التأثير التثبيطي لراشح بكتريا *Lactobacillus gasseri* على البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من خراج حب الشباب[+]

THE INHIBITORY EFFECT OF *LACTOBACILLUS GASSERI* FILTERED ON GRAM POSITIVE ISOLATED FROM ACNE

[**]عبدالقادر كريم رميض [*]محمد خماس عبدالكريم

المستخلص

تمت دراسة التأثير التثبيطي لراشح بكتريا المعززات الحيوية ***lactobacillus gasseri*** تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب acne وخاصة البكتريا الموجبة لصبغة غرام حيث شملت العزلات التالية:

Staphylococcus , Staphylococcus aureus , Propionbacterium acnes epidermidis

حيث ابدت العزلات المرضية جميعها حساسية واضحة للمضادات الحياتية Ciprofloxacin ، و مضاد Cefotaxime وكانت جميع العزلات مقاومة للمضادات Ampicillin ، ومضاد Gentamicin وكانت العزلات اغلبها مقاومة للمضاد الحياتي Erythromycin .

قيست الفعالية التثبيطية لراشح ***Lb. gasseri*** غير المركز والمركز بعد تنميتها على وسط De-Man-Regosa Sharpe (MRS) تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب بعد 24 ، 48 ، 72 ساعة فترة حضانة هوائيا على التوالي بطريقة الانتشار في الحفر ، حيث اظهرت النتائج ان فترة الحضانة 48 ساعة مع راشح ***Lb. gasseri*** المركز مرتين هي الظروف المثلى لانتاج المثبطات الحيوية وبالتالي تثبيط نمو البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب قيد الدراسة ، بينما كان تأثير راشح ***Lb. gasseri*** غير المركز والمركز عند ظروف النمو الاخرى (72,24) ساعة اقل تأثيرا او عديم التأثير على نمو البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب .

فيوصى باستخدام النواتج الايضية لهذه البكتريا في مختلف التطبيقات وامكانية ايجاد عزلات كفوؤة ضد الانواع البكتيرية المرضية الاخرى .

Abstract

We studied the inhibitory effect of ***lactobacillus gasseri*** filterate against pathogenic bacterialisolates from acne especially ***Propionbacterium acnes , Staphylococcus aureus*** and ***Staphylococcus epidermidis.***

All pathogenic isolates were susceptible to Ciprofloxacine , and Cefotaxime antibiotics , while all isolates are resistance to Erythromycin.

[+] **تاريخ استلام البحث ٢٤ / ١١ / ٢٠١٠ تاريخ قبول البحث للنشر ٣١ / ٥ / ٢٠١١**

[*] **مدرس/ قسم التحليلات المرضية/المعهد الطبي التقني/المنصور**

[**] **مدرس مساعد/ قسم التحليلات المرضية/المعهد الطبي التقني/المنصور**

The inhibitory effect of unconcentrated and double concentrated ***Lb. gasseri*** filterate were measured against acnes bacterial isolates at 24 , 48 , and 72 hrs respectively by using well diffusion method . The results showed that the highest inhibitory effect of ***Lb. gasseri*** filterate on acne pathogens was at 48 hrs incubation period using the double concentratated filterate , while the inhibitory effect of unconcentrated and double concentrated ***Lb. gasseri*** filterate on acne pathogens was less or nil when cultured at (24 , 72) hrs .

We recommend to use the metabolism product of the tested bacteria in different applications and using efficient strain against another pathogenic bacteria.

المقدمة:

حب الشباب acne هوحالة مرضية ناتجة تحت تأثير هرموني في الغدد الدهنية الموجودة في الجلد مسببةغلق فتحات القنوات الدهنية ، ينتشر حب الشباب في الوجه ، والرقبة ، والظهر ، والصدر[1].

استخدمت في السنوات الاخيرة العديد من الاحياء المجهرية لعلاج العديد من الامراض والمحافظة على صحة الانسان وذلك لاستخدامها الامن وهومايطلق عليه العلاج بالمعززات الحيوية (Probiotics) ، وتعد بكتريا حامض اللاكتيك من اشهر المعززات الحيوية المستخدمة لهذا الغرض ، اذ ان هذه البكتريا مستخدمة منذ فترة طويلة في الصناعات الغذائية والزراعية وغيرها ، حيث اثبت استخدامها الامن في هذه المجالات ، كذلك توجد هذه البكتريا كفلورا طبيعية في بعض اجزاء القناة الهضمية[3,٢] .

تضم بكتريا حامض اللاكتيك اجناسا وانواعا عديدة استخدمت كمعززات ويعتبر جنس *Lactobacillus* اكثر الانواع شيوعا واستخداما في هذا المجال [4] .

اهم انواع الجنس *Lactobacillus* هي :

Lb. acidophilus , Lb. gasseri, Lb. fermentum , Lb. bulgaricus. [5] .

تتميز المعززات الحيوية من خلال محافظتها على صحة الانسان وتعزيزها من خلال الفعالية الايضية لها والنواتج التي تفرزها وذلك من خلال تنافسها مع الممرضات وتحفيز الجهاز المناعي والتقليل من التأثيرات الجانبية للعلاج بالمضادات الحياتية [6] ، كما ان للمعززات الحيوية دورا مهما في علاج الاسهال ، وخفض مستوى الكوليسترول في الدم ، وعلاج حالات الامساك وغيرها [8,7] ، وكذلك لها دورفي علاج اصابات الكبد ، والبكتريا ، والمجاري البولية [10,9,8] .

اجريت العديد من الدراسات المحلية والعالمية لدور بكتريا حامض اللاكتيك في تثبيط نمو البكتريا الممرضة او الممرضات بصورة عامة ، استخدم النوع *Lb. gasseri* لدراسة تأثيره التثبيطي تجاه البكتريا المرضية المعزولة من اصابات حب الشباب ودراسة التأثير التثبيطي لبكتريا *Lb. gasseri* على البكتريا المرضية المسببة لحب الشباب .

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية:-

1- بكتريا *Lb. gasseri* المعزولة من براز الاطفال الرضع

2- البكتريا المسببة لحب الشباب

عزلة من البكتريا الموجبة لصبغة غرام من العيادة الاستشارية في مستشفى اليرموك للفترة من 20تم الحصول على 30/12/2009. ولغاية 1/10/2009

[11] تم التأكد من تشخيص العزلات باجراء الفحوصات الكيموحيوية حسب ماورد في

تجاه البكتريا المسببة لحب الشباب *L. gasseri*تقديرالفعالية التثبيطية لبكتريا

طريقة الانتشار في الحفر

حضر وسط De-Man-Regosa Sharpe (MRS)) في انابيب اختبار ، اذ 6 السائل ذو اس هيدروجيني) م 37 للحصول على راشح لهذه البكتريا ، ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة (*Lb. gasseri*لقح الوسط ببكتريا دقيقة 15دورة/ دقيقة) لمدة 6000 ، ثم نبذت الانابيب ([12] ساعة وتحت ظروف لاهوائية كما ذكر 24لمدة) milipore filterللحصول على سائل الخلايا الحرة للمزروع ، ثم رشح السائل عبر استخدام مرشحات دقيقة ( ) مايكروميتر.0.22بقطر(

للكشف عن الفعالية التثبيطية لراشح [13]) التي وصفها well-diffusionاستخدمت طريقة الانتشار في الحفر ( ) مل من لقاح عزلات البكتريا 0.1 ، اذ لقحت الاطباق الحاوية على وسط الاغار المغذي بنشر(*Lb. gasseri* مليمتر) ، ثم ملئت كل 5خلية/مل) باستخدام ناشر معقم ، واستخدام ثاقب الفلين (10^5 المسببة لالتهاب حب الشباب (-24) م لمدة (37 ، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (*Lb. gasseri*) مايكروليتر من راشح بكتريا 50حفرة بـ ( ) السائل MRS) ساعة ، ثم قيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معامل السيطرة الحاوية على وسط (18 ، ثم اجريت تجربة اخرى باستخدام الراشح المركز بدلا من الراشح غير المركز للحصول [14]دون لقاح بكتيري ، ثم قورنت اقطار مناطق التثبيط للراشح [15] على فعالية تثبيطية افضل وذلك عندما تم تركيز الراشح لمرتين المركز ضد البكتريا المرضية قيد الدراسة مع الراشح غير المركز .

فحص الحساسية الدوائية لمضادات الحياة

، حيث [16] وحسب ماذكر في Disk diffusion تم اختبار الحساسية الدوائية للعزلات قيد الدراسة بطريقة استخدمت مضادات الحياة :

Erythromycin(15 µg) , Gentamicin(10 µg) , Ciprofloxacin(5 µg), Cefotaxime (30 µg), Ampicilin(10µg)

دراسة التأثير التثبيطي لراشح *Lb. gasseri* تجاه البكتريا المعزولة من حب الشباب

لقحت الاوساط الزرعية السائلة MRS بـ 1 % من مزروع بكتريا ***Lb. gasseri*** في انابيب اختبارنظيفة ومعقمة ، بعدها حضنت هذه الاوساط لاهوائيا وهوائيا(كسيطرة) عند درجة حرارة (37) م لمختلف الاوقات (24 , 48, 72 ساعة) على التوالي [12] ، بعد انتهاء فترة الحضن نبذت الانابيب الحاوية على المزروع البكتيري عند 4500 دورة / دقيقة للحصول على الراشح الذي تم الحصول عليه باستخدام مرشحات دقيقة ذات قطر 0.22 مايكروميتر ، ثم استخدمت طريقة Well diffusion method حسب ماذكر [17] ، باستخدام وسط الاغار

الصلب ، لقحت لاطباق بـ 0.1 مل من البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب و نشرت بوساطة مسحة قطنية معقمة على كل وسط الاغار الصلب ، ثم باستخدام ثاقب الفلين cork porer عملت حفر بقطر 5 مليمتر وملئت الحفر براشح بكتريا المعززات الحيوية ***Lb. gasseri*** ، بعدها حضنت الاطباق هوائيا ولاهوائيا عند درجة 37 م لمدة 24 ، 48 ، و72 ساعة ، بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط حول الحفر بالمليمتر ، وفي تجربة اخرى استخدم راشح ***Lb. gasseri*** المركز بدلا من الراشح غير المركز للحصول على فعالية تثبيطية افضل وذلك عندما ركز الراشح مرتين [15] ، قيست الفعالية التثبيطية لـ ***Lb. gasseri*** حول الحفر بالمليمتر .

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 20 عزلة من اصابات حب الشباب ، من بعض المدارس الثانوية من بغداد ، اذ عزلت 10 عزلات بكتيرية موجبة لصبغة غرام ، شملت الانواع التالية :

5عزلات تابعة للنوع *Propionobacterium acens* ، 3 عزلات للنوع *Staphylococcus aureus*، وعزلتان للنوع *S. epidermidis* .

مضادات الحياة المستعملة لاجراء فحص الحساسية الدوائية لهذه العزلات شملت الانواع :

Ciprofloxacin (CF) , Erythromycin (E) , Gentamicin (GM) , Ampicilin (AM) , Cfotaxime(CTX) .

نتائج فحص الحساسية لمضادات الحياة للبكتريا المعزولة من حب الشباب مبينة في جدول رقم [1] ، حيث يلاحظ ان جميع العزلات كانت حساسة لمضادات الحياة Ciprofloxacin ، Cfotaxime ، وكانت مقاومة للمضادات Ampicilin , Gentamicin ، وكانت العزلات اغلبها مقاومة لمضاد Erythromycin

جدول [1] فحص الحساسية لمضادات الحياة للعزلات البكتيرية

Bacteria	CF	CTX	E	GM	AM
P. acnes 1	S	S	R	R	R
P.acnes 2	S	S	R	R	R
P. acnes 3	S	S	R	R	R
P. acnes 4	S	S	R	R	R
P. acnes 5	S	S	R	R	R
S. aureus 1	S	S	R	R	R
S. aureus 2	S	S	S	R	R
S. aureus 3	S	S	R	R	R
S. epidermidis1	S	S	R	R	R
S.epidermidis2	S	S	S	R	R

R= resistance

S= sensitive

قيست الفعالية التثبيطية بقياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر لراشح بكتريا ***Lb. gasseri*** غير المركز والمركز مرتين تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب على وسط MRS بعد 24، 48، 72 ساعة من الحضن هوائيا بطريقة الانتشار في الحفر well diffusion method ، فقد تبين بعد 24، 48 ، 72 ساعة (جدول رقم2 ، ورقم 3 ، ورقم 4) من حضن عزلات البكتريا المرضية مع راشح ***Lb. gasseri*** غير المركز وراشح ***Lb. gasseri*** المركز مرتين على التوالي ***S. epidermidis1 , S. aureus2 , P.acnes1, P .acnes2, P. acnes3*** ، حيث تم ملاحظة تثبيط نمو عزلات حيث كانت اكثر العزلات تأثرا من قبل راشح المعززات الحيوية ***Lb. gasseri*** عند تركيز الراشح مرتين وبعد فترة الحضانة 48 ساعة ، حيث تبين ان تركيز راشح ***Lb. gasseri*** لمرتين وفترة حضانة 48 ساعة هي الظروف المثلى لتثبيط نمو العزلات المرضية المسببة لالتهاب حب الشباب acne . وكان تاثير راشح Lb. gasseri غير المركز والمركز عند ظروف النمو الاخرى [72,24] ساعة اقل تاثيرا او عديم التاثير على نمو البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب .

كما ان العزلات ***S. epidermidis2 , P. acnes5 , P. acnes4*** هي الاكثر مقاومة للتأثير التثبيطي لبكتريا المعززات الحيوية .

وقد تعددت الاراء حول طبيعة المواد المثبطة المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك فقد ذكر الباحث Otles واخرون [18] ان بكتريا المعززات الحيوية لها القدرة على تثبيط نمو البكتريا المرضية في المختبر وداخل الجسم الحي in vitro and vivo من خلال انتاج مركبات ضد مايكروبية ومركبات تثبط نمو البكتريا مثل cytokines ، و butyric acid .

كما ذكر الباحث Gan واخرون [19] ان سلالات خاصة من بكتريا المعززات الحيوية *Lactobacillus* لها خواص ضد التهابية anti infective properties ولها القدرة على تثبيط نمو ***S. aureus*** المصاحبة لعمليات الاصابة بالجروح ، وقد يعزى التأثير التثبيطي لبكتريا ***Lb. gasseri*** تجاه البكتريا المعزولة من حب الشباب الى احتواء راشح بكتريا ***Lb. gasseri*** على مواد مثبطة مثل حامض اللاكتيك وحامض الخليك اللذان يعتبران الحامضيين الرئيسيين المنتجين من هذه البكتريا من خلال اختراق هذين الحامضين للاغشية الخلوية واعاقة نقل المواد الغذائية [22,21,20]، كما يحتوي راشح ***Lb. gasseri*** على مادة مثبطة اخرى هي البكتريوسين الذي له فعل قاتل او له القدرة على الارتباط بمستلمات متخصصة موجودة على الغشاء البلازمي للخلية البكتيرية مما يسبب تدفق غير مسيطر عليه للاحماض الامينية والايونات الموجبة الشحنة مما يسبب انفجار الغشاء الخلوي وموت البكتريا الحساسة له [20] . وقد يعود الفعل التثبيطي لراشح *Lb. gasser.* الى الطبيعة البروتينية للراشح فقد وجد [23]ان راشح بكتريا حامض اللاكتيك فقد فعاليته المضادة لنمو البكتريا عند معاملتها بالانزيمات الهاضمة للبروتين مثل pepsin , trypsin .

ويمكن ان تؤدي بكتريا Lactobacillus الى تغير رقم الاس الهيدروجيني للوسط مما يقود الى انتاج وتحول البكتريوسين من الشكل غير الفعال الى الشكل الفعال مما يؤدي الى انخفاض قيمة الاس الهيدروجيني الناتج عن تاثير الاحماض العضوية التي تنتجها بكتريا *Lactobacillus* داخل الخلية يؤدي الى تعطيل العمليات الايضية مثل عمليات الاكسدة على مستوى المادة الاساس وعمليات نقل المواد من والى الخلية [24].

مما يتضح ان فترة الحضانة 48 ساعة وتركيز راشح ***Lb. gasseri*** لمـــرتين (جـــدول رقـــم 3) هـــي الظـــروف المثلـــى لانتاج المثبطات المايكروبية لهذه البكتريا تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب .

الاستنتاجات :

ظهر مما تقـــدم مـــن النتـــائج ان راشـــح بكتريـــا *Lb. gasseri* ذو فعاليـــة تثبيطيـــة واضـــحة تجـــاه بعـــض البكتريـــا الممرضة للانسان مما يشجع لاجراء المزيد من الدراسات المستقبلية حول هذا الموضوع .

جدول رقم (2)

التأثير التثبيطي لراشح ***Lb. gasseri*** تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب بعد 24 ساعة حضن

Pathogen isolates	قطر منطقة التثبيط (مليمتر) تجاه البكتريا المرضية عند استخدام راشح *Lb. gasseri* غير المركز	قطر منطقة التثبيط (مليمتر) تجاه البكتريا المرضية عند استخدام راشح *Lb. gasseri* المركز مرتين
P. acnes 1	14	15
P.acnes 2	15	15
P. acnes 3	12	14
P. acnes 4	-	-
P. acnes 5	-	-
S. aureus 1	-	-
S. aureus 2	-	-
S. aureus 3	-	-
S. epidermidis1	10	12
S.epidermidis2	-	-

(-) = no inhibition zone

جدول رقم (3)

التأثير التثبيطي لراشح ***Lb. gasseri*** تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب بعد 48 ساعة حضن

Pathogen isolates	قطر منطقة التثبيط (مليمتر) تجاه البكتريا المرضية عند استخدام راشح *Lb. gasseri* غير المركز	قطر منطقة التثبيط (مليمتر) تجاه البكتريا المرضية عند استخدام راشح *Lb. gasseri* المركز مرتين
P. acnes 1	16	20
P.acnes 2	18	26
P. acnes 3	12	28
P. acnes 4	-	5
P. acnes 5	-	-
S. aureus 1	6	10
S. aureus 2	8	20
S. aureus 3	7	11
S. epidermidis1	11	17
S.epidermidis2	-	-

جدول رقم (4)

التأثير التثبيطي لراشح ***Lb. gasseri*** تجاه البكتريا المرضية المعزولة من حب الشباب بعد 72 ساعة حضن

Pathogen isolates	قطر منطقة التثبيط (مليمتر) تجاه البكتريا المرضية عند استخدام راشح *Lb. gasseri* غير المركز	قطر منطقة التثبيط (مليمتر) تجاه البكتريا المرضية عند استخدام راشح *Lb. gasseri* المركز مرتين
P. acnes 1	13	14
P.acnes 2	15	13
P. acnes 3	10	11
P. acnes 4	-	-
P. acnes 5	7	8
S. aureus 1	7	6
S. aureus 2	5	5
S. aureus 3	-	-
S. epidermidis1	10	10

S.epidermidis2	-	-

References المصادر

1. Akligman,A.M. "An overview of acne " *J.Invest. Dermatol*, Vol.62,pp.268-787, 1974.
2. Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. "Introduction to pre-and probiotics" *Food research Itern*, Vol. 35, pp.109-116, 2002.
3. Chukeatirote, E. " Potential use of probiotics " *J. Sci. Technol*, Vol. 25(2), pp. 275-282, 2003.
4. Isolauri, E.; Sutas, Y,; Kankaanpaa, P.; Arvilommi, H. and Salminen, S. " Probiotics : effect on immunity " *American J. of Clinic. Nutr*, Vol. 73(2), pp. 444-450, 2001.
5. Delgado, A.; Brito, D.; Fevereiro, P.; Peres, C. and marques, J.F. " Antimicrobial activity of *L. plantarum,* isolated from atraditional lactic acid fermentation of table olives " *INRA. EDP. Science. Lait*, Vol. 81, pp.203-215, 2001.
6. Aattouri, N.; Bouras, M.; Tome, D.; Marcos, A. and Leronnier, D. " Oral ingestion of lactic acid bacteria by rate increases lymphocytic proliferation and interferon proliferation and interferon production " *Br.J. Nutr*, Vol. 87, pp.267-370, 2002.
7. Reid, G.; Zalai, C. and Gardiner, G. " Urogenital Lactobacilli probiotics, reliability and regulatory issues " *J.Dairy.Sci,* Vol. 84, pp.164-169, 2001.
8. Pea, J.A.; Li, S.Y.; Wilson, P.H.; Thibodeau, S.A.;Szary, A.J. and Versalovic, J. " Genotypic and Phenotypic studies of mrine intestinal lactobacilli: Species differences in Mice with and without colitis " *Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 70(1), pp.558-568, 2004.
9. Jenkins, B.; Holsten, S.; Bengmark,S. and Martindale,R. " Probiotics: A practical Review of their Role in specific clinical scenarios " *Nutrition in Clinical Practice*, Vol. 20(2), pp. 262-270, 2005.
10. Kontiokari, T.; Sundgvist, K.; Nuntinen, M. and Uhari, M. " Randomised trial of cranberry juice and Lactobacillus Ggdrink for the prevention of urinary tract infection in women " *B.M.J*, Vol.1, pp.453-456, 2001.
11. Forbes, B.; Sahm. D. and Weissfeld, A., *Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Elsevier, Pheladelphia, U.S.A, 2007.
12. Lewus, C.B.; Kaiser, A. and Montvill, T.J. " Inhibition of food – borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat " *J.Appl Environ. Microbiol,* Vol. 57, pp.1683-1688,1991.
13. Gupta, U.; Rati, E.R. and Joseph, R. " Nutritional quality of lactic acid fermented bitter gourd and fenugreek leaves " *International Journal of food Sciences and Nutrition,* Vol. 49(2), pp.101-108, 1998.
14. Martinza-Gonzalez, B.; Eriotou, E.; Michopoules, S.; Kolantzopoulos, G.; Tsakalidou, E. and Mentis, A. " In Vitro and In Vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota " *Appl. Environ. Microbiol,* Vol. 70(1), pp.518-526, 2004.
15. Sreekumar, O. and Hosono, A. " Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of *Escherichia coli* in co culture " *J. Dairy Sci,* Vol. 83,pp. 931-939, 2000.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard M2-A7,7th ed., National Committee for Clinical Laboratory Standard, Pennsylvania, 2000.
17. Vignolo, G.M.; Suriani, F.; Halgado, A.P.R. and Oliver, G. " Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages " *J.Appl. Bacteriol,*pp.344-372, 1993.
18. Otles, S.; Cagindi, O. and Alkeieek, E. " Probiotics and health " *Asian Pacific J. Cancer Prev*, Vol. 4, pp.369-372, 2003.
19. Gan, B.S.; Kim, J.; Reid, G.; Cadieux, P. and Howard, J.C, " *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. " *J. Infect. Dis,* Vol. 185,pp.1369-1372, 2002.

20. Mishra, C. and Lambert, J. " Production of anti-microbial substances by probiotics " *Asia Pasific. J. Clin. Nutr,* Vol.5, pp.20-24, 1996.

21. Ogawa, M.; Shmizu, K.; Nomoto, K.; Takahashi, M.; Tanaka, R.; Tanaka, T.; Yamasaki, S. and Takeda, Y. " Protective effect of *Lactobacillus casei* strain shirota on shiga toxin-producing *E. coli* O157: H7 infection in infant Rabbits" *Infect and Immun,* Vol.69(2), pp.1101-1108, 2001.
22. Hamilton-Miller. J.M " Probiotics and prebiotics in the elderly " *Postgrauate Medical Journal,* Vol.80,pp.447-451, 2004.
23. Sookkhee, S.; Chulasiri, M. and Prachbrued, W. " J. Appl. Microbiol. Vol. 90(2), pp. 172-179, 2001.
24. Smulder, F.; Barendsen, P.; Logting, J. and Marell, J. ' J. Food. Tech. Vol. 21,pp. 419-436, 2004.