

## اثر ضد میکروبی پروبیوتیک های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان اصفهان علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش

حسین فاضلی<sup>۱</sup>، آزاده صامتی<sup>۲</sup>

۱. دکترای تخصصی (Ph.D) میکروبیولوژی، استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲. دکترای حرفه ای پزشکی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

\* نشانی برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۴۳۹،  
h\_fazeli@med.mui.ac.ir  
دریافت مقاله: بهمن هشتاد و شش پذیرش برای چاپ: اردیبهشت هشتاد و هفت

### چکیده

**سابقه و هدف:** امروزه یکی از راه کارهای پیشنهادی جهت پیشگیری و درمان عفونت های دستگاه گوارش استفاده از پروبیوتیک ها می باشد. از عوامل مهم در اثر بخشی پروبیوتیک ها، منشأ جداسازی (غذایی یا انسانی) و منطقه جغرافیایی جداسازی پروبیوتیک ها است. پروبیوتیک های موجود در کشور ما اغلب تجاری هستند. لذا این مطالعه با هدف تعیین تاثیر پروبیوتیک های جدا شده از فلور روده کودکان شهر اصفهان علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش به منظور معرفی پروبیوتیک های با منشأ داخلی انجام گردید.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی اثر ضد میکروبی پروبیوتیک های لاکتیک رامنوسوس (L519)، اسیدوفیلوس (SH5)، پلاتاروم (A7) جدا شده از فلور روده کودکان علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش (شیگلا دیسانتری PTCC1188)، سالمونلا تیفی موربوم (PTCC 1622) و اشرشیاکلی انتروپاتوژن (PTCC 1270) با روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک تعیین گردید. به منظور کاهش خطاهای آمون ۳ بار تکرار شد و میانگین قطر هاله عدم رشد سه پروبیوتیک با نرم افزار آماری SPSS (version 13) مقایسه گردید.

**یافته ها:** متوسط قطر هاله عدم رشد برای سه پروبیوتیک (1/5mm - 1/4mm) بود. بیشترین اثر مهارتی مربوط به لاکتوباسیلوس پلاتاروم علیه سالمونلا تیفی موربوم 0/057 +/- 16/33 میلی متر (14/89 تا 17/76 میلی متر با حدود اطمینان 95٪) و کمترین اثر مهارتی مربوط به لاکتوباسیلوس رامنوسوس علیه اشرشیاکلی انتروپاتوژن بود 0/057 +/- 11/33 میلی متر (9/89 تا 12/76 میلی متر با حدود اطمینان 95٪).

**نتیجه گیری:** هر ۳ پروبیوتیک لاکتیک دارای اثر مهارتی چشمگیری علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش بودند. و مقایسه آن با مطالعات بر روی پروبیوتیک های با منشأ غذایی و تجاری نشان دهنده تاثیر بیشتر آنهاست. از این رو پیشنهاد می گردد در انتخاب و کاربرد پروبیوتیک ها به منشأ جداسازی و منطقه جغرافیایی منطبق با آن توجه گردد.

**واژگان کلیدی:** لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک، پاتوژن های روده ای

### مقدمه

WHO پروبیوتیک ها عبارتند از میکروارگانیسم های زنده که وقتی در مقادیر متعادل مورد استفاده قرار بگیرند در سلامتی میزبان مفید خواهند بود. شرایط انتخاب پروبیوتیک طبق توصیه FAO/WHO این است که پروبیوتیک ها باید قادر به اعمال اثرات مفید خود بر روی میزبان به واسطه رشد و فعالیت در بدن انسان باشند (۴). ایده پروبیوتیک ها به دهه اول قرن بیستم برمی گردد. وقتی که باکتریولوژیست اوکراینی Elie Metchnikof برنده جایزه نوبل (۱۹۰۸) طی مطالعه فلور روده انسان این فرضیه را ارائه کرد که طول عمر و سلامتی مردم بلغار نتیجه مصرف فراورده های لبنی می باشد. وی مدتها بعد ثابت کرد که ماست حاوی ارگانیسم های ضروری جهت محافظت روده از اثرات مخرب سایر باکتری های خطرناک می باشد (۷-۵).

بیماری های حاد دستگاه گوارش در سراسر جهان، دومین رتبه را (تنها) پس از بیماری های حاد دستگاه تنفس فوقانی ( به خود اختصاص داده اند. از جمله شایع ترین عوامل باکتریال در عفونت های گوارشی شیگلادیسانتزی، سالمونلا تیفی موربوم، اشرشیاکلی (انترههموراژیک، انترو پاتوژنیک و ...)، یرسینیا انتروکولیتیکا و کامپیلوباکتر ژونی است (۳-۱).

امروزه بدلیل دسترسی آسان، قیمت نسبتاً ارزان و بروز بیماری های مختلف مصرف آنتی بیوتیک ها چنان فراوان و وسیع انجام می گیرد که منجر به شکل گیری جمعیت های باکتریایی مقاوم و متعاقب آن مشکلات درمانی حتی در مواردی که بیماری بنظر ساده می آید و همینطور بروز عوارض جانبی بر میزبان و ضرر و زیان اقتصادی شده است. طبق تعریف

استریل آماده گردید. مکان چاهکها در پشت پلیت مشخص گردید تا فاصله بین آنها یکسان باشد. سپس در هر پلیت از پاتوژن مورد نظر کشت صورت گرفت و بعد به کمک پیپت پاستور استریل که برای هر پلیت جداگانه استفاده می شد چاهکهایی به قطر ۶ میلی متر ایجاد کرده و سپس ته چاهکها را برای جلوگیری از انتشار محلولی که بعدا در آن می ریزیم ، با محلول مولتن آگار مذاب کاملا مسدود کرده و سپس از محلول رویی پروبیوتیکهای فیلتر شده (سوپرناتانت) مورد مطالعه به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک ریخته شد بطوری که سطح محلول با سطح محیط کشت در یک خط قرار بگیرد. پلیتها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. قطر هاله عدم رشد از پشت پلیت به وسیله خط کش و بر حسب میلی متر خوانده و گزارش شد. برای افزایش دقت و حساسیت ، هر آزمون حداقل ۳ بار تکرار گردید و از میانگین ۳ آزمون برای ارزیابی نتایج استفاده گردید. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (Version 13) و آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

### یافته ها

پس از ۳ بار آزمون و گزارش نتایج ، دادهها توسط نرم افزار آماری SPSS (Version 13) ، (آزمون ANOVA) آنالیز شد. همه پروبیوتیکها اثر مهاری بر رشد پاتوژن شیگلا دیسانتری داشت و میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در مواجهه با هر پروبیوتیک برابر ۱/۴۵ +/- ۱۳/۸۸ میلی متر (۱۲/۷۷ تا ۱۵ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) بود. مقایسه بین دادهها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانناروم بیشترین اثر مهاری را بر رشد این پاتوژن اعمال کرده و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای کمترین اثر مهاری بوده است (جدول ۱). مقایسه ای که بین میانگینهای حاصل از قطر هاله عدم رشد این پاتوژن در مواجهه با سه پروبیوتیک مورد نظر به عمل آمد نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف بین میانگینها بود ( $P < 0.002$ ).

هم چنین همه پروبیوتیکها اثر مهاری بر رشد پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم داشته اند و میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در مواجهه با هر پروبیوتیک ۲/۱۷ +/- ۱۳/۶۶ میلی متر (۱۱/۹۹ تا ۱۵/۳۴ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) بود. مقایسه بین دادهها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانناروم بیشترین اثر مهاری را بر رشد این پاتوژن اعمال کرده و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای کمترین اثر مهاری بوده است (جدول ۲). مقایسه ای که بین میانگینهای حاصل از قطر هاله عدم رشد این پاتوژن در مواجهه با سه پروبیوتیک مورد نظر به عمل آمد نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف بین میانگینها بود ( $P < 0.001$ ).

همه پروبیوتیکها اثر مهاری بر رشد پاتوژن اشرشیا کلی داشته اند و میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در مواجهه با هر پروبیوتیک برابر ۱/۱۱ +/- ۱۲/۶۶ میلی متر (۱۱/۸ تا ۱۳/۵۲ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) بود. مقایسه بین دادهها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانناروم بیشترین اثر مهاری را بر رشد این پاتوژن اعمال کرده و لاکتوباسیلوس رامنوسوس دارای کمترین اثر مهاری بوده است (جدول ۳).

داده های علمی اخیر از نقش مهم پروبیوتیکها به عنوان بخشی از یک رژیم غذایی سالم برای انسان جهت جلوگیری از عفونت های میکروبی به شدت حمایت می کنند (۸) و از جمله مهمترین کاربردهای پروبیوتیکها می توان به نقش آنها در پیشگیری و درمان اسهال عفونی حاد اشاره کرد.

اکثر پروبیوتیکهای موجود ، منشا تجاری داشته و تحقیقات بر روی آنها در کشور ما تنها محدود به مطالعات پایه بوده است . این گونه تحقیقات در جوامع دیگر به لحاظ ویژگی و اهمیتی که در موضوع حس می شود سالهاست که در حال پیگیری می باشد اما در کشور ما کاملا نوپا بوده و زمینه برای تحقیقات گسترده و منطبق بر شرایط بهداشتی ، جغرافیایی ، اپیدمیولوژیک ، اقتصادی ، اجتماعی و فرهنگی بر روی این مساله مهم مهیا می باشد. علیرغم تمام مطالعات انجام شده برای تاثیر بیشتر پروبیوتیکها بر روی عوامل مولد اسهال باید در هر منطقه مطالعاتی از این دست بصورت جداگانه و منطبق بر شرایط آن منطقه صورت پذیرد (۹). این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی پروبیوتیکهای لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان اصفهان علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش انجام شد.

### روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده که بر روی باکتری های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان شهر اصفهان ( طی مطالعه قبلی ) انجام گردید (۱۰).

۳ سویه شایع پاتوژن دستگاه گوارش شامل شیگلادیسانتی ( PTCC 1188 ) ، سالمونلا تیفی موریوم ( PTCC 1622 ) و اشرشیا کلی انتروپاتوژنیک ( EPEC ) ( PTCC 1270 ) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران بصورت لیوفیلیزه تهیه گردید و بر طبق دستورالعمل همراه آن بر روی محیط Nutriant Broth (NB) و Nutriant Agar احیاء گردید . سپس هر ۳ پاتوژن تحت بررسی با تست ها بیوشیمیایی استاندارد قرار گرفتند. تست SIM, TSI ، آزمون MR , VP و تست سیترات و تولید اندول در مورد هر ۳ سویه انجام گرفت تا مطمئن شویم که این باکتری ها سویه های مورد نظر ما می باشند.

۳ سویه لاکتوباسیلوس متعلق به گونه های رامنوسوس ( L519 ) ، اسیدوفیلوس ( SH5 ) و پلانناروم ( A7 ) که طی مطالعه قبلی در دانشگاه صنعتی اصفهان از فلور روده کودکان شهر اصفهان جداسازی شده بود برای بررسی اثر آنتاگونیستی انتخاب گردید و برای انجام مطالعه سوپر ناتانت ( عصاره ) این لاکتوباسیلوسها از دانشگاه فوق الذکر با حفظ دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال یافت .

تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد به روش رشد (Growth method) انجام شد و طی آن ۴-۳ کلنی مشابه و یکسان باکتری رشد یافته روی محیط جامد به ۵-۴ میلی لیتر محیط NB اضافه کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶-۲ ساعت قرار دادیم تا به کدورت حدود ۰/۵ مک فارلند برسند (۱۵-۱۱).

برای بررسی اثر ضد میکروبی از سوسپانسیون باکتری های پاتوژن با سواب سر پنبه استریل به محیط کشت مولر هینتون به طور یکنواخت تلقیح گردید. پلیت های حاوی کشت مولر هینتون به ضخامت ۶ میلی متر و کاملا

پروبیوتیک، منشا جدا سازی آن و منطقه جغرافیایی که پروبیوتیک جدا سازی شده است، می تواند بر میزان اثر بخشی پروبیوتیک موثر باشد. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر پروبیوتیک های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان در شهر اصفهان بر روی پاتوژن های شایع دستگاه گوارش صورت گرفته است. نتایج حاصل از مطالعه فوق نشان داد که هر سه پروبیوتیک مورد مطالعه اثر مہاری بسیار چشمگیری بر رشد پاتوژن های مورد نظر داشته است که قابل مقایسه با مطالعات سایر همکاران می باشد.

فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس بوسیله Ogunbanw و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. آنها توانستند با کمک روش چاهک نشان دهند که این دو لاکتوباسیلوس از رشد اشرشیاکلی (۸-۷mm) و باسیلوس سرئوس (۸-۱۰mm) و یرسینیا انتروکولیتیکا (۶-۷mm) جلوگیری می کنند (۱۷). Conconnier و همکاران گزارش کردند که مصرف محلول روئی کشت لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس کازنی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس لاکتیس اثر باکتریسیدالی بر ضد طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی پاتوژن ایجاد می کند (۱۸).

در مطالعه فوق نیز آنچه در نتایج به صورت مشخص به چشم می خورد اثر مہاری قوی تر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی هر سه پاتوژن شیگلادیسانتی، سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیاکلی انتروپاتوژن میباشد.

در متاآنالیز حاصل از ۱۲ مطالعه بر روی پروبیوتیک ها برای جلوگیری از اسهال مسافران نشان داده شد که پاکتری های لاکتیک خطر بروز اسهال مسافران را بدون عوارض جدی بر میزان کاهش دادند (خطر نسبی برابر ۰/۸۵، ۰/۹۱ تا ۰/۹۷ با حدود اطمینان ۹۵٪) (۱۹). در مطالعه ما هر ۳ پروبیوتیک بر هر ۳ پاتوژن اثر مہاری خود را با ایجاد هاله عدم رشد نشان دادند. اگرچه اثر مہاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای اختلاف معنی داری با ۲ پروبیوتیک دیگر در مواجهه با هر پاتوژن و در مقایسه بین ۳ پاتوژن بود. نتایج شاخصی که در مطالعه ما به چشم می خورد حاکی از آن است که احتمالاً منشا تهیه پروبیوتیک ها در مہار رشد پاتوژن تاثیر بسزائی دارد. یعنی نتایج حاصل از پروبیوتیک های مطالعه ما که از فلور روده کودکان جدا شده اند نسبت به مطالعاتی که منشا پروبیوتیک های آنان از ماست و سایر فراورده های لبنی بوده، بهتر می باشد. دلایل دیگری که برای این اثر مہاری مناسب مطرح است تولید اسید لاکتیک بیشتر، بهتر عمل کردن باکتریوسین و انزیم های حاصل از پروبیوتیک های فلور نرمال روده می باشد که تایید این احتمالات مستلزم مطالعات بیشتر و دقیق تر در آینده است.

### تشکر و قدردانی

در این تحقیق حوزه معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ما را همراهی و پشتیبانی نمودند که بدینوسیله از آنها کمال تشکر و قدردانی را داریم.

جدول ۱: میانگین قطر هاله ای عدم رشد شیگلادیسانتی در مواجهه با

سه پروبیوتیک

پروبیوتیک ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		حداقل قطر ( میلی متر)	حداکثر قطر ( میلی متر)
				حد پایین	حد بالا		
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۲/۷	۰/۶	۱۱/۲	۱۴/۱	۱۲/۰	۱۳/۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۳	۱۳/۳	۰/۶	۱۱/۹	۱۴/۸	۱۳/۰	۱۴/۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۵/۷	۰/۶	۱۴/۲	۱۷/۱	۱۵/۰	۱۶/۰
میانگین مجموع	۹	۱۳/۹	۱/۵	۱۲/۸	۱۵/۰	۱۲/۰	۱۶/۰

Pvalue=۰/۰۰۲

جدول ۲: میانگین قطر هاله ای عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم در مواجهه با

سه پروبیوتیک

پروبیوتیک ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		حداقل قطر ( میلی متر)	حداکثر قطر ( میلی متر)
				حد پایین	حد بالا		
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۱/۷	۰/۶	۱۰/۲	۱۳/۱	۱۱/۰	۱۲/۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۳	۱۳/۰	۱/۰	۱۰/۵	۱۵/۵	۱۲/۰	۱۴/۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۶/۳	۰/۶	۱۴/۹	۱۷/۸	۱۶/۰	۱۷/۰
میانگین مجموع	۹	۱۳/۷	۲/۲	۱۲/۰	۱۵/۳	۱۱/۰	۱۷/۰

Pvalue=۰/۰۰۱

جدول ۳: میانگین قطر هاله ای عدم رشد اشرشیاکلی انتروپاتوژن در

مواجهه با سه پروبیوتیک

پروبیوتیک ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		حداقل قطر ( میلی متر)	حداکثر قطر ( میلی متر)
				حد پایین	حد بالا		
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۳/۰	۰/۰	۱۳/۰	۱۳/۰	۱۳/۰	۱۳/۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۳	۱۱/۳	۰/۶	۹/۹	۱۲/۸	۱۱/۰	۱۲/۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۳/۷	۰/۶	۱۲/۲	۱۵/۱	۱۳/۰	۱۴/۰
میانگین مجموع	۹	۱۲/۷	۱/۱	۱۱/۸	۱۳/۵	۱۱/۰	۱۴/۰

Pvalue=۰/۰۰۲

### بحث

مطالعات متعددی درباره تاثیر پروبیوتیک در سلامت دستگاه گوارش صورت گرفته است (۱۶) و بیانگر این امر می باشد که عواملی چون نوع

## REFERENCES

---

1. Talan D, Moran GJ, et al. Etiology of bloody diarrhea among patients presenting to united states emergency departments : prevalence of Escherchia Coli o 157 : H7 and other enteropathogens . Clin Infect Dis, 2001 ; 32: 573.
2. Preliminary Foodnet data on the incidence of food borne illness—selected sites united states , 2002 . MMWR More Mortal Wkly rep, 2003 ;P52 :340.
3. Ray SM, Ahuga SD,et al. Population, based, surveillance for yersinia entro colitica infections in foodnet – sites, 1996-1999 : higher risk of disease in infants and minority populations. Clin Infect Dis, 2004 ;38 suppl3 : 5181
4. Food and Agriculture Organization Expert Consultation. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba,Argentina : Food and Agriculture Organization of the united Nations and World Health Organization ; 2001. Available from : [ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf) (Accessed 27 Octobr 2006).
5. Silva M, Jacobus NV, et al. Antimicrobial substance from human lactobacillus strain. Antimicrob Agents Chemother ,1987 ;31: 1231-1233.
6. Lewis SJ ,Freedman AR. The use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease. Aliment Pharmacol Ther ,1998;12:807-822.
7. Isolauri E , et al. Probiotics: effects on immunity. Am J Clin Nutr 2001 ;73(Suppl. 2): S444-S450.
8. Parvez S, et al. Probiotics & their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 2006; 100: 1171-1185.
9. Huebner ES, Surawicz CM. Probiotics in the prevention and treatment of gastrointestinal infections. Gastroenterol Clin North Am, 2006;35(2):355-365.
10. Mirlohi M, Fazeli H, Soleimani S. Lactobacillus Isolation , Identification and species distribution in Iranian infant feces . The first congress of clinical Microbiology . Shiraz-Iran (unpublished) . 2007.10.23.
11. Baily and Scotts . Diagnostic microbiology . W.B.Sanders company , Philadelphia, 2000;P:613-618
12. Cohnie R. Mahon. Gorge Mannselis. Text book of diagnostic microbiology sec edit . W.B.Sanders company .2004;81-82,330-341.
13. Gerald.L.Mandell. John E. Benett. Raphael Dolin .Principle and practice of infectious disease. 5<sup>th</sup> edit. Vol.4. philaDELPHIA, Churchill livingtone; 2000;2068-2098.
14. National committee for clinical laboratory standards. Methods for dilution-antimicrobial susceptibility testing for bacteria that growth aerobically. 5<sup>th</sup> ed. Approved standard M7-A5 . national committee for clinical laboratory standards ;2000.
15. Topply willson. Microbiology and microbial infectiona, vol.2, Arnold, New York;2000.

16. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases : Antibiotics , Probiotics & prebiotics. *Gastroenterology* 2004 ;126 : 1620.
17. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude A A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* Fl and *Lactobacillus brevis* OGI. *African Journal of Biotechnology*. 2003;2(8): 219-227 .
18. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64 : 4537-4580.
19. McFarland LV. Meta-analysis of Probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis* 2007 ; 5:97.