

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากมูลไก่ประดู่หางดำ

Probiotic isolation from Pradu Hang Dam chicken's feces

จารุณี เกษรพิกุล^{1*} และ สุรวัดน์ ชลอสันติสกุล¹

Charunee Kasornpikul^{1*} and Surawat Chalorsuntisakul¹

บทคัดย่อ: โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลดีต่อโฮสต์โดยการปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากมูลไก่ประดู่หางดำ เพื่อให้ได้แบคทีเรียโปรไบโอติก ชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยได้ต่อไป โดยทำการเก็บตัวอย่างมูลลูกไก่ พันธุ์ประดู่หางดำ 80 ตัว โดยวิธี Cloacal swap และนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ผสม 0.3% CaCO₃ ได้แบคทีเรียจำนวน 400 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบพบเพียง 1 ไอโซเลท คือ ASAT-PD18 ที่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง (bacilli) ให้ผลลบต่อการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดี มีความสามารถในการย่อยแป้ง โปรตีน และไขมัน มีความสามารถในการทนกรด-ด่าง มีความสามารถต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และถึงจะพบว่า ASAT-PD18 มีความไวต่อสารปฏิชีวนะ แต่เมื่อพิจารณาคุณสมบัติต่างๆ ร่วมกัน จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อ ASAT-PD18 น่าจะเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยในการทดสอบในการปรับปรุงสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ต่อไป

คำสำคัญ: โปรไบโอติก, ไก่ประดู่หางดำ

ABSTRACT: Probiotics are microorganisms that are beneficial to the host by improving the balance of intestinal microflora. The objective of this study was to evaluated the characteristics of bacteria that can be isolated from Pradu Hang Dam chickens' feces to get the new effectively probiotic bacteria to continue to extend researches. By collecting samples from 80 Pradu Hang Dam chickens by Cloacal swap method and culture them on MRS mixed with 0.3% CaCO₃. From 400 isolates, there was 1 isolate ASAT-PD18 that was bacilli shape with gram positive, negative to the ability to produce catalase enzymes, had ability to bile salts tolerance, had ability to digest starch, protein and fat, tolerance to acid-base, Capable to inhibiting pathogenic bacteria. Therefore, ASAT-PD18 was sensitive to antibiotics but when considering various properties, it may be concluded that ASAT-PD18 is probably to be an effective probiotic bacterium to continue the extended researches in improving the health and growth of animals.

Keywords: Probiotic, Pradu Hang Dam chickens

¹ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร เลขที่ 1 ถนนชะอำปรางมูรี ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี 76120
Faculty of Animal Science and Technology, Silpakorn University 1 Cha Am – Pran Buri road, Sampraya, Cha Am, Petchaburi 76120

* Corresponding author: makemerry@gmail.com

บทนำ

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้โดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต หรือ Normal flora จะทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันเชื้อโรคซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของอาหาร และการดูดซึมสารอาหาร อาหารเสริมชนิดจุลินทรีย์ที่มีชีวิต หรือ โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลดีต่อโฮสต์โดยการปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Fuller, 1989) ซึ่งโปรไบโอติกที่มีศักยภาพที่มีรายงานว่า มีผลดีต่อสัตว์ คือ แบคทีเรียกรดแลคติก (Gusils et al., 1999a) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ ต้องประกอบด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้ คือ ความต้านทานต่อการกรดและเกลือแร่ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร (Chou and Weimer, 1999) ความสามารถในการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และความสามารถในการต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อโรคที่สำคัญ เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. (Ehrmann et al., 2002; Gusils et al., 1999b) และคุณสมบัติในการย่อยสลายอาหาร ทั้งโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อได้ (Lee et al., 2001) ดังนั้นคุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นข้อกำหนดเบื้องต้นสำหรับการเลือกโปรไบโอติกที่เหมาะสม (Taheri et al., 2009) โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากมูลไก่ประดู่หางดำ ซึ่งอาจได้แบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยทั้งในการทดสอบคุณสมบัติขั้นสูง และทดสอบในการปรับปรุงสุขภาพ และการเจริญเติบโตของสัตว์ต่อไป

วิธีการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างมูลลูกไก่ อายุ 1 – 2 สัปดาห์ พันธุ์ประดู่หางดำ คละเพศ รวมทั้งหมด 80 ตัว โดยวิธี ป้ายจากทวารร่วม (Cloacal swap) โดยนำตัวอย่างมูลไก่ที่เก็บ ตัวอย่างละ 1 กรัม เจือจางในน้ำเกลือ ความเข้มข้น 0.9% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ deMan

Rogosa-Sharpe (MRS) agar ผสมกับ 0.3% แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCo₃) บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Axelsson, 1993) จากนั้นเก็บโคโลนีเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นสีใส และทำให้บริสุทธิ์โดยการขีด (Streak) เชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง MRS จากนั้นนำมาย้อมสีแกรม

ทำการคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีสีแกรมบวกเท่านั้น เข้าทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (Catalase Test) (ไพร์ตัน, 2549) และคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ให้ผลคาตาเลสเป็นลบเข้าทดสอบความสามารถการทนต่อเกลือแร่ โดยผสมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (Conway et al., 1987) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในเกลือน้ำดีทั้ง 2 ความเข้มข้นมาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (Michael and Peleazar, 1995) นำแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตได้มาทดสอบความสามารถความทนต่อการด่าง ระดับ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยผสม 1 N HCl และ 1 N NaOH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และตรวจผลการเจริญจากความขุ่นของอาหารเหลว (Jin et al., 1998) จากนั้นทดสอบความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ (Susceptibility Antibiotic Disc) โดยวิธีการกระจายตัวบนจานเพาะเชื้อแบคทีเรีย (Agar Disc Diffusion Method) โดยใช้แผ่นยา (Antibiotic Disc) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Ampicillin (10µ), Colistin (10µ), Norfloxacin (10µ), Penicillin (10 IU), Sulphamethoxazole/Trimethoprim (25µ) และทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* (รฐา, 2544)

ผลการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างมูลลูกไก่ อายุ 1 – 2 สัปดาห์ คละเพศ รวมทั้งหมด 80 ตัว สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ จำนวน 400 ไอโซเลท ที่ให้โคโลนีเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นสีใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

ผสม 0.3% CaCo3 โดยเมื่อนำไปทำการย้อมสีแกรม พบแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวกจำนวน 120 ไอโซเลท โดยทั้ง 120 ไอโซเลทนี้ให้ผลลบต่อการสร้างเอนไซม์คาตาเลส จำนวน 65 ไอโซเลท ดังนั้น จึงเหลือเชื้อจุลินทรีย์ที่นำไปทดสอบขั้นตอนต่อไป จำนวนทั้งสิ้น 65 ไอโซเลท โดยให้ชื่อแต่ละไอโซเลทเป็นสัญลักษณ์ ASAT-PD ลำดับที่ 1 – 65

ความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี นำแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก และให้ผลลบต่อการสร้างเอนไซม์คาตาเลส จำนวน 65 ไอโซเลท มา

ทดสอบความทนทานการทนต่อเกลือ น้ำดี ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30 และ 0.50 โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถทนต่อเกลือ น้ำดี ได้ทั้ง 2 ความเข้มข้นมี 12 ไอโซเลท ได้แก่ ASAT-PD1, ASAT-PD8, ASAT-PD9, ASAT-PD11, ASAT-PD18, ASAT-PD19, ASAT-PD20, ASAT-PD25, ASAT-PD30, ASAT-PD40, ASAT-PD41, ASAT-PD55 ดังแสดงใน Table 1

Table 1 The probiotic efficiency of each isolated bacteria

Bacterial isolate	Tolerance to 0.3 % Bile	Tolerance to 0.5 % Bile	Protei Utilization	Starch Utilization	Lipid Utilization
ASAT-PD1	+	+	+	-	-
ASAT-PD8	+	+	+	-	-
ASAT-PD9	+	+	-	-	-
ASAT-PD11	+	+	-	-	-
ASAT-PD18	+	+	+	+	+
ASAT-PD19	+	+	-	-	-
ASAT-PD20	+	+	-	-	-
ASAT-PD25	+	+	+	-	-
ASAT-PD30	+	+	+	-	-
ASAT-PD40	+	+	+	-	-
ASAT-PD41	+	+	-	-	-
ASAT-PD55	+	+	-	-	+

ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต นำแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก ให้ผลลบต่อการสร้างเอนไซม์คาตาเลส และมีความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี จำนวน 12 ไอโซเลท มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยพบแบคทีเรียสามารถย่อยโปรตีนได้จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ASAT-PD1, ASAT-PD8, ASAT-PD18, ASAT-PD25, ASAT-PD30, ASAT-PD40 ย่อยไขมันได้ 2 ไอโซเลท ได้แก่ ASAT-PD18, ASAT-PD55 และย่อยแป้งได้เพียง 1 ไอโซเลท คือ ASAT-PD18 ดังแสดงใน Table 1

ความสามารถในการทนต่อการกรด-ด่าง นำแบคทีเรีย ASAT-PD18 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่

ปรับให้มีสภาพความเป็นกรด – ด่าง ต่าง ๆ คือ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วย 1 N HCl และ 1N NaOH และตรวจผลการเจริญจากความขุ่นของอาหารเหลว พบว่าแบคทีเรีย ASAT-PD18 ได้สามารถทนกรด – ด่าง ได้ทุกระดับ

ความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ นำแบคทีเรีย ASAT-PD18 ทดสอบความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี Agar Disc Diffusion Method โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 1 ไอโซเลท มาทำการทดสอบกับแผ่นยา (Antibiotic Disc) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Ampicillin (10µ), Colistin (10µ), Norfloxacin (10µ), Penicillin (10 IU), Sulphamethoxazole/Trimethoprim (25µ) พบว่า

ยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ASAT-PD18 ได้ทุกชนิด ดังแสดงใน Table 2

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีการกระจายตัวบนอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และสังเกต

ความกว้างรัศมีการยับยั้ง พบว่า เชื้อแบคทีเรีย ASAT-PD18 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* ได้

Table 2 The diameter of inhibition zone (mm.) of antibiotics against isolated bacteria

Antibiotic	Ampicillin (10μ)	Penicillin (10 IU)	Colistin (10μ)	Norfloxacin (10μ)	Sulphamethoxazole/ Trimethoprim (25μ)
Diameter of inhibition zone (mm.)	10.2	3.2	3.0	2.6	2.4

สรุปและวิจารณ์

แบคทีเรียของระบบทางเดินอาหารมีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Fuller, 1975) ดังนั้นเพื่อให้ได้โปรไบโอติกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาโปรไบโอติกในไก่ มีความจำเป็นต้องแยกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ใหม่ ๆ อยู่เสมอ โดยควรใช้การคัดกรองแบคทีเรียที่ง่าย รวดเร็ว และครอบคลุมการเลือกสายพันธุ์หนึ่งหรือหลายสายพันธุ์ เพื่อให้ได้โปรไบโอติกที่อาจมีประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวนมาก (Taheri et al., 2009) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างกรดแลคติกแล้วทำปฏิกิริยากับ CaCO_3 ได้เป็นอนุพันธ์เชิงซ้อนของ $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)_2$ ทำให้เกิดน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (Moorehead and Shumway, 2008) ซึ่งสารเชิงซ้อน $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)_2$ ทำให้เกิดเป็นส่วนใสรอบโคโลนี นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาทำโปรไบโอติกจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส เช่น แบคทีเรียในสกุลของ *Lactobacillus* (รุ่งโรจน์ และคณะ, 2561) ซึ่งจากผลการทดลองจาก 400 ไอโซเลท พบแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก และให้ผลต่อการสร้างเอนไซม์คาตาเลส จำนวน 65 ไอโซเลท

ความทนทานต่อน้ำดีเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญสำหรับโปรไบโอติกที่จะสามารถรอดชีวิตในลำไส้เล็ก (Kim et al., 2007) ดังนั้นการทน

ต่อเกลือน้ำดีจึงเป็นการทดสอบที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยพบว่ามี 12 ไอโซเลท จาก 65 ไอโซเลทของแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก และให้ผลต่อการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้

แบคทีเรียโปรไบโอติกมีการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะ exogenous enzyme และมักพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จะผลิตเอนไซม์ Protease ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่มักจะแสดงกิจกรรม Amylase ที่ต่างกัน (Taheri et al., 2009) ซึ่งจากการศึกษาของ Kim et al. (2007) ไม่พบเอนไซม์ lipase ในแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับการคัดแยกโปรไบโอติกในครั้งนี้ที่พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถย่อยโปรตีนได้ โดยมีเพียง 2 ชนิดที่สามารถย่อยไขมัน และพบเพียงชนิดเดียวที่สามารถย่อยแป้งได้

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจแสดงถึงความสามารถในการแย่งจับพื้นที่กับเชื้อโรคที่อยู่ในลำไส้ (competitive exclusion) โดย Jin et al. (1996) และ Ehrmann et al. (2002) อธิบายว่า แบคทีเรีย *Lactobacilli* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ได้โดยการผลิตกรดอินทรีย์ ซึ่งจากผลการศึกษานี้พบว่าเชื้อแบคทีเรีย ASAT-PD18 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ

Streptococcus agalactiae ได้ นอกจากนี้การทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะมีความสำคัญเช่นกันเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเป็นสารเติมแต่งอาหารสัตว์ (Taheri et al., 2009) ทั้งนี้จากการทดลองพบว่า ASAT-PD18 มีความไวต่อยา Ampicillin, Colistin, Norfloxacin, Penicillin และ Sulphamethoxazole/Trimethoprim

อย่างไรก็ตาม จากการคัดแยกคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากมูลไก่ประดู่หางดำจำนวน 80 ตัวอย่าง ที่สามารถแยกเชื้อได้ 400 ไอโซเลท พบเพียง 1 ไอโซเลท คือ ASAT-PD18 ที่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง (bacilli) การจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นแบบเดี่ยว (Single) และให้ผลลบต่อการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส มีความสามารถการทนต่อเกลือน้ำดี มีความสามารถในการย่อยแป้ง โปรตีน และไขมัน มีความสามารถในการทนกรด-ด่าง มีความสามารถต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และถึงจะพบว่า ASAT-PD18 มีความไวต่อสารปฏิชีวนะ แต่เมื่อพิจารณาคุณสมบัติต่าง ๆ ร่วมกัน จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อ ASAT-PD18 น่าจะเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ไพรัตน์ ศรีแสง. 2549. แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

รุจา มาลัยพวง. 2544. การผลิตโปรไบโอติกส์สำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลคติกของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

รุ่งโรจน์ แทนสมบัติ และสุวิษฐา บัวชาติ. 2561. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจากวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม. ว. วิทย. กษ. 49 : 3 (พิเศษ) :294-300 (2561)

Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid Bacteria : classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria. (ed.

salminen, S. and Wright, A. V.) New York : Marcel Dekker. Pp. 1-64.

Chou, L. S. and B. Weimer. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 82:23-31.

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

Ehrmann, M. A., P. Kurzak, J. Bauer and R. F. Vogel. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J. Appl. Microbiol. 92:966-975.

Fuller, R. 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cell. J. Appl. Bacteriol. 37:245-250.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.

Gusils, C., S. N. González, G. Oliver. 1999a. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. Can J Microbiol. 45(12):981-7.

Gusils, C., A. Chaia, S. Gonzalez and G. Oliver. 1999b. Lactobacilli isolated from chicken intestines: Potential use as probiotics. J. Food Prot. 62:252-256.

Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, M. A. Ali and S. Jalaludin. 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. Lett. Appl. Microbiol. 23:67-71.

Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, N. A. Ali and S. Jalaludin. 1998. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. Animal Feed Science and Technology. 70: 197-209.

- Kim , E. Y., Y. H. Kim, M. H. Rhee, J. C. Song, K. W. Lee, K. S. Kim, S. P. Lee, I. S. Lee and S. C. Park. 2007. Selection of *Lactobacillus* sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:111–117.
- Lee, H. S., S. E. Gilliland and S. Carter. 2001. Amylolytic cultures of *Lactobacillus acidophilus*: Potential probiotics to improve dietary starch utilization. *J. Food Sci.* 66:338–344.
- Michael, J. and J. Pelezar. 1995. Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid. In laboratory exercises in microbiology. New York : MC Graw Hill. Pp. 126-188.
- 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.
- Taheri H. R., H. Moravej, F. Tabandeh, M. Zaghari and M. Shivazad, 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic, *Poult. Sci.*, 88:1586–1593.