

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

乳酸菌抗腸毒性大腸桿菌生長和吸附能力之抑菌活性體外
試驗

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-041-001-

執行期間：94年01月01日至94年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學食品科技系

計畫主持人：蔡政志

計畫參與人員：林佩佩

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

中文摘要

腸毒性大腸桿菌為主要造成人類下痢之病原菌之一，發生於開發中國家的幼童和從熱帶或亞熱帶地區的工業國家遊覽的旅客，腸毒性大腸桿菌也有造成學校和餐廳食物中毒之案件。由文獻得知，益生菌可以抑制人體和動物腸道病原菌的生長，以及促進動物生長。可能的作用機制為益生菌產酸或代謝產物造成對病原菌的抑制。本計劃從健康嬰兒糞便進行篩選具吸附能力的乳酸菌，再評估具吸附能力的乳酸菌抑制腸毒性大腸桿菌生長和吸附細胞之抗菌活性。本研究利用 C2BBel (Caco-2) 探討乳酸菌吸附能力以及與病原菌競爭性排除吸附細胞。為了篩選出可供人類使用之具潛力益生菌，本計劃探討經過消化道模擬環境試驗後之殘存乳酸菌對腸道細胞株之吸附能力，以及由體外試驗了解抑制腸毒性大腸桿菌生長之能力是否受影響。最後再評估乳酸菌抗菌活性經過加熱 (100 °C, 15 分鐘) 和分解酵素後之抑制能力的影響。結果發現 *Lactococcus lactis* RY2、*Lactobacillus salivarius* MM1 和 *L. paracasei* En4 具耐酸、耐膽鹽及抑制 ETEC 之潛力。其中，RY2 和 MM1 對人類腸道細胞 C2BBel (Caco-2) 具良好吸附能力，其抑菌能力與乳酸菌產酸能力有關。

關鍵詞：腸毒性大腸桿菌、乳酸菌、細胞培養、吸附試驗

Abstract

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is a major cause of sporadic diarrhea disease in humans, affecting mainly children in developing countries and travelers from industrialized countries visiting tropical or subtropical areas. ETEC strains have also caused food-borne outbreaks at schools and restaurants. Probiotics are known to be inhibitory to the growth of a wide range of intestinal pathogens in human and animals. They are also able to promote the growth of animals. Possible mechanisms of action include the production of acid and other by-products of bacterial metabolism. In this study, we will screen adhesive lactic acid bacteria (LAB) strains among isolate from infant stool. Anti-adhesion activity against ETEC will be evaluated using adhesive LAB strains. We have been developed for study of the adhesion of probiotic lactic acid bacteria and the competitive exclusion of pathogenic bacteria by the C2BBel (Caco-2) cell line. In order to obtain potential LAB strains for human probiotic use, in this study, LAB strains with survival rates from the simulated GI conditions and with good adhering capability to the intestinal epithelium cells will be then further evaluated for their antagonistic effect against the growth of ETEC *in vitro*. We then will study the effect of heat (100°C, 15 min), protease treatment, and the dilution factors on the antagonistic activity of LAB. Results had been found that *Lactococcus lactis* RY2, *Lactobacillus salivarius* MM1 and *L. paracasei* En4 were acid as well as bile tolerant. *Lact. lactis* RY2 and *L. salivarius* MM1 were able to adhere to the cultured human intestinal C2BBel (Caco-2) cell line. For the antagonistic effect, pH and acids in LAB-SCS might play the major role.

Keyword: Enterotoxigenic *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, cell culture, adhesion

一、前言

致病性大腸桿菌對於人類之發病部位和症狀並不盡相同。一般將導致人體腹瀉之大腸桿菌，稱為下痢性大腸桿菌。腸毒性大腸桿菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) 於 1968 年首次被認為可導致人類腹瀉 (Gorbach *et al.*, 1971)。一般研究顯示，ETEC 為衛生條件不良的熱帶開發中國家之嬰幼兒及當地旅行者腹瀉的重要病因之一 (Levine, 1987; Robertson *et al.*, 1985)。ETEC 使人、畜腹瀉原因有二：一是具特異性的吸附於腸上皮黏膜細胞之纖毛 (Moon *et al.*, 1979)；二是產生腸毒素，使腸道內之電解質失去平衡而導致腹瀉 (Echeverria *et al.*, 1990)。

ETEC 產生之腸毒素，依其對熱之穩定性，可分為熱穩定性腸毒素 (heat-stable toxin, ST) 及熱不穩定性腸毒素 (heat-labile toxin, LT)；可能產生一種或二者皆有 (Echeverria *et al.*, 1990)。LT 具抗原性，於 65°C 加熱 30 分鐘即失去活性，可分為 LT I 及 LT II，而 LT I 又依來源宿主不同分為 LT Ip 及 LT Ih。其中 LT Ip 為以動物 (如：豬) 來源之 ETEC 所產生，LT Ih 則僅分離自人類腹瀉患者 (Echeverria *et al.*, 1990)。ST 則為不具抗原性之多肽 (polypeptide)，可分為 ST I 及 ST II (Burgess *et al.*, 1978)。ST I 根據來源之不同又分為 ST Ia 及 ST Ib。

在瑞典，學者發現兒童下痢案件中，14% 為腸毒性大腸桿菌所造成，其中以 0~3 歲之幼童發生率最高 (93%)，並以 ST 毒素型較多 (Qadri *et al.*, 2000)。Okeke *et al.* (2000) 同樣收集兒童檢體，亦發現以 ST 毒素型腸毒性大腸桿菌較多。在畜牧業常見腸毒性大腸桿菌感染 0~4 天的初生仔豬，主要以 STIa 和 STII 毒素型感染宿主，造成仔豬下痢或休克，嚴重甚至死亡，稱作初生哺乳豬大腸桿菌症 (Casey *et al.*, 1998)。大腸桿菌症除造成仔豬下痢之外，亦會導致成豬引發乳房炎和子宮內膜炎，嚴重則造成流產，降低豬隻生育率，並以腸毒性大腸桿菌之分離率最高。目前，仍用抗生素治療法，但近幾年發現，病原性大腸桿菌為多重抗藥性類型，並對第一線抗生素頭孢素具高度抗藥性，造成臨床上治療的困難。另一方面，乳酸菌為重要的益生菌，可做為人畜之生菌劑使用。研究證明，乳酸菌具有抑制病原菌生長及感染之能力。因此，使用益生菌治療法取代抗生素，才可減緩人畜抗藥性之問題。

有鑑於目前台灣用乳酸菌菌株來源包括國外進口及國內生產，但相關學術研究的資料較為缺乏，功能性不明確，且缺乏學術資料支持。本研究將探討數株標準菌和本土型乳酸菌對腸毒性大腸桿菌之抑制生長與對腸道細胞吸附能力，期能找出抑制能力最佳之益生菌，減少腸毒性大腸桿菌之腸胃道感染，防止細菌性下痢。

二、研究方法

(一) 菌株與細胞株

本研究使用之腸毒性大腸桿菌共八株，包括人類來源標準菌 ATCC 35401 (LT Ih and ST Ih)，UM4247 (ST II) 和台灣人類臨床分離菌株 EK06 (ST Ia)，EK02 (ST Ia) 共三株。動物來源標準菌 ATCC 37218 (LT Ip) 和台灣豬臨床分離菌株 ES02 (ST II)，EP18 (LT I+ST II)，ES10 (ST Ia+ST II) 和 ES12 (LT I+ST Ia+ST II) 共五株。腸毒性大腸桿菌菌株包括人類來源和

豬隻來源之標準菌株和台灣臨床分離菌株，並包括各種不同毒素型之類型 (Table 1)，以評估乳酸菌對於不同類型腸毒性大腸桿菌是否皆具有抑制能力。

乳酸菌自嬰兒糞便中篩選之菌株三株進行研究。細胞株 WiDr (BCRC 60157)和 C2BBel (BCRC 60182) 乃購自食品工業研究所生物資源保存及研究中心，WiDr (derivative of HT-29) 與 C2BBel (clone of Caco-2) 為人類結腸腺癌。

(二) 抑菌圈抑菌活性之評估

試驗方法乃參考自 Rammelsberg與Radler (1990)，將隔夜培養於LB broth之指標菌株，稀釋至 10^7 CFU/mL，以無菌棉棒塗抹於Nutrition agar培養盤上。待菌液乾燥後，以無菌tip在培養盤上打出直徑 9 mm之孔洞。取 1 mL培養 20 小時之乳酸菌菌液，經 6000 rpm，10 分鐘離心後，取 100 μ l上清液小心注入培養盤上之孔洞內，切勿使菌液溢出造成誤差。將培養盤置於 4 °C，使菌液先行擴散 2 小時。將培養盤移至 37 °C培養箱，正面放置培養，培養 14~15 小時後，測量其抑菌圈直徑大小。

本試驗將乳酸菌抑菌能力，依抑菌圈大小分為 4 級，抑菌圈直徑小於等於 11 mm 者為負「-」；介於 11~16 mm 者為具第一級抑制能力「+」；介於 17~22 mm 者為具第二級抑制能力「++」；而直徑大於等於 23 mm 以上者為具第三級抑制能力「+++」。抑菌圈越大，表示乳酸菌對該指標菌之抑菌能力越強。

(三) ETEC 與乳酸菌共培養之試管試驗

此方法根據 Forestier et al. (2001)，Elotmani et al. (2002) 和Drago et al. (1997) 之方法修飾之，5 mL LB broth (10^5 CFU/mL) ETEC 菌液加入 5 mL最適乳酸菌培養液上清液或 10^5 CFU/mL菌液混和培養，經 3, 6, 12, 和 24 小時，取菌液系列稀釋，以 MRS agar和 MacConkey agar計數乳酸菌和大腸桿菌之菌落數。

(四) ETEC 對 WiDr 或 C2BBel 細胞株之吸附試驗

根據Yamamoto et al. (1992) 之方法加以修飾。取一 24-well plate，將培養形成單層(mono layer) 的WiDr或C2BBel細胞之T75 flask，以 1×PBS buffer清洗T75 flask兩次，加入 1% trypsin/EDTA約 1 mL進行消化使細胞懸浮。加入新鮮適合培養液後，每個 well加入 0.5 mL細胞懸浮液 (約 2×10^5 cells/mL)，於 37°C、CO₂氣體培養。每個 well加入 0.5 mL 1×PBS buffer 清洗，洗淨舊的培養液和去除未附著之細胞，重複清洗兩次。加入新鮮適合培養液，以及 20 μ L ETEC (培養於 3 mL LB 八小時，約 10^6 cfu/mL)，於 37 °C、CO₂氣體培養 2 小時。1×PBS buffer清洗三次，加入 10% formalin 200 μ L以 100 rpm轉速搖晃固定 15-20 分鐘，使菌體和細胞固定於well內。加入 0.5 mL 1×PBS buffer清洗三次。加入經濾紙粗過濾的crystal violet 200 μ L染色 5 分鐘，加入 0.5 mL 1×PBS buffer清洗去除多餘染劑。使用倒立式螢光顯微鏡下觀察，隨機取 20 個視野並計數吸附於細胞株之 ETEC 菌數。

(五) 乳酸菌抑制 ETEC 吸附腸道細胞株試驗

根據 Forestier et al.(2001) 之方法修飾之。吸附試驗所使用之 ETEC 接種於 LB Broth 培養基中，經培養 12 小時後以 6000 rpm 離心 10 分鐘收集菌體，並以無菌磷酸鹽緩衝溶液

清洗後，懸浮於同體積之磷酸鹽緩衝溶液中。菌液經系列稀釋，以平板計數法於營養培養基培養，進行活菌數之計數。

將 T75 flask 中之腸道細胞 WiDr 或 C2BBel 以 1 ml trypsin-EDTA 消化處理後，輕拍 flask 將細胞拍下，分裝於 96-孔洞微量培養盤，每個孔洞中加入 1×10^5 cells/ml，經培養隔夜，使形成 monolayer cell 後，除去舊有的培養基，加入 100 μ l 無抗生素之細胞培養基。取 50 μ l 前述製備之乳酸菌菌液 (bacterial culture) 及上清液 (spent culture supernatant) 共四種樣品，分別加入細胞培養盤之各孔洞中，置於 37 $^{\circ}$ C，5 % CO₂ 之下培養1小時。以 ETEC 懸浮液，經適當稀釋後取出 50 μ l，加入各孔洞內使終濃度為 5×10^7 CFU/well，細胞培養盤移至細胞培養箱培養 2小時後，以磷酸鹽緩衝溶液清洗各孔洞五次，以洗去殘存於細胞外的乳酸菌和 ETEC 菌體後，加入 100 μ L 無菌 triton X-100 (1%) 進行 10分鐘之細胞裂解作用後，以微量吸管劇烈混和各孔洞內之混和液，取出混和液以 1x PBS 進行序列稀釋，以 MRS agar和 MacConkey agar經培養 48小時，計數吸附 WiDr 或 C2BBel 細胞之乳酸菌和 ETEC 菌數。另再試驗乳酸菌和病原菌 (10^8 cfu/mL) 同時加入培養 1小時，或先加入病原菌培養 30分鐘，再加入乳酸菌培養 1小時。以評估乳酸菌在前培養、共培養和後培養時期抑制 ETEC 對腸道細胞的吸附作用。

(六) 乳酸菌液經加熱、酵素分解作用對抑菌能力之影響

本研究參考 Franz et al.(1996)，Gopal et al.(2001)和 Todoriki et al.(2001) 之方法。將乳酸菌液經100 $^{\circ}$ C 加熱15分鐘，使菌體死亡。觀察上清液中的抑菌成份添加酵素，產生分解作用，觀察抑菌成份是否為乳酸、胜肽或過氧化氫。分解酵素包括 lactate dehydrogenase (250 μ g/ml)，amylase，trypsin (200 μ g/ml)，chymotrypsin，pepsin，pronase (200 μ g/ml)，proteinase K (1 mg/mL) 或 catalase (0.5 μ g/mL) 作用1 h，37 $^{\circ}$ C後，再進行上述抑菌圈抑菌試驗，以評估是否影響乳酸菌液的抑菌能力。

三、結果與討論

本試驗利用三種篩選性培養基 (LP 洋菜培養基、Rogosa SL Agar 培養基、MRS agar 培養基) 篩選出 180 株嬰兒來源乳酸菌株，經三次抑菌圈試驗，篩選出六株抑菌能力佳的乳酸菌 (Table 2 和 3)，其抑菌圈直徑皆大於 20 mm 以上，並進行 API 50 CHL 鑑定，結果顯示六株乳酸菌分為三種乳酸菌種 (Table 4)，於其中挑出三株潛力佳之乳酸菌，經 API 50 CHL 鑑定為 *Lactococcus lactis* RY2、*Lactobacillus salivarius* MM1 及 *Lactobacillus paracasei* En4。為了模擬乳酸菌經人體腸胃道消化後其存活率，進行耐酸耐膽鹽試驗，耐酸試驗結果顯示三株乳酸菌不論在 pH 2.0、2.5、3.0 的酸性環境下，其活菌數幾乎沒有減少，具有高耐酸性 (Table 5)；耐膽鹽試驗結果顯示經 pH 2.0 之磷酸鹽溶液處理三小時之三株乳酸菌，再培養於 MRS broth 及 MRS-bile broth (0.3% oxgall) 3、12 及 24 小時後，三株乳酸菌對於膽鹽耐受性也極高 (Table 6)。

Bernet 等學者 (1994) 研究發現，對腸道細胞株具有吸附性的乳酸菌可抑制致病菌侵入，因此腸道附著性亦是篩選作為益生菌之良好乳酸菌的優勢條件之一，因此將三株乳酸菌進行人類腸道細胞株 Caco-2 吸附試驗 (Fig. 1)，結果顯示 En4 菌株吸附能力較差，推論其抑菌能力非藉由吸附能力與病原菌進行競爭排除有關，而是產生一些抑菌物質。為進

一步探討三株乳酸菌之抗菌物質，將其上清液進行酵素分解作用、加熱以及調 pH 至中性 7.2 之抑菌圈試驗 (Fig. 2)，初步結果證明抑菌能力會受到 lactate dehydrogenase 及調 pH 至 7.2 影響 (Table 7 和 8)，推斷其抑菌機制跟產酸能力有關，而上清液經 trypsin、pepsin、pronase 及 proteinase K 等蛋白質分解酵素作用後，其抑菌能力影響不大，蛋白質抑菌成份影響較小 (Table 8)；上清液經 amylase、chymotrypsin 及 catalase 酵素作用及加熱處理 (100 °C, 15 min) 後，則抑菌能力未受影響 (Table 8 和 9)。

腸毒性大腸桿菌 (ETEC) 對 C2BBel (Caco-2) 細胞株之吸附試驗，結果顯示台灣豬臨床分離菌株 ES 12 吸附性最差，台灣人類臨床分離菌株 EK06 次之；台灣豬臨床分離菌株 EP 18 吸附性最好，ES 10 次之 (Fig. 3 和 4)，未來，三株乳酸菌需再進行體外和體內抗腸毒型大腸桿菌試驗後，了解其競爭排除情形。

四、參考文獻

- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by nterovirulent bacteria. *Gut*. 35:483-9.
- Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A. and Newsome, P.M. 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect. Immun.* 21: 526-31.
- Casey, T.A., Herring, C.J., Schneider, R.A., Bosworth, B.T. and Whipp, S.C. 1998. Expression of heat-stable enterotoxin STb by adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs. *Infect. Immun.* 66:1270-2.
- Drago, L., Gismondo, M.R., Lombardi, A., de Haen, C. and Gozzini, L. 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 455-63.
- Echeverria, P., J. Seriwatana, O. Sethabutr and A. Chatkaeomrakot. 1990. Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* using nucleotide probes. In: *Gene Probe for Bacteria*, Macario, A. J. L. *et al.* (eds.), 1st. Ch. 4 pp.95-141, Academic Press, Inc. CA. USA.
- Elotmani, F., Revol-Junelles, A.M., Assobhei, O. and Milliere, J.B. 2002. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. *Curr Microbiol.* 44:10-17.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152: 167-73.
- Franz, C.M., Schillinger, U. and Holzappel, W.H. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29:255-70.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. and Gill, H.S. 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their

- antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 67: 207-16.
- Gorbach, S.L., Banwell, J.G., Chatterjee, B.D., Jacobs, B. and Sack, R.B. 1971. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. alterations in intestinal microflora. J. Clin. Investigation. 50: 881-9.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Diseases. 155: 377-89.
- Moon, H. W., R. E. Isaacsson and J. Pohlenz. 1979. Mechanisms of association of enteropathogenic *Escherichia coli* with intestinal epithelium. American J. Clin. Nutri. 32:119-127.
- Okeke, I.N., Lamikanra, A., Steinruck, H. and Kaper, J.B. 2000. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. J. Clin. Microbiol. 38: 7-12.
- Qadri, F., Das, S.K., Faruque, A.S., Fuchs, G.J., Albert, M.J., Sack, R.B. and Svennerholm, A.M. 2000. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 38: 27-31.
- Rammelsberg, M. and Radler, F. 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bacteriol. 69: 177-84.
- Robertson, D.C., Mcdonel, J.L. and Dorner, F. 1985. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Pharmacology & Therapeutics. 28: 303-339.
- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S. and Toba, T. 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. J. Appl. Microbiol. 91: 154-59.
- Yamamoto, T., Koyama, Y., Sonoda, E., Nakayama, S., Uchimura, M., Paveenkittiporn, W., Tamura, K., Yokota, T. and Echeverria, P. 1992. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. J. Infect. Diseases. 166: 1295-310.

Table 1. *Escherichia coli* bacteria strains used in this study.

Lab No.	Source	Region of isolation	Toxin Type a or virulence factor	Year of Isolation
T 01	ATCC 35401	人類來源標準菌株	LTIIh+STIIh	(血清型 O178:H11)
T 10	UM 4247	人類來源標準菌株	STII	
ES 02	下痢	屏東	STII	1998
ES 10	腸管	養豬所	STIIa+STII LTI+	2000
ES 12	腸管	官田	STIIa+STII	2000
EK 06	Blood	台南成大醫院	STIIa	1998
EP 18		屏東	LTIp+STII	1987
EWD 299	ATCC 37218	動物來源標準菌株	LTIp	

Table 2. Antimicrobial activity of cell free spent broth of lactobacillus strains against eight enterotoxigenic *Escherichia coli*.

ETEC Strains	Zones of inhibition (mm) produced by spent culture medium (SCS) of lactic acid bacteria					
	RW1	RW3	MM1	RM1	En4	RY2
T01	22	21	21	20	23	23
EWD299	30	30	32	30	32	32

Table 3. Antimicrobial activity of cell free spent broth of three lactic acid bacteria strains against eight enterotoxigenic *Escherichia coli*.

LAB	zone diameter (mm)							
	ETEC							
	T01	T10	ES02	ES10	ES12	EK06	EP18	EWD299
RY2	20	21	20	25	26	20	27	30
MM1	20	21	20	24	25	20	27	30
En4	20	20	20	25	25	20	26	29
抑菌級數	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++

Table 4. Identification of isolated strains in API 50 CHL Kit

Lactic acid bacteria	Strains	Identify
	RW1	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	RW3	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	MM1	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	RM1	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	En4	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>
	RY2	<i>Lactococcus lactis lactis</i>

Table 5. Analysis of acid tolerance (pH 2.0 , 2.5 , 3.2) for three lactic acid bacteria.

LAB Strains	0 hr	pH 2 , 3 h	pH 2.5 , 3 h	pH 3.2 , 3 h
En4	9.77 ± 0.10 ^a	9.64 ± 0.04	9.63 ± 0.13	9.63 ± 0.17
MM1	9.35 ± 0.08	9.17 ± 0.24	9.07 ± 0.01	9.42 ± 0.01
RY2	9.25 ± 0.19	9.17 ± 0.12	9.01 ± 0.40	9.13 ± 0.07

^aBacteria counts are converted to log CFU ml⁻¹

Table 6. Effect of bile salts on the growth of low pH treated (pH 2.0, 3h) lactic acid bacteria.

LAB Strains	3 h ^a		12 h		24 h	
	MRS	MRS-bile ^b	MRS	MRS-bile	MRS	MRS-bile
En-4	10.55±0.04	10.13±0.05	11.09±0.03	11.06±0.03	11.93±0.01	11.67±0.00
MM-1	9.56±0.08	9.42±0.04	10.87±0.01	10.86±0.00	11.27±0.01	10.67±0.01
RY2	9.20±0.04	8.33 ±0.04	10.52±0.01	10.43±0.03	11.36±0.03	11.09±0.03

^a LAB in MRS or MRS-bile after 3 h treatment at pH 2.0.

^b MRS-bile means MRS broth with 0.3 % oxgall.

^c Bacteria counts are converted to log CFU ml⁻¹

Table 7. Effect of lactate dehydrogenase treatment after 2 hours on the antimicrobial activity of cell free spent broth of three lactic acid bacteria strains against eight enterotoxigenic *Escherichia coli*.

LAB	zone diameter (mm)							
	ETEC							
	T01	T10	ES02	ES10	ES12	EK06	EP18	EWD299
RY2	19	20	17	20	22	20	20	26
MM1	15	16	16	19	21	18	19	26
En4	17	18	15	19	20	18	20	25
抑菌級數	+	+	+	++	++	++	++	+++

Interpretation of zone diameter of inhibition.

- = less than 11 mm; + = 11–16 mm; ++ = 17–22 mm and +++ = more than 23 mm.

Table 8. Effect of several treatment on the antimicrobial activity of cell free spent broth of lactic acid bacteria strain En-4 against eight enterotoxigenic *Escherichia coli*.

LAB Strains	ETEC Strains	Zones of inhibition (mm) produced by spent culture medium (SCS) of lactic acid bacteria after following treatments					
		Catalase	SCS adjust pH 7.2	Trypsin	Amylase	Pepsin	Proteinase K
En-4	T01	27	-	20	20	20	21
	T10	21	-	23	21	21	21
	ES02	20	-	20	20	21	20
	ES10	24	-	21	22	21	22
	ES12	25	-	23	23	21	22
	EK06	20	-	20	20	20	20
	EP18	25	-	26	24	25	24
	EWD299	28	-	29	28	26	27

Table 9. Effect of heat treatment (100 °C, 15 min) on the antimicrobial activity of cell free spent broth of three lactic acid bacteria strains against eight enterotoxigenic *Escherichia coli*.

LAB	zone diameter (mm)							
	ETEC							
	T01	T10	ES02	ES10	ES12	EK06	EP18	EWD299
RY2	20	22	21	22	24	20	26	30
MM1	22	21	20	21	25	20	25	30
En4	20	23	20	21	23	20	26	29
抑菌級數	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++

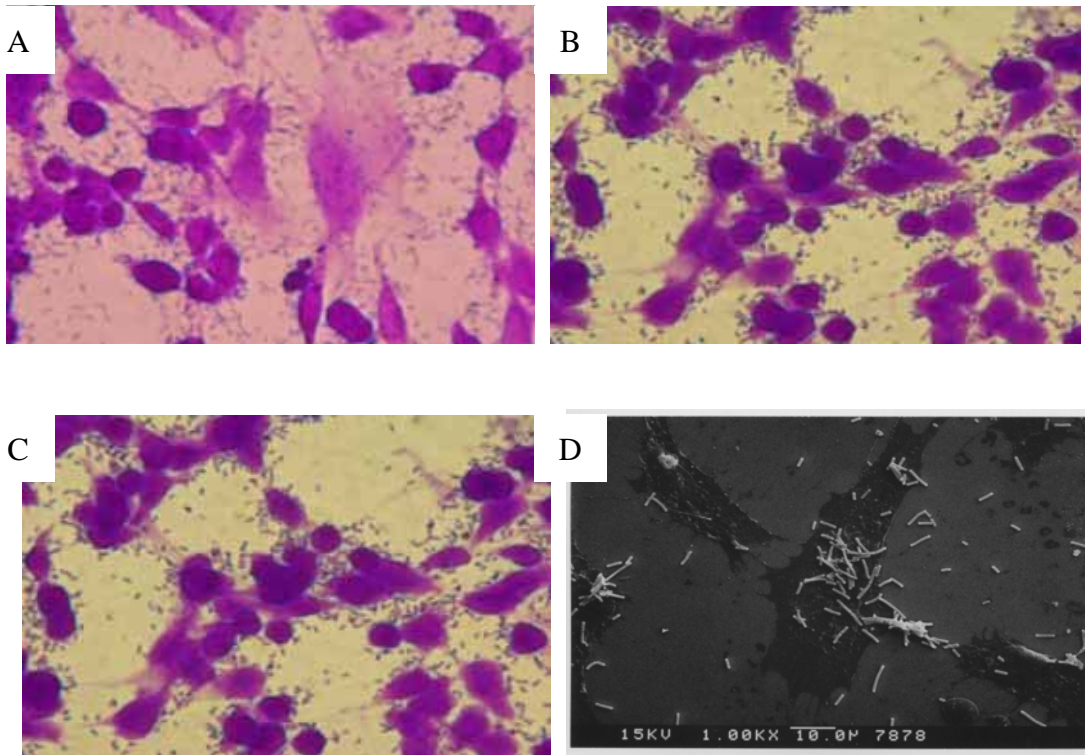


Fig. 1. Adhesion of three lactic acid bacterial strains (A) MM1 (B) En4 (C) RY2 to Caco-2 Caco-2 cell lines by inverted light microscopy. (D) The RY2 strain by scanning electron microscopy (SEM).

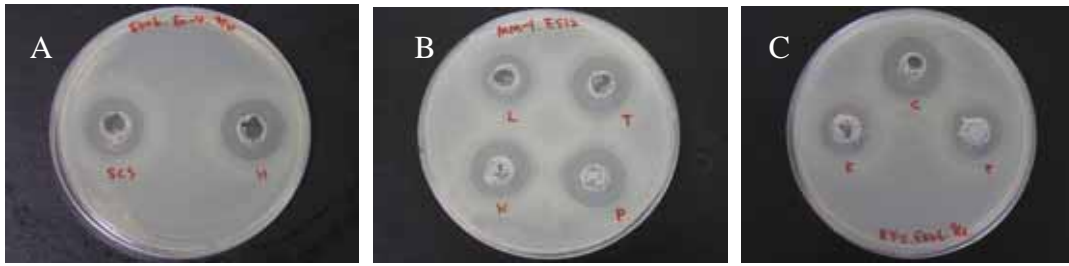


Fig. 2. Agar diffusion test showing antagonistic activity of lactic acid bacteria against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). (A) The SCS with or without heat (100 °C, 15 min) treatment of lactic acid bacteria strain En4 against ETEC strain EK06. (B) The SCS with lactate dehydrogenase, pepsin, proteinase K and trypsin treatments of lactic acid bacteria strain MM1 against ETEC strain ES12. (C) The SCS with or without pepsin and proteinase K treatments of Lactic acid bacteria strain RY2 against ETEC strain EK06.

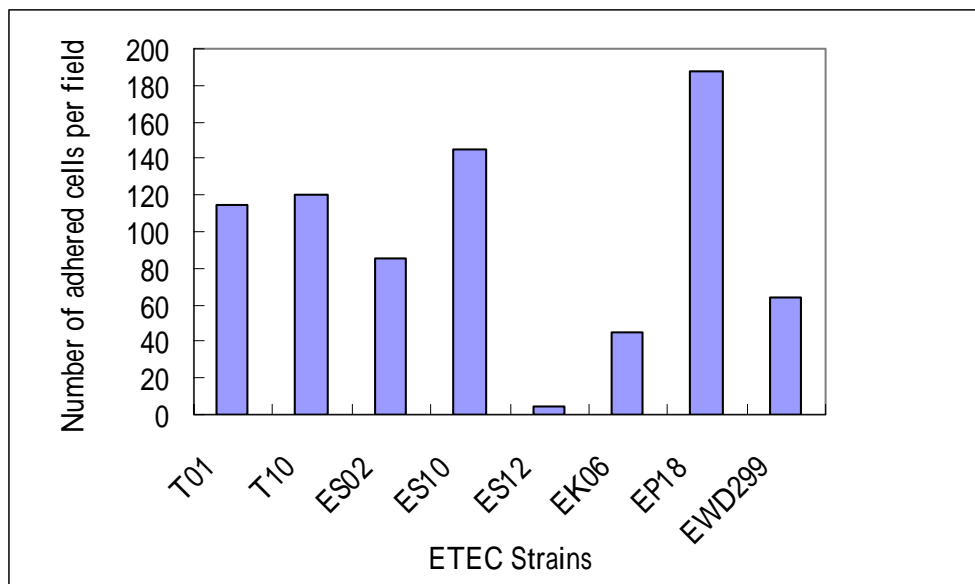


Fig. 3. Adhesion of eight enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human intestinal epithelial Caco-2 cell-line in vitro. (Adhesion of eight enterotoxigenic *Escherichia coli* onto monolayers of Caco-2 cells is expressed as a mean number (SEM) of ETEC adhering to the cell monolayer/10 Caco-2 cells. Twenty randomized microscopic fields were counted.)

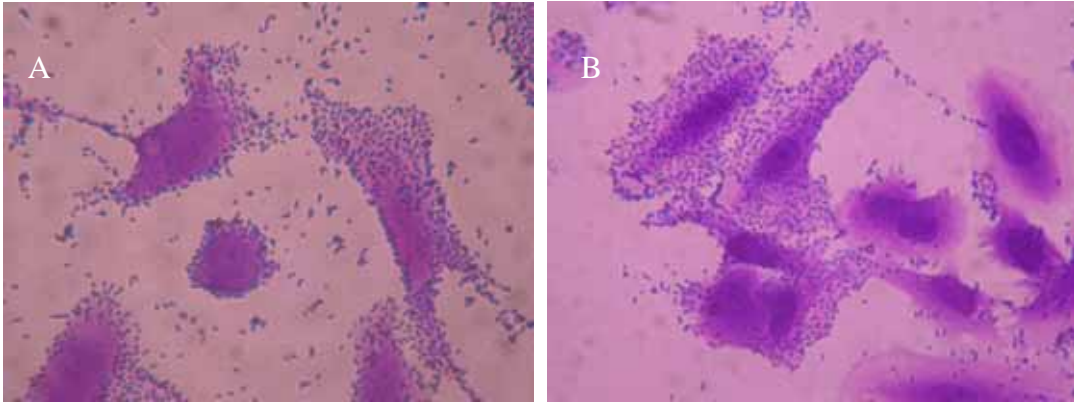


Fig. 4. Adhesion of ETEC strains (A) EP18 (B) ES 10 to Caco-2 cell lines by inverted light microscopy.