

도축돈 장관에서 분리한 *Enterococcus faecium*의 특성

김인덕 · 안미현 · 석호봉*

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원전공
(계재승인: 2004년 11월 20일)

Properties of *Enterococcus faecium* isolated from the intestine of slaughting pigs

In-doc Kim, Mi-hyun Ahn and Ho-bong Seok*

Department of Animal Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Accepted: November 20, 2004)

Abstracts : The growth characteristics and the properties of the *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) isolated from intestine of slaughting pig were examined in order to confirm whether it will be used practically as probiotics or not. *E. faecium* was identified by morphological and biochemical tests including of final confirming by API strep kit. Among 264 samples, 44 isolates (16.7%) of *E. faecium* were observed as an excellent growth as a range of 1×10^7 CFU/ml ~ 3.3×10^9 CFU/ml in viable bacterial count on MRI medium. All isolates were shown non-haemolysis on the blood agar exception of 28 isolates shown α -haemolysis and were identified as *E. faecium* by biochemical test using API strep enzyme kits. Eight strains (18.2%) were finally selected from which they were excellent sensitivity in showing of the acid-tolerance and the bile-tolerance in compare with reference strain.

Key words : *E. faecium*, pig intestine, probiotic properties, API strep

서 론

돼지의 장관에는 대략 400여종의 1×10^{12} 개/ml에 가까운 세균들이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으며 장관내 균총을 구성하고 있는 유산균은 유해세균의 증식을 억제하고 숙주에 대하여 유해한 대사산물을 생성하지 않으며, 장관내 균총을 유리하게 개선하는 것은 물론 소화기 계통의 각종 질환 예방에 효과가 있다고 알려져 있다 [19, 21]. 최근 섭취 유산균의 장관 정착에 의한 유산균 고유효과에 대한 기대 때문에 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*과 같은 장관 유래 유산균을 이용한 제품개발이 활발하게 이루어져 왔다 [2, 13].

Shahani 등 [19]은 섭취 유산균이 장관에 정착하여 유산균이 지니는 고유의 기능을 발휘하기 위해서는 위액 및 담즙산에 대한 내성이 있어야 하고 장관에서는 활발

한 증식이 이루어져야 하며 유해 세균에 대한 생육 억제력이 우수해야 한다고 하였는데 이를 위해서는 장관 유래 유산균이 가장 적합하다.

Sneath 등 [20]은 동물 장관 유래의 *Enterococcus*를 *Streptococcus*속의 *Enterococcus*로 분류하였으나 Schleifer 등 [18]은 *Enterococcus*속으로 독립하여 분류하였다. *Enterococcus*는 동물의 장관에 서식하는 세균으로 구형 또는 계란형이며 쌍이나 연쇄상을 형성하는 그람 양성균으로 탄수화물을 이용하여 유산을 생산한다. 특히 *Enterococcus faecium*(*E. faecium*)은 유해 세균의 생장을 억제하고 장 점막 부착성이 좋은 것으로 알려져 있어 동물의 설사 예방제나 정장제 또는 가축성장촉진제로 사용되고 있다 [1, 22].

Fuller [11]는 소, 돼지 그리고 육계 등에 생균제를 사료와 함께 섭취시킨 결과 더 빠르게 성장했을 뿐 아

이 연구는 2001학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음

*Corresponding author: Ho-bong Seok

Department of Animal Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
[Tel: +82-41-550-3654, Fax: +82-41-553-1618, E-mail: hobong@dankook.ac.kr]

나라 우유와 계란의 생산도 증가한 것으로 보고하였다. 동물에 사용되는 생균제로서는 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Yeasts*, *Enterococcus* 등이 있다 [11].

현재 국내에서도 이러한 분말생균제가 의약품, 동물약품 및 건강보조 식품으로 사용되고 있으나 *Enterococcus*를 분말 생균제로 사용하기 위한 연구는 미흡한 실정이다. 국내의 수의약품 중 유산균관련 제품의 대부분이 외국으로부터 수입한 것이나 이 원료를 채포한 것이 많은 것으로 알려져 있다. 국내에서 사육하고 있는 동물이 외국에서 분리된 생균에 적응해야 하는 문제로 야기될 수 있는 균적응성과 균교대성 문제, 생균제산업의 기술의존도 및 개발문제가 제기되고 있다 [11, 19].

항생제 과다사용과 내성균 출현으로 대체의약품, 기능성약품 및 건강보조식품 등 무해한 건강식품으로 전환하려는 현지점에서 건강한 돼지의 장에서 *E. faecium*을 분리하여 Shahani와 Ayebo [19], Salminen 등 [17]이 제기한 특성 즉, 내산성, 내담즙산과 생균생산성을 조사하여 우수한 probiotics를 생산하기 위한 국내산 기초균주를 분리하고자 하였다.

본 시험은 동물 장관유래 유산균주를 주로 한 생균제 개발을 목적으로 생균수 생산능력이 높은 고효율의 *Enterococcus* 균을 도축돈 장내에서 분리하고 내산성, 담즙산의 내성과 용혈성 및 효소생화학적 특성을 조사하여 우수한 기초균주를 선발하여 산업에 활용 할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주와 시약

분리균을 비교하기 위한 표준균주는 *E. faecium* (Lyoferm, USA)과 *E. faecalis*(Lyoferm, USA)를 사용하였다. 분리균의 배양 배지로는 *Lactobacilli* MRS broth (Difco, USA) 및 MRS agar를 사용하였고, *Enterococcus* 선택 분리용 배지로는 KF *Streptococcus* agar(Difco, USA)와 brom cresol purple agar (BCP: Difco, USA)를 각각 사용하였다. 균주의 내산성 실험은 생체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 Kobayashi 등 [14]의 방법에 의해 pH 3.0으로 조절한 MRS broth를 제조하여 사용하였다. 담즙산으로는 oxgall powder(Sigma, USA)를 사용하였다.

공시동물 및 시료채취

충남 천안에 위치한 사조산업(주) 도축장에서 2001년 6월부터 2002년 6월까지 건강한 돼지의 장시료 264예를

채취하였다. 채취방법은 멸균한 면봉을 이용하여 개체별 개봉된 백내장에서, 대장내용물을 채취하여 준비된 5 ml MRS broth(Difco, USA)에 넣은 멸균 캡시험관에 담아 실험실로 운반하였다.

균 분리

시료는 즉시 또는 5°C 냉장보관 후 유산균 기초배지인 MRS 평판에 도달한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24~48시간 배양하였다. 유사한 단일균주를 선택배지인 KF *Streptococcus* agar (Difco, USA)와 BCP 평판배지에 subculture하여 노란색으로 변화시키는 colony을 1차 선별하였다. 2차로 형태적, 생화학적 및 유산생성 여부를 Bergey's manual에 의거하여 실험하고 최종 *Enterococcus* 속 균으로 분류하였다.

용혈성 시험

용혈성 시험을 위해 5% 토끼혈액을 첨가한 MRS배지에 분리균을 도달한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에 24~48시간 배양 하여 용혈성의 증식유무를 확인하였다. α-hemolysis는 용혈대가 불투명하고 연녹색을 나타내는 반면 β-hemolysis는 용혈대가 크고 선명한 것으로 구분하였다.

생균수 측정

*Enterococcus*의 생균수측정은 일반 생균수 측정법에 의하여 시료를 각각 멸균 생리식염수로 10배 또는 100배 연속 희석법으로 희석한 후 평판배지 위에 희석액을 각각 1 ml 씩 분주하여 MRS agar에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 24~48시간 배양하였다. 배양 후 평판 배지에 나타난 집락수를 계수한 후 희석배수를 곱하여 생균수를 산출하였다.

API strep 동정

장내 세균용 동정 kit인 API(Analytical Profile Index; bioMerieux, France)를 이용하여 선별된 균주들을 대상으로 *E. faecium*의 동정을 위하여 표준 균주와 비교하였고 실험방법과 판정은 API manual에 준하여 실험하였으며 API LAB PLUS software(bioMerieux, France)로 최종 동정하였다.

균의 보관

최종 선별된 균들은 MRS broth상태로 24시간 배양시킨 후 2일동안 냉장보관 하였으며 이를 다시 MRS agar에 도달 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24~48시간 순수배양하여 신선한 균을 새로이 선발하였다. 이러한 과정을 실험이 완료될 때까지 반복하였다.

내산성과 내담즙산 시험

분리된 균주의 내산성 시험은 생체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하는 Kobayashi 등 [14]의 방법에 의거하여 펙신을 함유한 pH 3.0인 MRS 배지 즉, 인공 위액에서 실험하였다. 내산성 실험은 3처리구로 나누어 균주를 인공위액에 1 ml 씩 분주 후 각각 30분, 60분, 90분 씩 배양한 후 이를 다시 MRS 배지에 도말하여 살아남은 균수를 측정하였다.

내담즙산 시험은 분리된 균주를 담즙산이 각각 0.1%, 0.2%, 0.3% 포함된 MRS agar에 도말하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 살아남은 균수를 최종 측정하였다.

결 과

분리균의 성상

돼지 대장 내용물을 분리재료로 한 264개 샘플에서 단일 colony를 얻었으며 얻어진 colony의 형태(CFU, colony forming unit)에 따라 44주의 분리균이 재 선발된 후 Gram 염색성과 catalase, gas 형성, 유산생성과 아포 형성 등의 생화학적 성상과 온도, 용혈성상 및 선택배지 성상을 기준으로 하여 표준균주와 비교하였다(Table 1). 표준균주로 사용된 *E. faecium*과 *E. faecalis*는 용혈상태에서 차이를 보였는데 *E. faecium*은 α-hemolysis를, *E. faecalis*는 β-hemolysis를 나타내었다. 그리고 분리균의

Table 1. Biochemical and cultural properties of isolates and reference strain

Properties	Isolates (N=44)	<i>E. faecium</i> strain (N=1)	<i>E. faecalis</i> strain (N=1)
Characteristics			
Morphology	cocci	cocci	cocci
Gram stain	+	+	+
Catalase	-	-	-
Gas formation	-	-	-
Lactate	+	+	+
Spore forming	-	-	-
Growth at			
Temp. 45°C	+	+	+
10°C	+	+	+
Culturing			
α-hemolysis	+(28)*	+	-
β-hemolysis	-	-	+
MRS agar	+	+	+
KF agar	+	+	+
BCP agar	+	+	+

*Number of positive reaction

44주 중 28주(63.6%)가 α-hemolysis를 나타내었고 나머지 균주는 용혈성이 없었다.

생균수 측정

분리된 균주들은 MRS agar 배지에 도말 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 평판배지에 나타난 균수를 산출하여 총 44균주를 표준 균주와 비교하였다 (Table 2). 그 결과 각 분리균들의 생균수는 1×10⁷ CFU/ml~3.3×10⁹ CFU/ml 범위로 생균 발육성이 우수하였다. 총 4주(256×10⁷ 이상)가 2002년에 분리된 것으로 표준 균주(228×10⁷) 보다 생균증식력이 높았고 1주(226×10⁷)는 같거나 2주는 약간 낮은 생균증식성을 보였다. 2001년에 분리된 균은 낮은 경향을 보였다.

API strep 동정

API strep kit(bioMerieux, France)을 이용한 효소생화학 실험을 분리균과 *E. faecium* 그리고 *E. faecalis*의

Table 2. Bacterial number of isolates and reference strain onto MRS agar

Classification (N=45)	No. of Bacterium (1×10 ⁷ CFU/ml)	Classification	No. of Bacterium (1×10 ⁷ CFU/ml)
Reference strain	228		
Isolates		Isolates	
*1-1	11	*2-8	22
1-2	31	2-9	7
1-3	23	2-10	9
1-4	41	2-11	5
1-5	33	2-12	226
1-6	15	2-13	41
1-7	13	2-14	256
1-8	51	2-15	205
1-9	22	2-16	13
1-10	50	2-17	11
1-11	11	2-18	2
1-12	31	2-19	256
1-13	30	2-20	1
1-14	21	2-21	6
1-15	36	2-22	21
2-1	183	2-23	1
2-2	25	2-24	2
2-3	9	2-25	2
2-4	20	2-26	5
2-5	18	2-27	332
2-6	8	2-28	330
2-7	20	2-29	20

*1; 2001 year, 2; 2002 year

Table 3. Biochemical characteristics of the organisms isolated from pig intestinal contents

Characteristics of API strep	Isolates (N=44)	<i>E. faecium</i> strain(N=1)	<i>E. faecalis</i> strain(N=1)
VP	+	+	+
HIP	± (39)*	+	+
ESC	+	+	+
PYRA	+	+	+
αGAL	± (33)	+	-
βGUR	-	-	-
βGAL	± (40)	+	-
PAL	-	-	-
LAP	+	+	+
ADH	+	+	+
RIB	± (42)	+	+
ARA	± (21)	+	-
MAN	+	+	+
SOR	± (2)	-	+
LAC	+	+	+
TRE	+	+	+
INU	-	-	-
RAF	-	-	-
AMD	± (41)	+	+
GLYG	-	-	-
βHEM	± (3)	-	-

*Number of positive reaction

표준균주들과 비교하였다(Table 3). Pyruvate(VP), hippurate(HIP), esculin(ESC), pyrrolidonyl-2-naphthylamide (PYRA), 6-bromo-2-naphthyl α-D-galactopyranside(αGAL), 2-naphthyl AS-BIβ-D-glucuronate(βGUR), 2-naphthyl-β-D-galactopyranoside(βGAL), 2-naphthyl phosphate(PAL), L-leucine-2-naphthyl-amide(LAP), arginine(ADH), ribose (RIB), L-arabinose(ARA), mannitol(MAN), sorbitol(SOR), lactose(LAC), trehalose(TRE), inulin(INU), raffinose(RAF), starch(AMD), glycogen(GLYG), βHEM 등 21종에서 모두 *E. faecium*과 유사한 반응을 나타내었으나 *E. faecalis*와는 다른 반응을 나타내었다.

내산성과 내담즙산 시험

산에 대한 저항력을 알아보기 위해 MRS broth 배지에 접종하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 배양액 1 ml을 pH 3.0으로 조정된 인공 위액 함유 MRS agar 9 ml에 넣고 처리균을 30분, 60분, 90분으로 나누어 시간경과 후 균수를 측정하였다(Table 4). 본 실험에서 표준균주를 동시에 배양한 후 다른 분리 균주들과 비교하였으며, 비교 방법은 표준 균주 '+'를 기준으로 colony가 적게 관찰되면 '-'으로 표기하였다. 실험결과

Table 4. Tolerance intensity of *E. faecium* isolates to bile salt and artificial gastric juice compared with that of the reference strain showing one plus(+) reaction

Tolerance tests	No. of isolates(%) surviving in the given conditions				
	+++	++	+	-	Total
Acidity*	1(2.3)	7(15.9)	8(18.2)	28(63.6)	44(100)
Bile salts**	1(2.3)	7(15.9)	17(38.6)	19(43.2)	44(100)

*+, 30 min surviving; ++, 60 min surviving; +++, 90 min surviving

**+, 0.1% surviving; ++, 0.2% surviving; +++, 0.3% surviving

8주가 표준균주에 비해 월등히 높은 생존율을 보였다. 다른 나머지 균주들은 표준균주와 유사하거나 낮음을 보였다.

담즙산 시험은 MRS broth 배지에서 24시간 배양한 균주들을 각각 0.1%, 0.2%, 0.3% Oxgall powder가 함유되어진 MRS agar 배지에 도말한 다음 24시간 후 그 생존율을 측정하였는데, 내산성이 강하게 확인되어진 분리균 8주가 표준 균주와 비교하여 월등히 높은 생존율을 보였다. 따라서 내산성과 내담즙산 시험 모두에서 표준 균주보다 우수한 균주는 총 44주 중 8주(18.2%)로 관찰되었다(Table 4).

고 찰

사료 첨가용 항생물질은 1950년대부터 가축의 성장촉진제로 널리 사용되어 왔으나 가축내의 잔류 문제와 내성문제로 인하여 전 세계적으로 사용이 규제되고 있다 [5, 12]. 항생물질은 가축의 질병치료를 주로 사용하고 있으나 잔류량축적, 내성균출현 및 균교대현상등 항생물질에 대한 부작용으로 항생제를 대체할 수 있는 생균제제의 개발이 필요하며 이러한 목적에서 개발된 것이 생균제(probiotics)이다. Fuller [12]에 의하면 생균은 사료첨가제로서 가축의 장내 미생물 균형을 증진시키는 물질로 생균 상태라는 것이 다른 생육촉진제와 차이가 있는 것으로 정의하고 있다.

현재까지 알려진 생균제에는 유산생성균, *Bacillus*균 및 효모의 배양물 등이 있는데 [5] 이 중에서 유산생성균 생균제가 가장 많이 사용되고 있다. 이러한 생균제를 사료에 첨가하여 가축에 급여할 경우 Dilworth와 Day [10]는 닭의 체중을 증가시켰다고 하였으며 Wallace와 Newbold [23]는 반추동물에 있어서는 반추위 발효정상화와 성숙의 설사 예방의 기능을 가지고 있다고 하다. 또한 Baird [8]와 Pollman 등 [15]은 돼지에서 체중증가

의 결과를, 한 등 [7]은 성장촉진과 설사방지 효과가 있다고 각각 보고하였다.

이와 같이 생균제를 가축의 사료에 혼합 사용할 경우 생육촉진제로서의 효과가 입증되어 있으나, 생균제로 사용하기 위해서는 적당량의 생균이 존재하여야 하고 위산이나 담즙에 내성이 있어야 하며 장내에 서식하여 내산성이 있어야 하는 조건을 요구하고 있다 [5, 12]. 실제로 유산균제제의 생리적인 기능성과 효능은 균주에 따라서 커다란 차이를 나타내기 때문에 우량 균주를 선발하는 것이 우선과제이며 가축의 질병 예방 및 생산성 향상을 유도할 수 있는 생균제 연구에서 가장 중요하다고 하였다 [4, 6].

유산균이 생균 정장제로서 그 기능을 발휘하기 위해서는 섭취 후 위와 십이지장을 통하여 장에 정상적으로 도달하여 장 점막에 정착한 후 왕성한 번식을 하여야 한다. 이러한 목적을 위해 사용하고자 하는 유산균을 장에서 직접 분리하는 것으로 생각되어 본 연구에서는 도축돈의 장속 내용물을 직접 이용하였다 [3].

본 실험에서는 2001년부터 2년째 걸쳐 도축돈의 장내 서식하는 유산균 중 *Enterococcus faecium* 유산분해균을 특별 선택배지상에서 colony를 찾아 분리하고 API strep에 의한 *E. faecalis*와 구별 동정하여 이 균의 장내 특성과 생균제의 구비조건 등을 알아 보았다. 도축돈의 대장에서 총 264개의 sample을 채취하여 MRS, KF, BCP 배지 상에서 *E. faecium*을 분리 동정하였다, 이중 선발된 44개의 단일 colony중 시험관내 실험에서 내산성 및 내담즙산 실험에서 소위 super strains을 다시 분리하였다.

내산성 시험은 Kobayashi 등 [14]의 방법에 의한 pH 3.0으로 조절한 배지에 30분, 60분, 90분으로 처리하여 실험한 결과 8주만이 표준 균주와 비교하여 우수한 생존율을 보였으며 나머지는 표준균주와 유사하거나 낮았다. 이는 산성에 대한 내성이 있어 위산 내용물에서도 생존하여 장으로 이동할 수 있다는 것을 의미한다. 음식물을 동시섭취에 의한 완충 효과로 위의 pH가 높아진다는 것을 고려한다면 그 생존율은 더욱 높아질 것으로 생각된다. 담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로서 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며 특히 장내 유래 세균이 아닌 경우에는 담즙산이 함유된 배지에서는 자랄 수 없다고 알려져 있다. 본 실험에서는 분리, 동정된 균주를 담즙산 0.1%, 0.2%, 0.3% 함유된 MRS 배지에 도달하여 배양했을 때 계속 생존하는 균주의 colony를 관찰하였으며 그 결과 표준균주보다 우수한 균주가 확인되었다. 이균은 대부분 2002년에 분리된 것으로 2001년에 분리된 균에 비하여 신선도나 실험실보관 등에서 내성 효능이 우수한 것이 아닌가 생각된다. 내산성과 내담즙산 시험 모두에서 표준균주보다 우수하게 판

명된 균주는 총 8주로 관찰되었다. 이러한 균주를 이용하여 생균제에 의한 제품을 생산한다면 국내에서도 수입에 의존하지 않고 자체적인 생균제의 생산이 가능하리라고 생각된다.

유산균 중 *E. faecium*은 보편적으로 안전한 미생물로 인식되고 있으나 최근 사람에서 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*(VREF)균의 출현에 대한 보고가 있어 주목되고 있다 [9, 16]. 이들 분리균에 대한 VREF에 대한 연구는 추후 연구할 예정이다. 그러나 실제 *in vivo*에서 probiotics의 제품기능을 수행할 수 있는지에 대한 추가 실험이 필요하다고 예측되나 바람직한 균주의 선택은 실험실 차원에서 가능하다고 본다.

요 약

동물 장관유래 유산균중 생균 효능이 높은 *Enterococcus*균을 정상 도축돈의 장관에서 분리하고 분리균에 대한 용혈성과 API strep에 의한 효소 생화학적 성상과 내산성 및 내담즙산 실험에 의한 유산생성균의 특성을 조사하였다.

얻어진 결과는 다음과 같다.

- (1) 도축돈 장분변 sample 264에 중 colony 형태에 따라 44주(분리율16.7%)를 선발하였고, 각 분리균의 생균수를 측정된 결과 1×10^7 CFU/ml ~ 3.3×10^9 CFU/ml의 범위로 생균 발육성이 우수하였다.
- (2) 혈액배지 상에서의 용혈성시험 결과 44주 중 28균주가 a-haemolysis를 나머지는 용혈성이 없었다. 분리균은 API strep에 의한 효소 생화학적 분리 동정 실험에서 *E. faecium*인 것으로 최종 선발하였다.
- (3) 분리균에 대한 내산성과 내담즙산 실험 결과 내성강도에서 표준균주보다 우수한 분리균 8주 (18.2%)를 최종 선발하였다.

참고문헌

1. 김경수, 지규만, 이상진. *Streptococcus faecium*의 급여가 육계의 성장과 장내 세균총 변화에 미치는 영향. 한국가금학회지. 1991, 18, 97-119.
2. 김태한. 유산균을 이용한 의약품 개발. 생물산업. 1994, 7, 28-35.
3. 박종진, 변정수, 조윤경. 동물의 장에서 분리한 *Enterococcus sp.*의 특성 및 분말화. 삼양제넥스 연구소. 1996, 24, 393-398.
4. 백영진. 유산균의 상업적 이용. 생물화공. 1992, 6, 21-31.
5. 백인기. 생균제의 사용 효과. 한국영양사료학회지. 1989, 13, 175-183.

6. 이진규, 김운태, 이준호. 생균제용 유산균의 분리 및 동정. 태경연구소보. 2002, **5**, 429-432.
7. 한인규, 채병조, 박응복. 돼지에 대한 *Streptococcus faecium*(SF-68)의 성장촉진과 하리방지효과 및 장내 미생물변화에 관한 연구. 한국축산과학연구보고. 1982, **2**, 12-25.
8. Baird, D. M. Probiotics help boost feed efficiency. Feedstuffs. 1977, **49**, 11.
9. Bischoff, W. E., Reynolds, T. M., Hall, G. O., Wenzel, R. P. and Edmond, M. B. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5-year period. J. Clinic. Microbiol. 1999, **37**, 3912-3916.
10. Dilworth, B. C. and Day, E. J. *Lactobacillus* cultures in brooder diets. Poult. Sci. 1978, **57**, 1101.
11. Fuller, R. Probiotic: Their development and use. In Probiotics of use in opportunistic infections. J. Inst. Microbiol. Biochem. 1995, **8**, 1-7.
12. Fuller, R. Probiotics of man and animals. J. Appl. Bacteriol. 1989, **66**, 365-378.
13. Kim, H. S. Characterization of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* as applied to dietary adjuncts. Cult. Dairy Prod. J. 1988, **23**, 6-9.
14. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. Jpn. J. Microbiol. 1974, **29**, 691-697.
15. Pollman, D. S., Danielson, D. M. and Peo, E. R. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 1980, **51**, 557.
16. Roger, M. Faucher, M. C., Forest, P. St-Antoine, P. and Coutlee, F. Evaluation of a vanA-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. J. Clinic. Microbiol. 1999, **37**, 3348-3349.
17. Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie van Leeuwenhoek. 1996, **70**, 347-358.
18. Schleifer, K. H. and Kilpper-Balz, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1984, **34**, 31-34.
19. Shahani, K. M. and Ayebo, A. D. Role of dietary *lactobacilli* in gastrointestinal microecology. Am. J. Clin. Nutr. 1980, **33**, 2448-2457.
20. Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Sharpe, M. E. *Enterococci* Bergey's manual of systematic bacteriology. pp. 1063-1065, 2nd ed. William & Wilkins. Baltimore, 1986.
21. Speck, M. L. Our industry today. J. Dairy Sci. 1975, **59**, 338-343.
22. Underdahl, N. R., Torres-Medina, A. and Doster, A. Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control pigs. Am. J. Vet. Res. 1982, **43**, 2227-2232.
23. Wallace, R. J. and Newbold, C. J. Probiotics for ruminants. In Probiotics: The Scientific basis. pp. 317-353. Champmann & Hall, London, 1992.