بررسی اثرات لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم لانگوم بر روی شاخص‌های خونی موش‌های ماده BALB/c آلوده به سالمونلا تیفی‌موریوم ATCC۱۴۰۲۸

زینب عزیزی پور[۱]، مهدی رهنما[۱*] و رضا شاپوری[۲]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی، زنجان، ایران

۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران

meh_rahnema@yahoo.com

چکیده

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن به میزان کافی سبب افزایش سطح سلامت مصرف کننده شده و در درمان و برطرف نمودن عفونت‌های گوارشی در انسان و حیوانات با عامل سالمونلا تیفی موریوم استفاده می‌گردد. به همین لحاظ هدف از این تحقیق، مطالعه تأثیر مخلوط پروبیوتیکی در پیش‌گیری و درمان موش‌های ماده BALB/c آلوده به سالمونلا تیفی‌موریوم ATCC۱۴۰۲۸ و بررسی اثرات این مواد بر روی شاخص های خونی و سطح کلسترول سرم خون موش‌های آلوده است. در این تحقیق ۱۸ سر موش ماده BALB/c ۸-۶ هفته‌ای به سه گروه شش‌تایی تجربی، کنترل و شم تقسیم بندی گردیدند. پس از ۳۵ روز پیش تیمار با مخلوط پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم) برای گروه تجربی و نرمال سالین برای گروه شم، به صورت خوراکی یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری ($۱۰^{۳}$ CFU/ml) به صورت صفاقی به موش ها تزریق گردید. پس از طی دوره‌ی پیش تیمار از موش ها جهت آزمایش‌های شاخص خونی، خون گیری وپس از تشریح موش و بر داشتن طحال ، هموژنیزاسیون طحال انجام و تعداد باکتری‌ها سنجیده شد. بر طبق نتایج به دست آمده مخلوط پروبیوتیکی موجب کاهش تعداد سالمونلا تیفی‌موریوم، اندیکس طحالی و کبدی، کاهش اوزان کبد و طحال و افزایش تعداد لنفوسیت های خون گردید.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم، BALB/c، لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم.

مقدمه

دلایل زیادی نشان می‌دهد که بیشتر بیماری‌ها و عفونت‌ها در ارتباط با روش زندگی انسان‌ها می‌باشد. در چند قرن گذشته تغییرات شرایط زندگی و کاهش فعالیت فیزیکی، استرس‌های زندگی مدرن امروزی، تصنعی شدن وضعیت تغذیه انسان و به طور کلی فاصله گرفتن از زندگی طبیعی، استعداد ابتلا به بیماری‌های عفونی را در انسان افزایش داده است [۱]. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که در تعداد

کافی قادر به جایگزینی (کلونیزاسیون) فلور میکروبی نرمال بدن در جهت پیش‌گیری از بیماری‌ها و مقابله با عوامل پاتوژن و مصونیت فرد در برابر عامل بیماری‌زا می‌شوند [۱،۳]. بررسی‌های مختلف نشان داده که لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها اثرات مثبتی در درمان اختلالات دستگاه گوارشی و عفونت‌های روده-ای از طریق فعالیت های آنتاگونیستی با پاتوژن های روده‌ای، تغییرات سیستم ایمنی و افزایش موکوس معدی آسیب دیده شده و مصرف پروبیوتیک‌ها قادر به پایداری و بقای میکروفلور نرمال روده می‌گردد [۸-۴]. عفونت‌های سالمونلایی ممکن است به یکی از سه شکل بالینی گاستروآنتریت، سپتی سمی با ضایعات موضعی و یا تب روده‌ای مانند بیماری حصبه (تب تیفوئید) تظاهر کند [۹]. باکتری سالمونلا هنگامی که از معده به روده وارد می‌گردد، به دیواره متصل و از طریق برخی پروتئین های ویژه روده ای به درون روده نفوذ و وارد طحال و کبد گردیده و در آن جا تکثیر می‌یابد [۱۰]. استفاده از مواد پروبیوتیکی به صورت پیش تیمار از طریق مکانیسم‌های شیمیایی و فیزیکی مانع از اتصال باکتری به دیواره روده می‌گردد [۱۱]. عفونت سالمونلایی علت اصلی گاستروآنتریت با منشأ غذایی است. سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس سروتایپ هایی از سالمونلا هستند که از عوامل سالمونلوزیس در انسان می‌باشند. سالمونلا تیفی موریوم به طورمعمول از طریق غذاهای آلوده به دستگاه گوارش مصرف کنندگان منتقل شده و سالمونلوزیس را سبب می‌گردد [۲]. استفاده نامناسب و نابه‌جا از آنتی بیوتیک ها موجب مقاوم شدن باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها گردیده و به همین علت راه‌های جدیدی برای کنترل عفونت مورد بررسی قرار گرفته که از جمله این راه‌ها استفاده از مواد پروبیوتیکی می-باشد [۱۲،۱۳]، لذا هدف از این پژوهش بررسی اثرات لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم لانگوم بر روی شاخص‌های خونی موش ماده BALB/c آلوده به سالمونلا تیفی موریوم ATCC۱۴۰۲۸ می‌باشد.

مواد و روش کار

تعداد ۱۸ سر موش ماده نژاد BALB/c ۸-۶ هفته ای از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه و به مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان منتقل گردید. به منظور تطبیق حیوانات با شرایط جدید آزمایشگاهی به مدت یک هفته در شرایط استاندارد (۲±۲۴ درجه سانتی گراد دما، رطوبت ۵۲ و فتو پریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگه داری [۱۴] و سپس موش‌ها به صورت تصادفی به ۳ گروه ۶ تایی شامل گروه تجربی (پیش تیمار با مخلوط پروبیوتیکی)، گروه شم (پیش تیمار با نرمال سالین) و گروه کنترل تقسیم بندی و به مدت ۳۵ روز به صورت خوراکی پیش تیمار با مواد مذکور شدند. مخلوط پروبیوتیک کپسول‌های Re-vitalize X_2 تهیه شده از شرکت ANTIAGING کالیفرنیا شامل ۳ سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم و سویه سالمونلا تیفی موریوم ATCC۱۴۰۲۸ از مرکز کلکسیون میکروبی آمریکا خریداری شد. پس از طی مدت پیش تیمار، تمام موش‌های تجربی و شم با ۱ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی 10^3CFU/ml سالمونلا به صورت صفاقی آلوده شدند [۱۵]. از موش‌ها پس از

طی دوره تیمار، خون گیری به عمل آمد سپس موش ها نخاعی گردیده و وزن موش، وزن کبد و طحال مشخص گردید. نمونه های خونی در ویال های CBC حاوی EDTA جمع آوری و آزمایش‌های CBC، WBC و اندازه گیری کلسترول صورت پذیرفت [۱۶]. با رعایت شرایط استریل طحال خارج و پس از لیز شدن، به منظور هموژنیزاسیون، به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی، رقت سازی صورت گرفت و از هر رقت در محیط SS آگار پورپلیت انجام گردید.پلیت ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند و سپس شمارش کلونی های سالمونلا تیفی موریوم صورت پذیرفت. به منظور اطمینان از نتایج آزمایش ها مراحل فوق ۳ بار تکرار گردید [۱۷]. نتایج حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری One Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

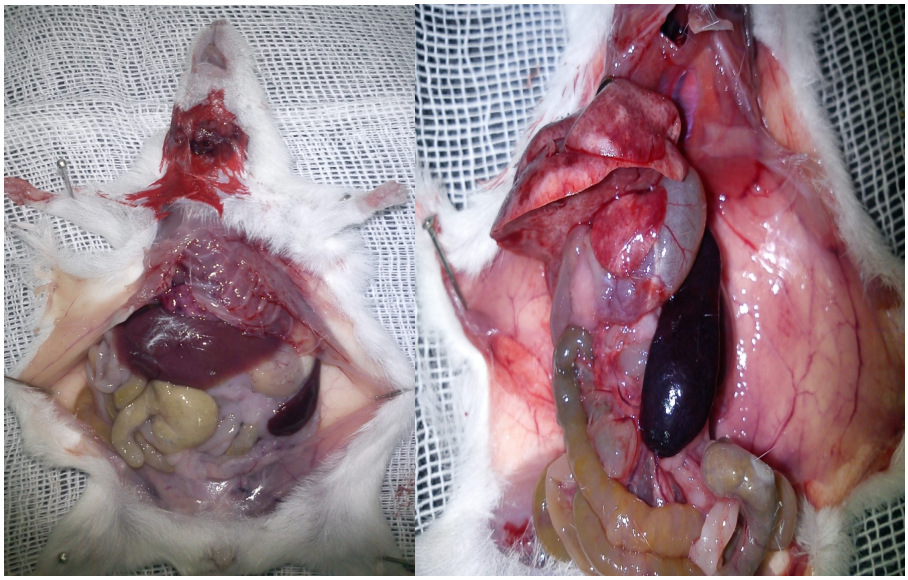
در مشاهدات ماکروسکوپی حجم و وزن کبد و طحال در موش‌های پیش تیمار شده با مخلوط پروبیوتیکی اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شاهد را نشان می‌دهد، به طوری که استفاده از پیش تیمار پروبیوتیکی موجب کاهش اندازه غدد داخلی گردید (شکل ۱). اختلاف معنی‌داری ما بین گروه‌های پیش تیمار و کنترل در اندیکس طحالی و کبدی در سطح$P<۰/۰۵$ وجود دارد که خود تائید کننده‌ی مشاهدات ماکروسکوپی می باشد. استفاده از پیش تیمار پروبیوتیکی موجب کاهش معنی‌دار تعداد کلنی های شمارش شده سامونلا تیفی موریوم ذخیره شده در طحال می‌گردد (جدول ۱). نتایج آزمایش‌های شاخص خونی موش‌های آلوده مشخص نمود که مصرف پیش تیمار موجب افزایش معنی‌دار تعداد لنفوسیت‌های خون نسبت به گروه کنترل و شاهد گردیده و در سایر شاخص‌های خونی اختلاف معنی-داری مشاهده نشده است (جدول ۲).

جدول ۱ـ میانگین و انحراف از معیار اثر پیش تیمار مخلوط پروبیوتیک بر روی پارامترهای وزنی و میزان سالمونلا تیفی‌موریوم در طحال

گروه موش	وزن موش (گرم)	وزن کبد (گرم)	اندیکس کبدی (میلی گرم بر لیتر)	وزن طحال (گرم)	اندیکس طحالی (میلی گرم بر لیتر)	میزان سالمونلا تیفی موریوم بر حسب CFU/ml
پروبیوتیک	۲۷/۵۶ ±۱/۸۶	۱/۸۰±۰/۲۶	۶۵.۱۳±۱۳/۲۲	۰/۲۱±۰/۰۳	۷/۷۹±۱/۱۹	$۵/۷\times۱۰^{۴}\pm۶۳۴۱۱$
شم	۲۳/۹۵±۰/۸۴	۱/۹۷±۰/۱۲	۸۲.۳۸±۲/۸۱	۰/۳۷±۰/۰۵	۱۵/۴۶±۱/۹۷	$۷/۵\times۱۰^{۷}\pm۳۸۲۴۰۰۰۰$
کنترل	۲۴/۸۲±۲	۲/۰۵±۰/۱۴	۸۲.۵۹±۱۱/۲۷	۰/۳۹±۰/۰۲	۱۵/۶۰±۱/۰۷	$۷/۹\times۱۰^{۷}\pm۲۵۹۸۷۵۰۰$

جدول۲- میانگین و انحراف از معیار اثر پیش تیمار مخلوط پروبیوتیک بر روی شاخص‌های خونی پس از آلودگی به سالمونلا تیفی موریوم

گروه موش	گلبول سفید	گلبول قرمز	هموگلوبین	هماتوکریت	نوتروفیل	لنفوسیت	مونوسیت	ائوزنوفیل	کلسترول
پروبیوتیک	۳۳۰۲± ۱۱۹۱/۶۷	۸/۴۷± ۱/۳۰	۱۴/۱± ۰/۷۷	۴۳/۸± ۲/۶۳	۵۲/۳۳± ۱۱	۴۱/۶۷± ۱۰/۶۷	۳/۸۳± ۱/۲۲	۲/۱۷± ۰/۵۶	۹۲/۵± ۴/۸۳
شم	۳۱۴۰± ۱۶۴۶/۶۷	۹/۳۴± ۰/۴۱	۱۳/۶۷± ۰/۷۶	۴۴/۷۷± ۲/۴۹	۷۳/۳۳± ۱۳/۵۶	۲۲/۶۷± ۹/۷۸	۴±۲/۶۷	۳±۲	۸۹/۶۷± ۲۲/۲۲
کنترل	۳۱۷۶/۷۵± ۵۹۸/۲۵	۹/۱۱۷۵± ۰/۰۹	۱۳/۴± ۰/۵۰	۴۳/۲۵± ۱/۰۵	۶۷±۴	۲۵/۷۵± ۴/۷۵	۴±۱/۵۰	۳/۲۵± ۰/۷۵	۸۶/۷۵± ۱۵/۷۵



شکل ۱ـ مقایسه اندازه کبد و طحال بین گروه‌های تجربی (سمت چپ) و کنترل (سمت راست)

بحث

مطالعات Gill و همکارانش نشان داده که لاکتوباسیلوس رامنوسوز می تواند عفونت حاصل از سالمونلا تیفی موریوم را در موش نژاد BALB/c به طور معناداری کاهش می‌دهد [۱۸]. De Keersmaeckerو همکارانش (۲۰۰۶) بیان کردند که فعالیت قوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (L.rhamnosus GG) علیه سالمونلا تیفی‌موریوم به دلیل تجمع اسید لاکتیک است [۱۹]. Forestier و همکارانش (۲۰۰۱) نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه رامنوسوس سوش۳۵ Lcr، اثر باکتری بیماری‌زای روده‌ای اشریشیاکلای، اشریشیای انتروتوکسیژنیک و کلبسیلا پنومونیه را کاهش داده است [۲۰]. هم چنین در ادامه‌ی مطالعه شان نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوسوس سوش ۳۵ Lcr می تواند رشد تعداد وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا، از جمله سالمونلا تیفی موریوم را مهار کند [۲۰]. Lee و همکارانش (۲۰۰۳) ، طی تحقیقی که به صورت آزمایشگاهی انجام دادند دریافتند که لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا، در رقابت با باکتری‌های دستگاه گوارش در حدود ۴۶ درصد مانع از اتصال به سطح سلول‌های $CaCO_2$ می‌شوند و بیشترین میزان مهار لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا (بالای ۳۰درصد) روی اشریشیاکلی TG1، سالمونلا تیفی موریوم E۱۰، اشریشیاکلی ATCC۱۷۷۵ و سالمونلا تیفی موریوم ATCC۱۴۰۲۸ می باشد [۲۱]. در تحقیق حاضر نیز مخلوط سویه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم توانست میزان عفونت ناشی از سالمونلا تیفی موریوم

را با اختلاف معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) کاهش دهد. پریرا و گیبسون (۲۰۰۲) نشان دادند که استفاده روزانه از محصولات تخمیری لبنی حاوی پروبیوتیک (باکتری‌های اسیدلاکتیک و بیفیدوباکریاها) سطح کلسترول سرم را کاهش می دهد [۲۲]. که با نتایج تحقیق ما مغایرت داشت. Zhou و همکارانش (۲۰۰۰) با تلقیح پروبیوتیک به موش به مدت ۴ هفته تفاوتی بین کلسترول موش های تحت آزمایش و موش های کنترل مشاهده نکردند [۲۳]. در مطالعه ما نیز سطح کلسترول در بین گروه‌های مورد آزمایش اختلاف معنی داری نشان نداد که با نتایج تحقیق Zhou و همکارانش مطابقت داشت. تحقیقات صورت گرفته توسط Lim و همکاران (۲۰۰۴) ، مشخص شد که تنها گونه‌های خاصی از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و برخی گونه‌های بیفیدوباکتر توانایی کاهش مقدار کلسترول را در طول روده دارند [۲۴]. در تحقیق ما مخلوط پروبیوتیک‌های بیفیدوباکتریوم لانگوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس تأثیری بر کاهش سطح کلسترول سرم موش‌ها نداشت که با توجه به آزمایشات Lim و همکاران، علت آن می‌تواند عدم استفاده از لاکتوباسیل-های خاص باشد. Donohue و همکارانش (۱۹۹۸) با تلقیح لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس در غذای موش‌ها به مقدار CFU/kg $۲/۵\times۱۰^{۱۲}$، روزانه به مدت ۴ هفته، تأثیری در هماتولوژی خون موش‌ها و اندازه کبد و کلیه آنها دیده نشد. او هم چنین نشان داد که پروبیوتیک‌ها تاثیری بر روی کلسترول خون موش‌ها ندارند [۲۵].

Swendseid (۱۹۸۷) نشان داد که تیمار با باکتری-های اسید لاکتیک، به مدت ۴ هفته بر کلسترول خون اثر ندارد [۲۵]. وی هم چنین نشان داد که تلقیح باکتری های پروبیوتیک اسید لاکتیک به موش‌ها اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی هموگلوبین، هماتوکریت، پلاکت، RBC و WBC خون موش ها ندارند [۲۶]. نتایج حاصله از تحقیق حاضر بیانگر مهار عفونت ناشی از سالمونلا تیفی موریوم به میزان قابل توجهی با اختلاف معنی دار (P<۰/۰۰۱) بود. هم چنین اختلاف معنی داری در میزان سلول های سفید خون، سلول‌های قرمز خون، وزن موش‌ها، اندیکس کبدی، نوتروفیل، هموگلوبین، هماتوکریت، مونوسیت، ائوزینوفیل و کلسترول مشاهده نشد. در حالی که میزان لنفوسیت بین گروه‌ها اختلاف معنی داری داشت (P<۰/۰۵). هم چنین اندیکس طحالی بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱).

منابع

۱- فاضلی، ع.، قاسمیان صفایی، ح.، میرنژاد، ر.، ۱۳۸۳، بررسی کاهش کلونیزاسیون اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک توسط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی) در موش آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره ششم، شماره ۱، ص ص: ۳۳-۲۶.

۲-رضوی لر، ودود.، میکروب های بیماری زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی، چاپ اول، تهران: مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، سال ۱۳۷۸، صفحات ۶۰ تا ۷۳.

3- Lourens-Hattingh, A., Bennie, C., Viljoen, 2001, Yogurt as Probiotic carrier food, International Dairy Journal, 11(1-2): 1-17.

4- Ostad, S. N., Salarian, A. A., Ghahramani, M. H., Fazeli, M. R., Samadi, N., and Jamalifar, H., 2009, Live and heat-inactivated *Lactobacilli* from feces inhibit *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* adherence to caco-2 cells, Folia Microbiologica, 54: 157-160.

5- Elliott, C., Brzezinski, J., Sheth S., and Salvatoriello, R., 1998, Story-morhping in the affective reasoning paradigm: generating stories automatically for use with 'emotionally intelligent' multimedia agents, Proceedings of the Second International Conference on Autonomous Agents, Minneapolis, MN, ACM Press, pp:188-191.

6- Silva, A. M., Barbosa, F. H. F., Duarte, R., Vieira, L. Q., Arantes, R. M. E., Nicoli, J. R., 2004, Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental Salmonellosis in mice, Journal of Applied Microbiology, 97:29-37.

7- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., Takeda, Y., 2004, Probiotic *Bifidobacteria* Protect Mice from Lethal Infection with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7, Infection and Immunity, 72(4): 2240-2247.

8- Shu, Q., Gill, H. S., 2001, A dietary probiotic (Bifidobacterium lactis HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, Medical Microbiology and Immunology, 189: 147-152.

9- Brooks, G.F., Butel, J.S., and Orneston, L.N., 2004, JAWETZ, MELNICK ADELBERG'S MEDICAL MICROBIOLOGY 20th Ed. Hall International, Inc. London., pp: 212-223.

10-Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 2000, Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis, in: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in domestic animals, CABI Publishing,Wallingford, UK, PP: 57-72.

11-Alejandra de M., de L., Natalia A. C., and Gabriela P., 2010, Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection,

International Journal of Food Microbiology, 138(3): 223-231.

12- Gagnon, M., Kheadr, E.E., Dabour, N., Richard, D., Fliss, I., 2006, Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7* infection in BALB/c mice, International Journal of Food Microbiology, 111(1): 26-33.

13- Marteau, P., Seksik, P., Jian, R., 2002 , Probiotics and instetinal health effects: a clinical perspective, British Journal of Nutrition (suppl.1): 51-57.

14-Daofeng, Qu., Suhua W., Weiming, C., and Aifang, Du., 2008, Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice, Vaccine, 26(35): 4541-4548

15- JOHN U. QUE., DAVID J. H., 1985, Effect of Streptomycin Administration on Colonization Resistance to *Salmonella typhimurium* in Mice, American Society for Microbiology, 48(1): 169-174.

16- Donato, de C., Filipe, D.T., Gioia, C., Norbert, M., Dorothee, S., Edward, B. B and Domenico O., 2010, Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens, Veterinary Microbiology.

17- Yuming, S., Xiaoyan, C., Haiyan, X., Zhongmin, G., and Dafang, Z., 2006, Stability of glufosfamide in phosphate buffers and in biological samples Journal of Chromatography B, 832 (2): 224-230.

18- Gill, H.S., Shu, Q., Lin, H., Rutherfurd, K.J., Cross, M.L , 2000, Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001, Medical Microbiology and Immunology, 190(3): 97-104.

19- De Keersmaecker, S. C. J., Verhoevenr, T. L. A., Desair, J., Marchai, K., Vanderleyden, J., Nagy, I., 2006, Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid, FEMS microbiology letters, 259: 89-96.

20- 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: 167-173.

21- Lee, Y.K., Puong, K. Y., Ouwehand, A., Salminen, S., 2003, Displacement of bacterial pathogens from mucus on Caco-2 cell surface by lactobacilli, J. Med. Microbiol. 52: 925-930.

22- Pereira, D.L, Gibson, G.R., (2002), Effect of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans, Crit Rev Biochem Mol Bio, 37: 259-281.

23- Marteau, P., Seksik, P., Jian, R., 2002, Probiotics and instetinal health effects: a clinical perspective, British Journal of Nutrition, (suppl.1), 88: 51-57.

24- Lim, H. J., Kim, S. Y., Lee W. K., 2004, Isolation at cholostrol lowering *lactic acid bacteria* from human intestinc for probiotic use, J. Vet. Sci, 5: 391-395.

25- Donohue, D.C., Deighton, M., Ahokas, J.T., and Salminen, S., 1993, Toxicity of *lactic acid bacreria,* In: Salminen, S. and von Wright, A., Editors, *Lactic Acid Bacreria*, Marcel Dekker Inc, New York, PP: 369-383.

26- De Roos, N. K., Katan, M. B., 2000, Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998, Am J Clin Nutr, 71(2): 405-411.

.