปรับสภาวะที่ปลอดเชื้อ มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นทำการสังเกตการเจริญ การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และเลี้ยงจนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มที่โดยดูจากเซลล์จะยัดเกาะบริเวณพื้นที่ด้านล่างของขวดพลาสติก นอกจากนั้นก็สังเกตขนาดของเซลล์ประกอบคือเซลล์จะมีขนาดใหญ่มีรูปร่างคล้ายๆ กับสี่เหลี่ยมรูปกระสวย ซึ่งขั้นตอนที่เลี้ยงจนถึงเซลล์โตเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 42 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่แล้ว จากนั้นจะนำขวดเลี้ยงมาเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก จะเหลือเฉพาะเซลล์ Caco-2 นำ Trypsin EDTA จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเทบนเซลล์แล้วกระจายให้ทั่วเซลล์ เพื่อย่อยเซลล์ที่ติดขวดให้แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ นำเซลล์ไปล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์ไปตรวจนับจำนวน โดยการย้อมด้วยสี Trypan

blue แล้วนับด้วย Haemocytometer แล้วทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีปริมาณ 10^5 cells/ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

2.2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและ Cell free supernatant

2.2.1. เลี้ยง *Bacillus subtilis* NC ในอาหารเหลว NB (nutrient broth) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในสภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะนำแบคทีเรียมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 1.50 A เก็บส่วนหนึ่งไว้ทดสอบ และนำแบคทีเรียส่วนหนึ่งไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสข้างบน (Supernatant) ไปกรองด้วย Filter membrane ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งเป็น Cell free supernatant เก็บส่วนหนึ่งไว้ทดสอบ จากนั้นจะนำส่วนที่เหลือไปปรับ pH ให้ได้ 7 และเก็บไว้ทดสอบ

2.2.2. เลี้ยงเชื้อก่อโรค *Salmonella enteritidis* ในอาหารเหลว NB เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในสภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะนำแบคทีเรียมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.50 A เพื่อให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 108 cfu/ml และเก็บส่วนหนึ่งไว้ทดสอบ

3.3. การยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของเชื้อก่อโรค โดย *Bacillus subtilis* NC

การประเมินการยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *Salmonella* โดยการดัดแปลงตามวิธีการของ Tsai et al. (2005) และ Golowczyc et al. (2007) จะมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เริ่มด้วยการนำเซลล์ Caco-2 ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^5 cells/ml ที่ได้เตรียมไว้ไปหยอดลงในถาดหลุมขนาด 24 หลุม ให้มีปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหลุม แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำการเปลี่ยนอาหารทุก 48 ชั่วโมง โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน เพื่อให้เซลล์โตและยึดเกาะที่ก้นหลุมของถาดหลุม ทำการเปลี่ยนด้วยอาหาร Non-supplemented DMEM ก่อนนำมาวิเคราะห์การบุกรุกเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดเอาอาหารออก แล้วล้างเซลล์ที่อยู่ก้นหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์จำนวน 2 รอบ ทำการเติม *Bacillus subtilis* NC และ *Salmonella enteritidis* ลงไปในหลุมที่มีเซลล์ Caco-2 ตามกลุ่มดังนี้

3.3.1. กลุ่มควบคุม *S. enteritidis* + NB (C)

3.3.2. กลุ่มทดลอง *S. enteritidis* + *B. subtilis* NC (T1)

3.3.3. กลุ่มทดลอง *S. enteritidis* + Cell free supernatant (CFS) (T2)

3.3.4. กลุ่มทดลอง *S. enteritidis* + Cell free supernatant (pH 7) (CFS, pH 7) (T3)

นำไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เติมน้ำอาหาร DMEM 0.5 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ Gentamicin (100 µg/ml) ผสมอยู่ เพื่อไปทำฆ่า *S. enteritidis* ที่ไม่ได้เข้าไปในเซลล์ โดยการเติมลงไปในทุกหลุมแล้วนำไปบ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง ล้างเซลล์ Caco-2 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 รอบ แล้วทำให้เซลล์ Caco-2 แตกด้วย 0.1% Triton X-100 ในอาหาร DMEM จากนั้นทำการเจือจางในน้ำเกลือแล้วนำไปเกลี่ยบนอาหาร brilliant green agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศ สำหรับการรอดชีวิต *S. enteritidis* ที่สามารถบุกรุกเข้าไปในเซลล์ Caco-2 ได้ อัตราการบุกรุกจะเปรียบเทียบระหว่างจำนวนเชื้อก่อโรค เริ่มต้นและเชื้อก่อโรคที่บุกรุกได้ ส่วนการยับยั้งการบุกรุกจะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีการเติม *B. subtilis* NC ลงไปด้วย การหาอัตราการยับยั้งการบุกรุกจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ



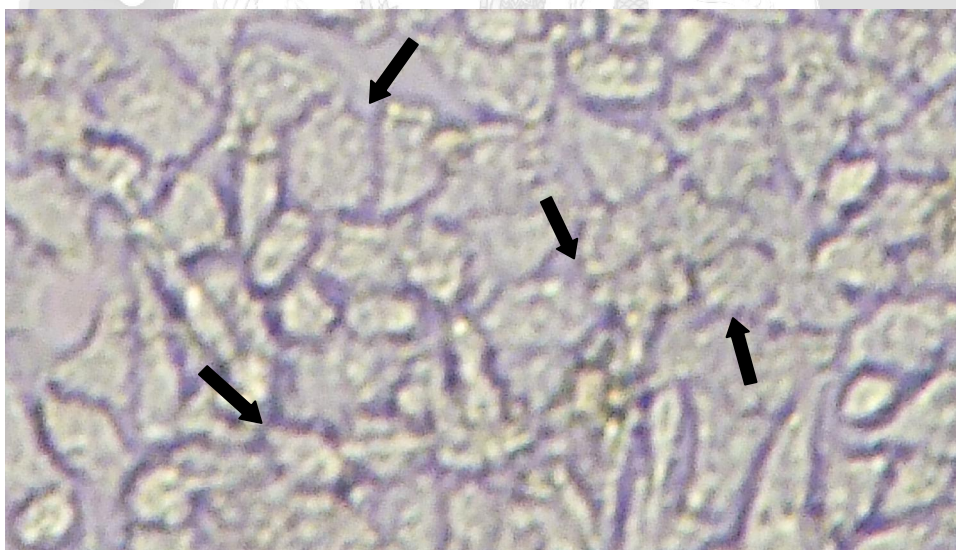
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. อัตราการเจริญและรูปร่างของเซลล์ Caco-2

การทดสอบการยึดเกาะของเชื้อทดสอบกับอิมพีทีเลียมเซลล์ลำไส้ นั้น เป็นวิธีการในการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกในเชิงคุณภาพ เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่าที่นี่จะเป็นแหล่งแรกที่จุลินทรีย์ในลำไส้จะมีบทบาทได้ (Tuomola et al., 2001) ถึงแม้การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 นั้นจะมีวิธีการที่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก รวมไปถึงความชำนาญของนักวิจัยแล้ว แต่ว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกโปรไบโอติกสมัยใหม่ๆ นั้น ก็ต้องมีการทดสอบการยึดเกาะหรือการบุกรุกเซลล์ (Golowczyc et al., 2007) ทั้งนี้โดยมีเหตุผลสนับสนุนหลักๆ ว่าจะได้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ดีมากกว่าการคัดเลือกโดยใช้วิธีการอื่น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย จากการศึกษาอัตราการเจริญในครั้งนี้จะพบว่าเซลล์ Caco-2 นั้น เจริญค่อนข้างช้าถึงแม้ผู้วิจัยจะเติม Fetal calf serum, Amino acid เพิ่มเติมลงไป ทำให้มีโอกาสค่อนข้างสูงต่อการปนเปื้อนต่อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือไมโครพลาสมา ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ก็มีการปนเปื้อนอยู่หลายครั้ง การเจริญของเซลล์ Caco-2 ในสัปดาห์แรกๆ นั้น เซลล์จะมีรูปร่างกลมและแขวนลอยในอาหาร (รูปที่ 1) แต่เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่แล้วก็ยึดเกาะกับวัสดุเพาะเลี้ยง โดยการยึดเกาะจะเป็นแผ่นชั้นเดียวแผ่เต็มพื้นที่ และเซลล์มีรูปร่างคล้ายๆ กับรูปกระสวย (รูปที่ 2) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 35-42 วัน



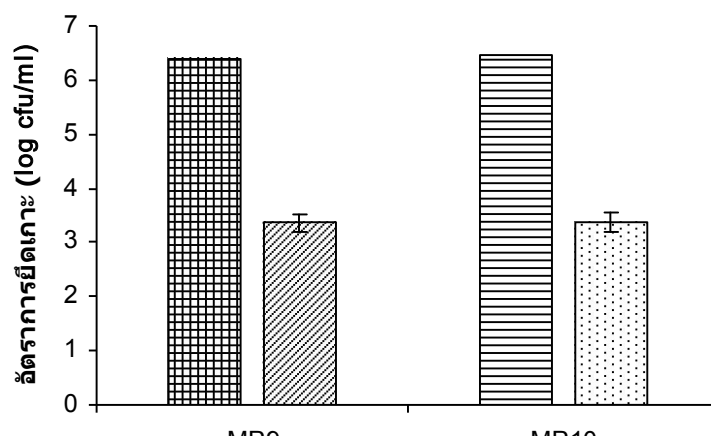
ภาพที่ 1. ภาพการเจริญของเซลล์ Caco-2 ที่มีอายุ 15 วัน เซลล์ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ มีขนาดเล็ก และเจริญแขนงลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 2. ภาพการเจริญของเซลล์ Caco-2 ที่มีอายุ 42 วัน เซลล์เจริญเติบโตเต็มที่และยึดเกาะกับวัสดุเพาะเลี้ยงแล้วยึดติดกันเป็นเซลล์ชั้นเดียว

2. อัตราการยึดเกาะของ *Bacillus subtilis* MP กับเซลล์ Caco-2

กลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกนั้น จะเริ่มต้นด้วยการที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกเดินทางเข้าไปในระบบทางเดินอาหารแล้วยึดเกาะกับอพิทีเลียเซลล์ของมนุษย์หรือสัตว์ เป็นลำดับแรก (Printo et al., 1983; Blay et al., 2004) หลังจากนั้นจุลินทรีย์โปรไบโอติกจึงแสดงหน้าที่หรือบทบาทของตัวจุลินทรีย์เอง อาทิเช่น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Shu and Gill, 2001) ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Helicobacter pylori* (Pinchuk et al., 2001) การป้องกันโรคเกี่ยวกับหัวใจที่มีสาเหตุมาจากปริมาณโคเลสเตอรอลสูงในมนุษย์ (Usman and Hosono, 2000) เป็นต้น จากการศึกษาอัตราการยึดเกาะของ *Bacillus subtilis* MP9 และ MP10 กับเซลล์ Caco-2 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการยึดเกาะเท่ากับ 3.35 และ 3.37 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่มีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.39 และ 6.38 log cfu/ml ใน *Bacillus subtilis* MP9 และ MP 10 ตามลำดับ (รูปที่ 3) ซึ่งอัตราการยึดเกาะดังกล่าวเป็นค่าค่อนข้างสูงในการให้การยอมรับเมื่อมีการทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Gagnon et al. (2004) ได้ศึกษาอัตราการยึดเกาะโปรไบโอติกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bifidobacterium bifidum* RBL 71 กับ *Bifidobacterium bifidum* RBL 460 กับเซลล์ Caco-2 พบว่ามีอัตราการยึดเกาะเท่ากับ 4.2 และ 3.2% ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์นม ซึ่งพบว่าผู้วิจัยคัดเลือกเพียง 3 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ *Lactobacillus casei* Shinta ACA-DC 6002, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037, *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 146 จากเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด 29 สายพันธุ์ โดยที่ทั้ง 3 สายพันธุ์มีอัตราการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 เท่ากับ 2.4, 0.8 และ 25.5% ตามลำดับ (Maragkoudakis et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus gasseri* K7 มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ประมาณ 6.5 log cfu/ml ในขณะที่ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 8.6 log cfu/ml (Bogovic Matijasic et al., 2006) ซึ่งมีอัตราการยึดเกาะใกล้เคียงกับงานวิจัยครั้งนี้ ดังนั้นแสดงว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MP9 และ MP10 มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้



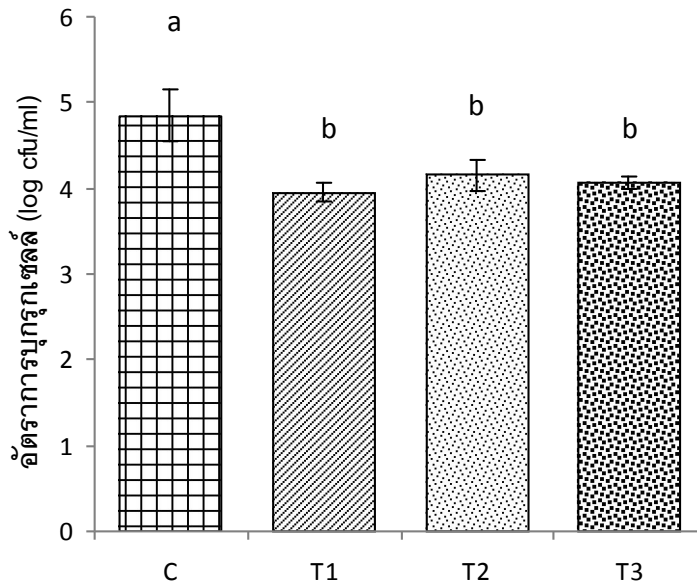
A

ภาพที่ 3. อัตราการยึดเกาะของ *B. subtilis* MP9 (B, เชื้อเริ่มต้น; A, เชื้อที่ยึดเกาะ) และ *B. subtilis* MP10 (B, เชื้อเริ่มต้น; A, เชื้อที่ยึดเกาะ) กับเซลล์ Caco-2

3. การยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* โดย *B. subtilis* NC

คุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อก่อโรคนั้น จะต้องมีความสามารถในการเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย ดังนั้นบริเวณที่เชื้อก่อโรคเข้ามาสัมผัสบริเวณแรกซึ่งก็คือเยื่อบุผิวลำไส้จึงมีความสำคัญต่อการติดเชื้อของเชื้อก่อโรค ซึ่งขั้นตอนในการติดเชื้อของเชื้อก่อโรคนั้นจะเริ่มจากเชื้อก่อโรคเข้ายึดเกาะอพิททีเลียเซลล์ของลำไส้ จากนั้นก็จะบุกรุกเข้าสู่เซลล์และเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Darwin and Miller, 1999) การศึกษาถึงการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อก่อโรคนั้น ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่จะศึกษาถึงวิธีการป้องกันการติดเชื้อของเชื้อก่อโรค (Golowczyc et al., 2007) ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ *B. subtilis* NC ต่อการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของ *S. enteritidis* ครั้งนี้พบว่าในทุกกลุ่มทดลองของ *B. subtilis* NC ทั้งการนำเซลล์แบคทีเรียโดยตรง (T1), Cell free supernatant (T2) และ Cell free supernatant ที่มีการปรับ pH 7 (T3) มีความสามารถในการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการบุกรุกเซลล์ของ *S. enteritidis* เท่ากับ 3.95, 4.16 และ 4.07 log cfu/ml

ตามลำดับ เมื่อใช้ *S. enteritidis* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 8.07 log cfu/ml โดยพบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราการบุกรุกเซลล์สูงถึง 4.84 log cfu/ml (รูปที่ 4) ผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่านอกจากตัวเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* NC แล้ว สารต่างๆ



ภาพที่ 4. อัตราการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* (Control (C), *B. subtilis* NC (T1), Cell free supernatant (T2) และ Cell free supernatant ที่มีการปรับ pH 7 (T3))

ที่แบคทีเรียดังกล่าวผลิตขึ้นก็สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* ได้เช่นเดียวกัน โดยสังเกตดูผลจากการกลุ่มที่มีการกรองเอา *B. subtilis* NC ออก (T2) หรือกลุ่มที่มีการปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 หลังจากที่มีการกรองเอาแบคทีเรียนี้ออก (T3) ซึ่งแสดงว่า *B. subtilis* NC ดังกล่าวอาจจะมีหลายวิธีการที่สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* อาทิเช่น ผลิตสารต่อต้านเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ หรือสามารถแย่งพื้นที่เกาะกับเซลล์เยื่อผิวของลำไส้ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Tsai et al. (2005) ที่พบว่า *Lactobacillus* สายพันธุ์ LAP5 และ LF33 สามารถยับยั้งการบุกรุกของ *S. typhimurium* เข้าสู่เซลล์ต้นตอชนิดิพีทีเลียมเซลล์ของลำไส้มนุษย์ นอกจากนั้นยังมีรายงานที่พบว่า โปรไบโอติกแบคทีเรียหลายชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคกับเซลล์ Caco-2 (Lee et al., 2003; Gagnon et al., 2004; Bogovic Matijasis et al., 2006; Golowczyc et al., 2007) จาก

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงว่า *B. subtilis* NC สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* ได้



1. การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ Caco-2 ในอาหาร DMEM ที่มีการเสริม Fetal calf serum, 10%; Non essential amino acid, 1%; Penicillin-streptomycin, 1% ในสูตรอาหารเพิ่มเติม พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์เป็นไปอย่างค่อนข้างช้าโดยเซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 35 - 42 วัน ลักษณะรูปร่างของเซลล์เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะทรงกลม มีขนาดเล็ก แขนงลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์เติบโต

เต็มทีแล้วจะมีลักษณะรูปร่างหลายรูปแบบ เช่น ทรงกลม กระสวย ทรงหลายเหลี่ยม เซลล์จะเจริญ แล้วยึดเกาะกับวัสดุเพาะเลี้ยงเป็นแผ่นชั้นเดียว

2. อัตราการยึดเกาะของ *Bacillus subtilis* MP9 และ MP10 กับเซลล์ Caco-2 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ค่อนข้างสูง คือมีอัตราการยึดเกาะเท่ากับ 3.35 และ 3.37 log cfu/ml ในขณะที่มีเชื้อเริ่มต้น 6.39 และ 6.38 log cfu/ml ตามลำดับ

3. ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* NC ต่อการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* พบว่าทั้งการใช้เซลล์ *B. subtilis* NC โดยตรง หรือ Cell free supernatant หรือ Cell free supernatant ที่มีการปรับ pH 7 มีความสามารถในการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของ *S. enteritidis* เท่ากับ 3.95, 4.16 และ 4.07 log cfu/ml ตามลำดับของกลุ่มทดลอง ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการบุกรุกเซลล์เท่ากับ 4.84 log cfu/ml

ผลจากการทดลองครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เพื่อการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียในเชิงคุณภาพ คือเป็นรูปแบบจำลองของการยึดเกาะและการยับยั้งการบุกรุกของเชื้อก่อโรคกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้โดยการใช้โปรไบโอติกแบคทีเรีย

เอกสารอ้างอิง

- Adami, A. and Cavazzoni, V. 1999. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. J. Basic Microbiol. 39: 3-9.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A.L. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. Appl. Environ. Microbil. 59: 4121-4128.
- Blay, L.G., Fliss, I. and Lacroix, C. 2004. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cell with ELISA, radioactivity and plate count methods. Journal of Microbiological Methods. 59: 211-221.
- Bibiloni, R., Perez, F.P. and Antoni, D.L.G. 1999. Will a High adhering Capacity in a Probiotic Strain Guarantee Exclusion of Pathogens from Intestinal Epithelia. Anaerobe. 5: 519-524.
- Brassart, D., Neeser, J.-R., Michetti, P. and Servin, A.L. 1994. The selection of dairy bacterial strains with probiotic properties based on their adhesion to human intestinal epithelial cell. In: Proceedings of Lactic '94, 7-9 September 1994, Caen, France, pp. 201-212.
- Coconnier, M.H., Bernet, M.F., Kerneis, S., Chauviere, G., Fourniat, J. and Servin, A. L. 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. FEMS. Microbiol. Lett. 110: 299-306.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. 1978. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1-12.
- Darwin, K.H. and Miller, V.L. 1999. Molecular basic of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. Clinical Microbiology Reviews 12, 405-428.
- Finegold, S.M., Attebery, H.R. and Sutter, V.L. 1974. Effect of diet on human fecal flora. Comparison of Japanese and American diets. Am. J. Clin. Nutr. 37, 1456-1469.

- Francis, C., Janky, D.M., Arafa, A.S. and Harms, R.H. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poult. Poult. Sci. 57: 1678-1689.
- Fuller, R. 1978. Epithelial attachment and other factors controlling the colonization of the intestine of the gnotobiotic chicken by lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 45: 389-395.
- Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- Fuller, R. and Gibson, G. R. 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 222: 28-31.
- Gagnon, M., Kheadr, E.E., Blay, G.L. and Fliss I. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by Bifidobacterial strains of human origin. International Journal of Food Microbiology. 92:69-78.
- Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Abraham, A.G. and Antoni, D. 2007. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. International Journal of Food Microbiology. 118:264-273.
- Greene, J.D. and Klaenhammer, T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cell. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4487-4494.
- Gusils, C., Gonzalez, S.N. and Oliver, G. 1999. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. Can. J. Microbiol. 45: 981-987.
- Holzapfel, W.H. and Schilling U. 2002. Introduction to Pre- and Probiotics. Food Res Int. 35: 109-116.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N. and Jalaludin, S. 1996. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 9: 397-404.
- Jin, L.Z., Ho, H.W., Abdullah, N. and Jalaludin, S. 2000. Digestive and bacteria enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. Poult. Sci. 79: 886-891.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. and Salminen S. 2003. Displacement of bacteria pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J. Medical Microbiology. 52:925-930.

- Maruta, K., Miyazaki, H., Masuda, S., Takahashi, M., Marubashi, T., Tadano, Y. and Takahashi, H. 1996. Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3120 and its influence on the intestinal microflora in broiler. Anim. Sci. Technol. 67: 273-280.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B. and Tsakalidou E. 2006. Probitic protencial of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. International Dairy Journal. 16:189-199.
- Matijasic, B.B., Narat, M., Peternael M.Z. and Rpgelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cell and ex vivo on pigs'jejunal tissue. International Journal of Food Microbiology. 107: 92-96.
- Morelli, L. 2000. *In vitro* Selection of Probiotic Lactobacilli: A critical Appraisal. Microbiol. 1(2): 59-67.
- Naaber, P., Mikelsaar, R.H., Salminen, S. and Mikelsaar, M. 1998. Bacterial translocation, intestinal microflora and morphological changes of intestinal mucosa in experimental models of *Clostridium difficile* infection. J. Med. Microbiol. 47: 591-598.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. and Salminen, S. 1999. Probiotics: Mechanisms and Established Effects. Curr Opin Biotechnol. 13: 517-521.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B, Sorokulova, I.B., Megraud, F. and Urdaci, M. C. 2001. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of the probiotic strain Bacillus subtilis 3 is due to secretion of antibiotics. Antimicrob. Agents. Chemother. 45: 3156-3161.
- Printo, M., Robineleon, S., Appay, M.D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simonassmann, P., Haffen, K., Fogh, J. and Zweibaum, A., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. Biol. Cell 47, 323-330.
- Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R., and Cook, R.L. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia Coli* and coaggregation ability with urophatogens. Can. J. Microbiol. 34: 344-351.

- Salminen, S., Lain, M., von Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional food: a Nordic and European approach. *Biosci. Microflora* 15, 61-67.
- Samanya, M. and Yamauchi, K. 2002. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 133: 95-104.
- Shu, Q. and Gill, H. S. 2001. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* 0157:H7 infection in mice. *Med. Microbial. Immunol. (Berl)*. 189: 147-152.
- Spencer, R. J. and Chesson, A. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 215-220.
- Tuomola, M. E. and Salminen, J. S. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 45-51.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *J Clin Nutr.* 73: 393S-8S.
- Tsai, C.C., Hsieh, H.Y., Chiu, H.H., Lai, Y.Y., Liu, J.H., Yu, B. and Tsen, H.T. 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 185-194.
- Usman, and Hosono, A. 2000. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *J. Dairy Sci.* 83: 1705-1711.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 655-671
- Watkins, B.A. and Miller, B.F. 1983. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci.* 62: 1772-1779.

Zubillage, M., Weil, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. and Boccio, J. 2001. Effect of Probiotics and Functional Foods and Their Use in Different Diseases. Nutr Res. 21: 569-57.



