الترقيم الدولي 8690 - 1991 ISSN 1991- 8690

الفعالية ضد جرثومية للنواتج الأيضية للعصيات اللبنية على المكورات العنقودية الذهبية خارج الجسم الحي

عبد الأله عبد الحسين المياح تماضر حامد وادي أيمان علي سعيد هدى شاكر فرحان

فرع الأدوية والعلوم السريرية المختبرية - كلية الصيدلة - جامعة البصرة

الخلاصة:

درست الفعالية ضد الجرثومية للنواتج الأيضية الثانوية المنتجة من العصيات اللبنية *Lactobacilli spp.* ضد عزلة مرضية لجرثومة المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وكان لها تأثيراً مثبطاً على نموها. كما درس تأثير الحموضة الناتجة عن التخمر اللاهوائي لسكر اللاكتوز الى حامض اللاكتيك بواسطة العصيات اللبنية. أن تجمع حامض اللاكتيك في الوسط أدى الى خفض الأس الهيدروجيني للبن مما أدى الى منع نمو المكورات العنقودية الذهبية.

أختبرت قابلية المكورات العنقودية الذهبية ضد الأس الهيدروجيني الحامضي، القاعدي والمتعادل، ولم تظهر النتائج أي نمو جرثومي لها في الأس الهيدروجيني الحامضي بينما أظهرت نمواً كثيفاً في الأس الهيدروجيني القاعدي والمتعادل.

أن الدراسة الحالية تؤكد وجود تأثير تعاوني للنواتج الأيضية الثانوية للعصيات اللبنية والحموضة في اللبن أدت الى فعل تثبيطي على نمو المكورات العنقودية الذهبية.

Key words: *Lactobacillus*, probiotics, secondary metabolites.

Antimicrobial activity of lactobacilli metabolites on *Staphylococcus aureus in vitro*

Abdulelah A. Al-Mayah Tamadir H. Wadi Eiman A. Saeed Huda Sh. Farhan

Department of Pharmacology and Clinical Lab. Sciences - College of Pharmacy - University of Basra

Abstract:

Antimicrobial activity of secondary metabolites that produced by *Lactobacillus spp.* has been investigated against clinical isolate of *Staphylococcus aureus*.

Acidity effect of anaerobic fermentation of lactose in raw milk to lactic acid by *Lactobacillus spp.* was studied. The accumulation of acid in the medium lead to lowering pH of the yoghurt that prevent growth of *Staph. aureus*. The ability of clinical isolate was experimented for survival in acidic, alkaline, and neutral

pH, the results showed that *Staph. aureus* have no growth in acidic pH while they have heavy growth in neutral and alkaline pH.

This study confirmed the presence of synergistic effect between the secondary metabolites of lactobacilli and the acidity in yoghurt, which lead to inhibitory effect on the growth of *Staph. aureus*.

المقدمة:

ظهرت جراثيم حامض اللبنيك Bacteria Lactic Acid قبل ثلاثة الآف سنة وظهورها الفعلي كان مع ظهور اللبائن المنتجة للحليب قبل خمسة وستين مليون سنة [1]. أن جرثومة حامض اللبنيك تؤدي الى التحميض السريع للمواد الأولية من خلال أنتاجها للحوامض العضوية وخاصة حامض اللبنيك الذي لعب دورآ لا غنى عنه في أنتاج كل منتجات الألبان وكذلك العديد من الأغذية والمشروبات الأخرى [2]. هناك العديد من الأجناس التي تعود الى جرثومة حامض اللبنيك وأهمها جنس *Lactobacillus* والذي يضم واحدة من أهم أنواع الجراثيم الصديقة التي توجد في القناة الهضمية، وقد أكتسبت تسميتها (لاكتو) من قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز الى حامض اللبنيك [3]. تكون الأنواع المختلفة التابعة لجنس *Lactobacillus* متحملة للهواء القليل aero- tolerant anaerobes، غير ممرضة وغير منتجة للمواد السامة أو السموم، وهي تقاوم الحوامض الضعيفة وتعيش في مدى من الأس الهيدروجيني يتراوح بين 3.5 – 6.5 وهي منتجة لحامض اللبنيك بنسبة 90 %، وقد أستخدمت بشكل كبير في التحكم بعمليات التخمير للعديد من الأطعمة ومنتجات الألبان المختلفة كالحليب واللبن والجبن [4]. وعادة ما يشار الى هذه الجرثومة بمصطلح البادئات الحياتية الغذائية Probiotic والذي يجعلها من الأحياء الدقيقة الساندة والتي تمتلك العديد من الصفات المهمة والمفيدة لصحة الأنسان [5، 6] ومنها تثبيط الجراثيم المرضية كالأشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية ومطثيات الموات الغازي والمبيضات ومسببات الأسهال الجرثومية والفايروسية وذلك بأنتاجها لمضادات حياتية طبيعية ضد الجراثيم والفطريات، أذ أنها تمنع تكاثر الأنواع الجرثومية الأخرى مما يساعد في السيطرة على أصابة الأمعاء بهذه الممرضات، كما أن الأس الهيدروجيني المنخفض المتسبب عن وجود حامض اللبنيك يعمل على منع نمو الممرضات والتي غالبآ لاتعيش في ظروف حامضية. كما أنها تزود الجسم بمجموعة طبيعية مفيدة Normal Microbial Flora وفعالة لمقاومة الجراثيم المرضية الغازية وتحفز الجهاز المناعي على أنتاج الخلايا الدفاعية [7].

الهدف من الدراسة: الدراسة الحالية هي محاولة للتحري عن العصيات اللبنية الموجودة في بعض الالبان التجارية والتي قد تعمل كبادئات غذائية وعن نواتجها الأيضية الثانوية المضادة للمكورات العنقودية الذهبية.

المواد وطرائق العمل

عينات اللبن:- أستخدمت في الدراسة الحالية عشرة انواع من الألبان التجارية المستوردة (الصافي; سعودي المنشأ، كالا; أيراني، ماك; أيراني، أكتيفيا; سعودي، مانيزان; أيراني، ماست; أيراني، أفيسا; أيراني، بكاه فارس; أيراني، الوفره; كويتي، أيناس; تركي) ونوعين من الألبان منزلية الصنع.

العزلات الجرثومية:-

المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*: وهي عزلة سريرية أخذت من قيح جلدي تم الحصول عليها من مختبر الأبحاث في فرع الأدوية /كلية الصيدلة/جامعة البصرة.

الأوساط الزرعية:-

حضرت جميع الأوساط الزرعية حسب تعليمات الشركات المصنعة، وهذه الأوساط هي:-

Nutrient Agar- (HIMEDIA), Mannitol Salt Agar- (HIMEDIA), Sabouraud Dextrose Agar- (Accumix), *Lactobacillus* MRS Agar and MRS broth (HIMEDIA)

الكشف الأولي عن وجود العصيات اللبنية:-

لقح 0.01 مل من الالبان قيد الدراسة على مكررين من وسط اكار العصيات اللبنية و وسط الأكار المغذي [8] . حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة24 – 48 ساعة. حضنت الأطباق بوسط اكار العصيات اللبنية في ظروف لاهوائية. واعتبرت هذه الخطوة للكشف الأولي عن وجود العصيات اللبنية في انواع اللبن المستخدمة، وسجلت النتائج بعد 48 ساعة. لقح 10 مل من الالبان المستخدمة ب 0.01 مل من العالق الجرثومي للمكورات العنقودية الذهبية و بتركيز 10^6 خلية / مل [9] ، وحضنت في درجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. في خطوة لاحقة لقح 0.01 مل من الالبان المستخدمة والملقحة بالمكورات العنقودية الذهبية على أوساط اكار العصيات اللبنية واكار- الملح مانيتول و وسط الأكار المغذي بطريقة التخطيط. زرعت أطباق السيطرة ب 0.01 مل من العالق الجرثومي المكورات العنقودية الذهبية فقط على وسط الأكار المغذي. حضنت الأطباق في 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. أستخدمت طريقة التصبيغ بصبغة كرام والاختبارات الكيمياحياتية للتشخيص المختبري للعصيات اللبنية [10] ، كما أستخدم وسط أكار الأبواغ الكيسية لأنتاج الأبواغ الكيسية (Ascospores) المشخصة للخميرة الكيسية ساكارومايسيز [11].

قياس تأثير الأس الهيدروجيني على نمو المكورات العنقودية الذهبية في الالبان:-

عدل الأس الهيدروجيني والذي كان حامضياً (5) في كل أنواع اللبن المستخدمة الى المتعادل (7) قبل تلقيحه بالعالق الجرثومي للمكورات العنقودية الذهبية بأضافة هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز 10% الى كل 10 مل من اللبن، تم أعادة زرع عينات اللبن كما في الخطوات السابقة وسجلت النتائج.

قياس تأثير الأس الهيدروجيني على نمو المكورات العنقودية الذهبية في المحلول المائي:-

عدل الأس الهيدروجيني الى الحامضي(5) ، المتعادل (7) والقاعدي (8) لثلاث عينات متساوية من الماء المقطر المعقم (10 مل) وبواقع مكررين. لقحت عينات الماء الثلاثة ب 0.01 مل من العالق الجرثومي للمكورات العنقودية الذهبية، حضنت العينات في 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

زرع 0.01 مل من المحاليل الحاوية على المكورات العنقودية الذهبية على وسطي الأكار المغذي وأكار-الملح مانيتول وحضنت الأطباق في 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

أنتاج العصيات اللبنية للنواتج الأيضية الثانوية:-

1- لقحت عينات متساوية (10 مل لكل عينة) من وسط مرق العصيات اللبنية بجرثومة العصيات اللبنية النقية وحضنت في 37 درجة مئوية في حمام مائي هزاز لمدة 7 أيام في ظروف لاهوائية [12].

2- عدل الاس الهيدروجيني بعد انتهاء مدة التحضين لثلاث عينات (مع وجود المكررات) من المرق الى الحامضي (5)، المتعادل (7) والقاعدي (8) ثم لقحت ب 0.01 مل من العالق الجرثومي للمكورات العنقودية الذهبية بتركيز (10^6 خلية/ مل)، حضنت جميع العينات في 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

3- زرع 0.01 مل من المرق الملقح بالمكورات العنقودية الذهبية بطريقة التخطيط على وسط الأكار المغذي. قرأت النتائج بعد الحضن في 37 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة. أعتمدت عينات من وسط مرق العصيات اللبنية المعدل الأس الهيدروجيني الى حامضي ومتعادل وقاعدي وغير الملقح بالعصيات اللبنية كمجموعة سيطرة بعد تلقيحها بالمكورات العنقودية الذهبية فقط.

النتائج والمناقشة:

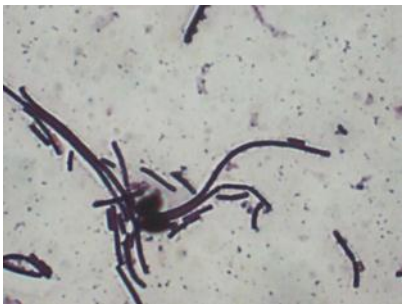
أظهرت نتائج الزرع الأولي للألبان التجارية المستوردة ومنزلية الصنع وجود العصيات اللبنية في بعض الأنواع المستوردة مثل (كالا، أفيسا وأيناس) وكذلك في اللبن منزلي الصنع ، مع ملاحظة وجود خميرة الساكارومايسيز في النوعين (أيناس و اللبن منزلي الصنع) الى جانب العصيات اللبنية. أظهر النوع (أكتيفيا) عصيات موجبة لصبغة كرام ، في حين أحتوت الأنواع (الصافي ، ماك و مانيزان) على خميرة الساكارومايسيز

فقط، بينما خلت الأنواع الأخرى من الألبان قيد الدراسة من أي محتوى جرثومي [13] وكما موضح في الجدول رقم (1)

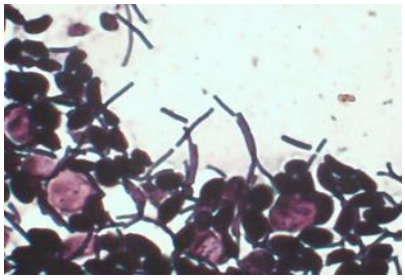
تم خلال الدراسة الحالية عزل وتشخيص بكتريا العصيات اللبنية وخميرة الساكارومايسيز من بعض أنواع الألبان جدول (1) وكما موضح في الصور (1، 2، 3).

جدول رقم (1): نتائج الكشف الأولي عن المحتوىالجرثومي في الألبان قيد الدراسة

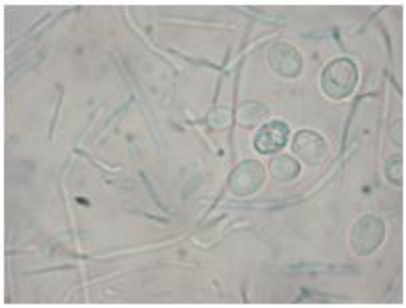
	نوع اللبن	المحتوى الجرثومي
.1	كالا	العصيات اللبنية
.2	أفيسا	العصيات اللبنية
.3	أيناس	العصيات اللبنية وخميرة الساكارومايسيز
.4	أ. لبن منزلي الصنع ب. لبن منزلي الصنع	العصيات اللبنية وخميرة الساكارومايسيز
.5	أكتيفيا	عصيات موجبة لصبغة كرام
.6	الصافي	خميرة الساكارومايسيز
.7	ماك	خميرة الساكارومايسيز
.8	مانيزان	خميرة الساكارومايسيز
.9	ماست	لايوجد نمو
.10	بكاه فارس	لايوجد نمو
.11	الوفره	لايوجد نمو



صورة (1) : العصيات اللبنية *Lactobacilli*



صورة (2) : خمائر *Saccharomyces* مع العصيات اللبنية



صورة (3) : الخلايا المتبرعمة لـ Saccharomyces

تأثير الأس الهايدروجيني الحامضي على نمو المكورات العنقودية الذهبية:-

أظهر الأس الهايدروجيني الحامضي للألبان الحاوية على العصيات اللبنية وخميرة الساكارومايسيز فعلاً تثبيطياً على نمو المكورات العنقودية الذهبية أذ لم تنمو هذه الجرثومة في الأنواع (كالا، أفيسا، وأيناس واللبن منزلي الصنع) وهذا يعود الى حموضة الألبان الناتجة من تخمير العصيات اللبنية لسكر اللاكتوز الموجود في الحليب الى مجموعة من الحوامض العضوية والتي من اهمها حامض اللاكتيك مما يؤدي الى خفض الأس الهيدروجيني وبالتالي رفع حامضية الوسط مما يوفر بيئة غير ملائمة لنمو جرثومة المكورات العنقودية الذهبية والتي تفضل النمو في محتوى من الأس الهايدروجيني يتراوح بين المتعادل الى القاعدي غالباً، ومما تجدر الأشارة اليه انه تم قياس الأس الهايدروجيني للألبان قيد الدراسة فوجد انه حامضي ومساوي الى 5 وبذلك انعدمت أهم شروط النمو الأساسية لهذه الجرثومة [14]. كما لوحظ كذلك عدم نمو المكورات العنقودية الذهبية في الأنواع (الصافي ، ماك و مانيزان) والتي اظهرت نتائج الزرع الأولي لها احتوائها على خميرة الساكارومايسيز والتي تعد من البادئات الحياتية التي تقوم بفعل مشابه لفعل العصيات اللبنية اذ انها تخفض الأس الهيدروجيني للوسط مما يثبط نمو المكورات العنقودية الذهبية.

كذلك ابدى النوع (أكتيفيا) الذي اظهر الزرع الأولي له عدم احتوائه على العصيات اللبنية ، تأثيراً مثبطاً على نمو المكورات

العنقودية الذهبية وقد يعزى هذا الى احتوائه على البادئات الحياتية بايفيديوباكتيريم. جدول (2).

تأثير الأس الهايدروجيني المتعادل على نمو المكورات العنقودية الذهبية:-

في حين اظهرت المكورات العنقودية الذهبية نموآ جيداً لها على وسطي الأكار المغذي وأكار-الملح مانيتول عند تعديل الأس الهايدروجيني للألبان قيد الدراسة الى المتعادل (7) والذي يوفر بيئة نمو مناسبة لهذه الجرثومة، مما يدعم النتائج آنفة الذكر. جدول (3). وقد استبعدت الأنواع (ماست ، بكاه فارس والوفره) لأن نتائج الزرع الأولي لم تظهر لها اي محتوى جرثومي.

جدول رقم (2): تأثير الأس الهايدروجيني الحامضي على نمو المكورات العنقودية الذهبية

نوع اللبن	الأس الهيدروجيني الحامضي	المحتوى الجرثومي من المكورات العنقودية		
		أكار العصيات اللبنية	أكار – الملح مانيتول	الأكار المغذي
1	5	العصيات اللبنية	-	-
2	5	العصيات اللبنية	-	-
3	5	العصيات اللبنية والساكارومايسيز	-	-
4	5	العصيات اللبنية والساكارومايسيز	-	-
5	5	عصيات موجبة لصبغة كرام	-	-
6	5	خميرة الساكارومايسيز	-	-
7	5	خميرة الساكارومايسيز	-	-
8	5	خميرة الساكارومايسيز	-	-

لايوجد نمو = (-)

جدول رقم (3): تأثير الأس الهايدروجيني المتعادل على نمو المكورات العنقودية الذهبية

نوع اللبن	الاس الهيدروجيني المتعادل	المحتوى الجرثومي من المكورات العنقودية	
		أكار – الملح مانيتول	الأكار المغذي
1	7	+	+
2	7	+	+
3	7	+	+
4	7	+	+
5	7	+	+
6	7	+	+
7	7	+	+
8	7	+	+

يوجد نمو= (+)

تأثير الأس الهيدروجيني على نمو المكورات العنقودية الذهبية في الماء المقطر:-

جاءت نتائج الزرع الجرثومي للماء المقطر المعدل الأس الهايدروجيني الى حامضي ومتعادل وقاعدي لتدعم النتيجة السابقة ، اذ لم تنمو المكورات العنقودية الذهبية في الماء المقطر الحامضي في حين اظهرت نموآ جيدآ في الوسطين المتعادل والقاعدي.

التأثير المثبط للنواتج الأيضية الثانوية :-

أثبتت نتائج أختبار النواتج الأيضية للعصيات اللبنية وجود تأثير تثبيطي واضح لهذه النواتج على نمو المكورات العنقودية الذهبية، أذ أنه بعد تعديل الأس الهايدروجيني لوسط مرق العصيات اللبنية وبوجود النواتج الأيضية الى حامضي ومتعادل وقاعدي لوحظ عدم نمو الجرثومة في أي منها مقارنة بعينة السيطرة التي لاتحتوي على النواتج الأيضية للعصيات اللبنية، أذ اظهرت جرثومة المكورات نموآ كثيفآ في الوسط المعدل الأس الهايدروجيني الى المتعادل والقاعدي، في حين لم يظهر أي نمو لها في الوسط الزرعي المعدل الأس الهايدروجيني الى الحامضي الذي عمل على تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية بسبب حموضة الوسط جدول (4).

جدول رقم (4): تأثير النواتج الأيضية الثانوية للعصيات اللبنية على نمو المكورات العنقودية الذهبية

جرثومة المكورات العنقودية الذهبية	بوجود النواتج الأيضية للعصيات اللبنية			عدم وجود النواتج الأيضية للعصيات اللبنية		
	حامضي (5)	متعادل (7)	قاعدي (8)	حامضي (5)	متعادل (7)	قاعدي (8)
	لايوجد نمو	لايوجد نمو	لايوجد نمو	لايوجد نمو	نمو متوسط	نمو كثيف

أن هذه النتائج تتفق مع دراسة كل من [15, 16, 17] والتي ثبطت فيها النواتج الأيضية للعصيات اللبنية نمو كل من المكورات العنقودية الذهبية والاشريكية القولونية .

كذلك في دراسة [18] التي أظهرت النواتج الأيضية الثانوية للعصيات اللبنية فيها فعالية ضد جرثومية عالية ضد المكورات العنقودية الذهبية والأشريكية القولونية والخمائر، وأثبت في الدراسة أن البادئات الحياتية والعصيات اللبنية منها خاصة تظهر فعلآ تثبيطيآ كابحآ للممرضات.

أما دراسة [19] فقد أشارت الى الفعالية ضد الجرثومية للبادئات الحياتية المعزولة من منتجات الحليب المختلفة ضد المكورات العنقودية الذهبية والاشريكية القولونية والزوائف الزنجارية والمبيضات والتي تعود الى أنتاج هذه البادئات لحوامض الخليك واللبنيك التي تخفض من الأس الهايدروجيني للوسط، أضافة لأنتاجها للبكتريوسينات التي تعد عوامل ضد حياتية. أن الدراسة الحالية تستنتج أن الألبان الحاوية على العصيات اللبنية تكون ذات قيمة صحية عالية اذا ما قورنت بالألبان التي يضاف لها مواد حافظة لغرض تثبيط الأحياء المجهرية بهدف أبقاء هذه المنتوجات فترة اطول بدون تلف عند التخزين. لذلك توصي الدراسة بأستحداث وحدات صحية متخصصة يقع على عاتقها التثقيف الصحي بالمنتوجات الغذائية المحلية والمستوردة وتبيان ما هو مفيد وما هو اكثر فائدة.

المصادر:

1. Champomier-Verges, M. C., Maguin, E., Mistu, M. A., Anglae, P. and Chich, J. F. (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: Current knowledge and perspectives. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 771: 329-342.

2. Lee, B. H. (1996). Bacteria based processes and products. In: Fundamentals of food biotechnology, Lee, B. H. (Ed). John Wiley and Sons, New York, pp. 219-290.

3. Harris, L. J. (1998). The microbiology of vegetable fermentations. In: Microbiology of Fermented Foods, Wood, B. J. B. (Ed). Blackie Academic and Professional, London, pp. 45-72.

4. Guessas, B. and Kihal, M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats milk. Afr. J. Biotechnol., 3: 339-342.

5. Roos, N. M. and 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: 405-411.

6. Espirito Santo, M. L. P., Beirao, L. H., Sant Anna, E. S., Dalcin, E. B., Franco, B. G. M. (2003). Bacteriocinogenic effect of *Lactobacillus sakei* 2A on microbiological quality of fermented *Sardinella brasiliensis*. Braz. Arch. Boil. Technol., 46: 553-561.

7. Kailasapathy K, Chin J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *lactobacillus acidophilus* and *bifidobacterium spp.* Immunol Cell Biol;78:80-8.

8. Vuyst, L. D.; Callewaert, R. and Crabbe, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorous* and evidence for stimulation of bacteriocin production under un favourable growth conditions. Microbiol., 142:817-827.

9. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simon, A. (1996). Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingstone. New York. pp. 978

10. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S.T. (1994): Bergey's manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Williams and Williams. Baltimore. pp. 566.

11. Koneman, E. W.; Robert, G. D. and Wright, S. E. (1978). Practical Laboratory Mycology. 2nd ed. The Willims and Wilkins Co. Baltimore, U. S. A. pp. 153.

12. Schillinger, V. and Luke, S. K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. Applied Environmental Microbiology,55:1901-1906.

13. Forouhandeh, H.; Zununi, S.; Hejazi, M. S.; Nahaei, M. R. and Akbari Dibavar, M. (2010). Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus* species from various dairy products. Current research in Bacteriology 3(2):84-88.

14. Barefoot, S.F.; Klaenhammer, T. R.(1983). Detection and activity of Lactacin B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 45:1808–15.

15. Ibrahim , S. M. and Salha, G. D. (2009). Effect of Antimicrobial Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria (Lab) on Quality Aspects of Frozen Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets. World J. Fish and Marine Sci. 1 (1): 40-45.

16. Lengkey, H. A. and Adriani, L. (2009). Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*., on lactic acid and acetic acid content and on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

17. Ashraf, M. ; Arshad, M. ; Siddique, M. and Muhammad,, G. (2009). *In vitro* screening of locally isolated *Lactobacillus* species for probiotic properties. Pakistan Vet. J., 29(4): 186-190.

18. Behrad, S.; Yusof, M. Y.; Goh, K. L.; Baba, A. S. (2009). Manipulation of probiotics fermentation of yoghurt by Cinnamon and Licorice: effect on yoghurt formation and inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro.World Academy of Science Engineering and Technology.

19. Eduardo, L.; Chuayana, Jr.; Carmina, V. P.; Ma. Rosanna, B. R. and Esperanza, C. C. (2003). Antimicrobial activity of probiotics from milk products. Phil J. Microbiol. Infect. Dis. , 32(2):71-74.