Agricultural Sci. J. 49 : 3 (Suppl.) : 294-300 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 3 (พิเศษ) : 294-300 (2561)

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม

Screening of Lactic Acid Bacteria with Probitic Potentials from Industrial Wastes

รุ่งโรจน์ แท่นสมบัติ[1] และ สุวิชญา บัวชาติ[1*]

Rungrod Thansombat[1] and Suwichaya Buachad[1*]

[1]69 หมู่ 1 โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร กำแพงเพชร 62000

[1]69 Moo 1 Biology Program, Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, 62000, Thailand.

*Corresponding author: suwichaya.gift@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ โปรตีนถั่วเขียว จากโรงงานวุ้นเส้น กากมันสำปะหลัง และน้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง จากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อโพรไบโอติก โดยศึกษาความทนต่อกรด เกลือน้ำดี การยับยั้งเชื้อก่อโรค และความไวต่อยาปฏิชีวนะ นำแบคทีเรียกรดแลคติก 11 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรด 2.5 และที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.3 พบว่าไอโซเลท W2, W4, W5 และ W14 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี โดยมีอัตราการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดอยู่ที่ร้อยละ 50.00, 85.44, 59.21 และ 72.99 ตามลำดับ และอัตราการรอดชีวิตในสภาวะเกลือน้ำดีอยู่ที่ร้อยละ 60.87, 71.80, 50.74 และ 57.16 ตามลำดับ พบว่าไอโซเลท W2 และ W14 สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อ *Salmonella* spp. พบว่า ไอโซเลททั้งหมดมีความไวต่อยา Chloramphenecal และ Ampicillin โดยไอโซเลท W4 สามารถรอดชีวิตในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้ได้มากกว่าร้อยละ 70 และไอโซเลท W4, W2 และ W14 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้มากกว่า 1 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติหลักของโพรไบโอติก โดยทั้ง 3 ไอโซเลทเหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติก

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, โพรไบโอติก, เชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

ABSTRACT

The objective of the study was to screening of potential probiotic lactic acid bacteria from industrial waste (mungbean protein; vermicelli factory , cassava waste and water cassava pulp; cassava starch factory). The isolates were investigated for probiotic starter properties such as acid tolerance, bile salt tolerance, antimicrobial activity, antibiotic. Eleven isolates were tested for their tolerance on pH 2.5 and bile salt at concentrations of 0.30 %. In acid and bile salt condition, W2, W4, W5 and W14 isolates survived in range of 50.00 (60.87), 85.44 (71.80), 59.21 (50.74) and 72.99 (57.16) %, respectively. W2 and W14 isolates could inhibit both *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. These isolates were preliminarily screened for antibiotic susceptibility. It found that total isolates were susceptible to Chloramphenicol and Ampicillin. W4 isolate showed a survival rate of more than 70% under the simulated gastric juice and small intestinal juices. W2

and W14 isolate showed a inhibition of more than 1 pathogenic. The results found that two isolates, W4, W2 and W14 demonstrated good probiotic properties. These selected bacteria may be used in the future as potential probiotic starter cultures.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotic, pathogenic bacteria

บทนำ

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่เมื่อรับประทานในปริมาณที่พอเหมาะให้ประโยชน์ต่อสุขภาพแก่เจ้าบ้าน เช่นปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และช่วยย่อยแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Phumpookai, Arunchai and Vasboonma, 2004) ในประเทศไทยผลิตภัณฑ์ที่มีโปรไบโอติก ได้แก่ อาหารสัตว์ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอางและยา โปรไบโอติกโดยทั่วไปถูกแยกจากผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์หมัก ผลิตภัณฑ์จากข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ระบบทางเดินอาหาร และวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากมันสำปะหลัง เศษผักขยะ น้ำเสียจากนม (Perm, 2007; Oonsivila, 2013; Rauta *et al*. 2013; Sharma *et al*. 2018) แบคทีเรียแลคติกที่นิยมใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Bifidobacterium* (Lee *et al*., 2016) การให้โพรไบโอติก *Bacillus cereus* var. *toyoi* แก่แม่สุกรสามารถลดการส่งผ่านเชื้อ *Escherichia coli* สู่ลูกสุกร และลดอาการท้องเสียในฝูงลูกสุกร ทั้งให้อัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงขึ้น และมีอัตราแลกเนื้อที่ดีขึ้น (Scharek *et al*.; 2007; Taras *et al*., 2005) ผู้วิจัยจึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากโปรตีนถั่วเขียว กากและน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลัง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้ออาหารเสริมในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกากโปรตีนถั่วเขียวที่เหลือจากการผลิตวุ้นเส้นของโรงงานวุ้นเส้นจังหวัดกำแพงเพชร โดยใช้ตัวอย่าง 2 แบบ ได้แก่ โปรตีนถั่วเขียวแบบเปียกและแห้ง และตัวอย่างกากและน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง จังหวัดกำแพงเพชร ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยดัดแปลงวิธีของ Lee *et al*. (2016) นำตัวอย่างที่ค่าเจือจางเหมาะสมมาเกลี่ยลงบนอาหาร deMan Rogosa-Sharpe (MRS) agar (HiMedia, India) ที่เติม Calcium carbonate (Loba, India) ร้อยละ 1 บ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสมาทำการแยกให้เชื้อบริสุทธิ์

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

นำไอโซเลทมาศึกษารูปร่างเซลล์ และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อที่ย้อมติดสีม่วงรูปร่างท่อนไปทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส โดยทำการเสมียร์เชื้อลงบนแผ่นสไลด์จากนั้นหยดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 จำนวน 1 หยด ทำการอ่านผลภายใน 5 วินาที คัดเลือกไอโซเลทที่ไม่เกิดฟองนำไปศึกษาคุณสมบัติขั้นต่อไป

ศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อโพรไบโอติก ดัดแปลงวิธีของ Hernandez *et al.* (2016)

ความสามารถในการทนกรด

เลี้ยงไอโซเลทในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใส (Supernatant) ออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Excellence UV/VIS Spectrophotometers UV5BIO, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้ 0.6 นำหัวเชื้อที่ได้

เติมในอาหาร MRS broth ที่ปรับค่า pH ให้เป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl, RCL Labscan, Thailand) บ่มในสภาะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เก็บผลอัตราการรอดชีวิตที่ 0, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี

เลี้ยงไอโซเลทในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้ 0.6 นำหัวเชื้อที่ได้เติมในอาหาร MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (Bile salt, HiMedia, India) ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เก็บผลอัตราการรอดชีวิตที่ 0, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

เลี้ยงไอโซเลทในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland standards เบอร์ 0.5 (1×10^8 cfu/ml) ใช้ Swab ป้ายเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 074, *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 และ *Salmonella* sp. ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (HiMedia, India) จากนั้นปิเปตไอโซเลทปริมาณ 20 ไมโครลิตร หยดลงแผ่น disc ปลอดเชื้อ นำมาวางบนผิวอาหาร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

เลี้ยงไอโซเลทในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland standards เบอร์ 0.5 ใช้ Swab ป้ายไอโซเลทลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar วางแผ่นยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol 30 ไมโครกรัม Ampicillin 10 ไมโครกรัม และ Vancomycin 30 ไมโครกรัม โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นกลุ่มควบคุมบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ โคโลนี แบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างกรดแลคติกแล้วทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ได้เป็นอนุพันธ์เชิงซ้อนของ $Ca(C_3H_6O_3)_2$ ทำให้เกิดน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Moorehead and Shumway, 2008) ซึ่งสารเชิงซ้อน $Ca(C_3H_6O_3)_2$ ทำให้เกิดเป็นส่วนใสรอบโคโลนี พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจากโปรตีนถั่วเขียวชนิดเปียกจำนวน 16 ไอโซเลท และโปรตีนถั่วเขียวชนิดแห้งจำนวน 10 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 26 ไอโซเลท ส่วนตัวอย่างกากและน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลัง จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังไม่พบแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเลย

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 26 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นด้วยการย้อมสีแกรมและการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 11 ไอโซเลท ซึ่งวิจัยส่วนใหญ่กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกจะมีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนติดสีแกรมบวก เช่น ในสกุลของ *Lactobacillus*

ศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อโพรไบโอติก

ความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียหมด 11 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถการทนในสภาวะเป็นกรดที่ pH 2.5 ซึ่งจำลองสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของสัตว์ และสภาวะจำลองในลำไส้เล็กที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.3 ดังTable 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไอโซเลท W4 และ W14 สามารถเจริญได้ดีใน pH 2.5 ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 85.44 และ 72.99 ตามลำดับ รองลงมาคือ W5, W11, W7 และ W2 มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 59.21, 57.31, 54.70 และ 50.00 ตามลำดับ สอดคล้องกับ Lee *et al*. (2016) พบว่า *Lactobacillus plantarum* C182 สามารถเจริญได้ดีในสภาวะเป็นกรดที่ pH 3 โดยมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 52.50 ซึ่งสกุล *Lactobacilli* มีความสามารถในการทนกรดที่ pH ต่ำและสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี เมื่อทำการเพาะเชื้อในสภาวะเกลือน้ำดีร้อยละ 0.3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ไอโซเลท W1, D5 และ W4 มีอัตราการรอดชีวิตได้ดีอยู่ที่ร้อยละ 95.97, 74.80 และ 71.80 ตามลำดับ รองลงมาคือ W3, W2, W14 และ W5 โดยมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 62.84, 60.87, 57.16 และ 50.74 ตามลำดับ การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นอยู่กับความสามารถในการไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อลดความเป็นพิษเกลือน้ำดีต่อเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (Noriega *et al*., 2004)

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารเป็นสิ่งจำเป็นของเชื้อโพรไบโอติก โดยทำหน้าที่ในการปรับสมดุลของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ผลดังตารางที่ 2 เชื้อไอโซเลท W2 และ W14 สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ไอโซเลท W3, W5 และ W7 สามารถยับยั้งได้เพียงเชื้อ *E. coli* เช่นเดียวกับไอโซเลท W4 สามารถยับยั้งได้เพียงเชื้อ *Salmonella* spp. โดยพบว่าไอโซเลททั้งหมดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* Leite *et al*. (2015) รายงานว่าเชื้อ *Lactobaciilus paracasei* ที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แสดงว่า *S. aureus* มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติก Remiger *et al*. (1999) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียกอโรคในทางเดินอาหารได้ เนื่องจากมีการสร้างกรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรียชนิดอื่นได้

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นกลุ่มหลักที่นำมาใช้ทดสอบเชื้อโพรไบโอติก โดยเป็นยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในทางการแพทย์เพื่อใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง ในงานวิจัยของ Oh *et al*. (2018) ใช้ Kanamycin, Streptomycin, Gentamycin, Vancomycin, Erythromycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Clindamycin, Ampicillin และ Penicillin ในการทดสอบนี้จึงใช้ Chloramphenicol, Ampicillin และ Vancomycin ในการทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 11 ไอโซเลท มีความไวต่อยา Chloramphenicol และ Ampicillin ไอโซเลท W1, W2, W3, W11, D3, D5 และ D6 ไวต่อยา Vancomycin มีเพียงไอโซเลท W4, W5, W7 และ W14 ดื้อต่อยา Vancomycin ผลดังตารางที่ 3 เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 11 ไอโซเลท มีคุณสมบัติของการเป็นเชื้อโพรไบโอติกโดยมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ และบางไอโซเลทดื้อต่อยา Vancomycin Lee *et al*. (2016) รายงานการดื้อยา Vancomycin ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Leuconostoc mesenteroides* เช่นเดียวกับ Rojo *et al*. (2006) รายงานว่าเชื้อ *Oenococcus onei* ที่แยกได้จากสุกรดื้อต่อยา Vancomycin ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีกลไกการดื้อต่อยา Vancomycin จึงทำให้ยาถูกใช้ในทางการแพทย์ลดน้อยลง ในการที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะหรือดื้อต่อยาปฏิชีวนะนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อเอง

สรุป

พบว่าในโปรตีนถั่วเขียวจากโรงงานผลิตวุ้นเส้น มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท W4 สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีได้ดี โดยมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 70 ไอโซเลท W2 และ W14 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และเชื้อ *Salmonella* spp. ดังนั้นไอโซเลททั้ง 3 มีคุณบัติที่ดีของเชื้อโพรไบโอติกและเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้พัฒนาเป็นหัวเชื้อในอาหารสัตว์

เอกสารอ้างอิง

Hernandez, Y.G., T.P. Sanchez, R. Boucourt, J.L. Balcazar, J.R. Nicoli, J.M. Silva, Z. Rodriguez, H. Fuertes, O. Nunez, N. Albelo and N. Halaihel. 2016. Isolation, Characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. Res Vet Sci. 108: 125 – 132.

Lee, K.W., J.M. Shim, S.K. Park, H.J. Heo, H.J. Kim, K.S. Ham and J.H. Kim. 2016. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. LWT - Food Sci Technol. 71: 130 – 137.

Leite, A.M.O., M.A.L. Migule, R.S. Peixoto, P.R. Madiedo, V.M.F. Paschoalin, B. Mayo and S. Delgado. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazillian kefir grains. J Dairy Sci. 98: 3622 – 9265.

Moorehead, A.W. and W.W. Shumway. 2008. Methods and compositions relating to the control of the rates of acid generating compounds in acidizing operations. United States Patent. PP. 1-24.

Noriega, L., M. Gueimonde, B. Sanchez, A. Margolles and C.G. Reyes-Gavilan. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in Bifidobacterium. Int. J. Food Microbiol.. 92: 79 – 86.

Oh, A., E.B. Daliri and D.H. Oh. 2018. Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: In vitro and *Caenorhabditis elegans* model testing. LWT - Food Sci Technol. 88: 132 – 138.

Oonsivila, R. 2013. Isolation of probiotics from cassava by-product. ASEAN Food Conference, Singapore.

Perm, A. 2007. Lactic acid bacteria. Bangkok: Parbpim. (in Thai)

Phumpookai, T., L. Arunchai and W. Vasboonma. 2004. Screening and study on properties of probiotic isolated from various samples. Research project, Applied Biology Program, Nakhon Pathom Rajabhat University. 111 pages. (in Thai)

Rauta, P.R., M. Dhupal and B. Nayak. 2013. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from vegetable waste and fish intestine. IJCMAS. 2: 234 – 244.

Remiger A., M.A. Eijsink Ehrmann, K. Sletten, I.F. Nes and R.F. Vogel. 1999. Purification and partial amino acid and sequence of plantaricin 1.25 α and 1.25 β, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. J. Appl. Microbiol. 86: 1053 – 1058.

Rojo-Bezares, B., Y. Saenz, P. Poeta, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea and C. Torres. 2006. Assensment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolate from wine. Int. J. Food Microbiol. 111: 234 – 240.

Scharek, L., J. Guth, M. Filter and M.F. Schmidt. 2007. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. Arch Anim Nutr. 61: 223 – 234.

Sharma, N., Y. Neetu, B. Harshita, C. Darshan and S. Bhumesh. 2018. Screening of lactic acid bacteria from effluent samples of jaipur dairy. Int J Waste Resour. 8: 1 – 4.

Taras, D., W. Vahjen, M. Macha and O. Simon. 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. Arch Anim Nutr. 59: 405 – 417.

Table 1 Acid and bile salt tolerance of selected isolates.

Isolate	Survival rate (%)	
	pH 2.5	Bile salt 0.3%
W1	35.18	95.97
W2	50.00	60.87
W3	43.35	62.84
W4	85.44	71.80
W5	59.21	50.74
W7	54.70	36.76
W11	57.31	36.57
W14	72.99	57.16
D3	5.30	47.45
D5	18.48	74.80
D6	10.89	49.21

Table 2 Antimicrobial activity of selected isolates against different bacteria.

Isolate	Diameter of inhibition zones (mm)		
	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* spp.
W1	-	-	-
W2	7.33 ± 0.57[bc]	-	7.00 ± 0.00[a]
W3	8.00 ± 0.00[a]	-	-
W4	-	-	6.66 ± 0.57[b]
W5	7.00 ± 0.00[c]	-	-
W7	7.66 ± 0.57[ab]	-	-
W11	-	-	-
W14	7.00 ± 0.00[c]	-	7.00 ± 0.00[a]
D3	-	-	-
D5	-	-	-
D6	-	-	-

Different letters within a column indicate differences determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) at the 95 percent level of significance.

Table 3 Antibiotic susceptibility of the selected isolates.

Isolate	Diameter of inhibition zones (mm)		
	Chloramphenecal	Ampicillin	Vancomycin
W1	41.66 ± 1.52[bc]	45.66 ± 0.57[ab]	30.66 ± 1.15[a]
W2	45.66 ± 1.52[ab]	46.66 ± 1.15[ab]	30.00 ± 0.00[a]
W3	41.33 ± 2.30[bc]	41.33 ± 2.30[c]	30.00 ± 0.00[a]
W4	35.33 ± 0.57[cd]	38.33 ± 0.57[d]	-
W5	51.33 ± 2.30[a]	47.66 ± 2.51[a]	-
W7	38.66 ± 1.15[bcd]	35.66 ± 0.57[e]	-
W11	35.66 ± 1.15[cd]	44.66 ± 1.15[b]	30.33 ± 0.57[a]
W14	38.33 ± 1.15[bcd]	38.66 ± 1.15[d]	-
D3	30.33 ± 0.57[d]	25.66 ± 1.15[f]	23.66 ± 0.57[c]
D5	35.33 ± 0.57[cd]	35.00 ± 0.00[e]	30.00 ±0.00[a]
D6	30.33 ± 0.57[e]	26.66 ± 1.15[f]	24.66 ± 0.57[b]

Different letters within a column indicate differences determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) at the 95 percent level of significance.