Iraqi Journal of Science
ISSN: 0067-2904

دراسة تاثير بعض ظروف النمو على الفاعلية التثبيطية لبكتيريا *Lactobacillus delbrueckii* و *L.fermentum* لتقليل نمو *E.coli*

ندى صباح رزوقي*، افين رمضان محسن، بشائر ناصر حسون، وديان عبد اللطيف حسين
قسم علوم الحياة، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة لاختبار تاثير بعض ظروف النمو على الفاعلية التثبيطية لبكتيريا *Lactobacillus delbrueckii* و *L.fermentum* على نمو بكتيريا *E.coli* وقد دلت نتائج دراسة اختبار الفاعلية التثبيطية للعزلتان البكتيريتان , *Lactobacillus delbrueckii L.fermentum* ضد العزلة البكترية *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة عند التراكيز المختلفة (100,90,70,50) **%** بان عالق العزلتان البكتيريتان *Lactobacillus delbrueckii* و *L.fermentum* عند التركيز 100 % اعطى اعلى فاعلية تثبيطية ضد بكتريا *E.coli* حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 27 ملم ، بينما بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 17 ملم عند التركيز 50%كفاعلية تثبيطية لعالق العزلتان البكتيريتان ضد بكتريا *E.coli* عند استخدام طريقة الحفر، في حين ان راشح العزلتان البكتيريتان *Lactobacillus delbrueckii* و *L.fermentum* عند التركيز 100% اعطى منطقة تثبيط قطرها 23 ملم .عند دراسة ثباتية البكتريوسين تجاه التغاير في قيم الاس الهيدروجيني ، اظهرت النتائج ثباتية البكتريوسين المنتج عند قيم الاس الهايدروجيني الحامضي من خلال قطر منطقة التثبيط لبكتريا *E.coli* 22 ملم في حين انها بلغت 17 ملم عند قيم الاس الهايدروجيني القاعدي .في حين ان نتائج اختبار تاثير كل من الملحين NaCl و KCl عند التركيزين 1 و % 5 في فاعلية البكتريوسين بينت ان فاعليته التثبيطية ضد بكتيريا *E.coli* كانت اعلى عند التراكيز الملحية الواطئة 1% مقارنة بفعله عند التراكيز الملحية العالية 5 %من خلال نتائج اقطار مناطق التثبيط والتي كانت 16 و 18 ملم لكل من الملحين Nacl و Kcl عند التركيز % 1 على التوالي في حين انها انخفضت الى 14 و 15 ملم لكل من الملحين Nacl و Kclعند التركيز 5 % على التوالي . كما بينت النتائج ثباتية الفعل التثبيطي للبكتريوسين المنتج من قبل بكتريا Lactobacillus عند درجة الحرارة 37 م° في حين انه انعدم عند درجة الحرارة 25 م° .

A Study of the Effect of Some Growth Conditions on Inhibitory Activity of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus fermentum* to reduce Growth of *E.coli*

Nada Sabah Rezouqi*, Avven Ramadhan, Bashair Nasir, Widian Abd-alatif Hasin
Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract

Aimed this study to testing some of growth conditions on inhibitory activity of *Lactobacillus delbrueckii* bacteria and *L.fermentum* at various concentrations (50, 70, 90, 100) % on the growth of *E.coli* isolate used in this study. The results showed that the bacteria *L. delbrueckii* and *L.fermentum* at 100% concentrations gave highest inhibitory activity against *E.coli* with inhibition zone 27mm , while inhibition zone reached 17 mm at 50% concentration and when using a bacterial filtrate of *L. delbrueckii* and *L.fermentum* at 100% concentrations inhibition zone

*Email:Doctor-nada2003@yahoo.com

was with diameter 23mm , also stability of bactiriocin was examined against pH values, the results showed that highest stability in acidic PH compared to alkaline PH. The treatment of bacteriocins with salts suchas NaCl and KCl revealed low effect in inhibition zone with 1 & 5% concetrations. However the higher concentration of salt 5% caused high reduction and caused to loss of inhibitory activity of bacteriocins compared to1% with inhibition zone diameter were 16 and 18 mm for Nacl and Kcl at 1% while it decreased to 14 and 15 mm at % 5 . The results showed that stability of bacteriocins at temperature 37 ºC than 25 ºC.

Keywords: L.fermentum, L.delbrueckii, inhibitory activity, bactiriocin.

المـقـدمـــــة

تعد بكتيريا *E. coli* احد افراد عائلة Enterobacteriaceae وهي من البكتيريا العصوية المستقيمة والسالبة لصبغة غرام وغير مكونة للأبواغ وغير متحركة بأسواط ، هوائية أختيارية ومخمرة لسكر الكلوكوز واللاكتوز و السوربتول منتجة حامض وغاز ولا تحلل اليوريا وسالبة لاختبار انتاج أنزيم الاوكسديز علما ان درجة الحرارة المثلى لنموها هي 37 درجة مئوية ودرجة الحموضة المثالية لنموها هي 7 [1 ،2] تعد هذه البكتيريا جزء من الفلورا الطبيعية في القناة الهضمية للانسان في حين ان الانواع المرضية منها وهي *E. coli* (EIEC) Enteroinvasive و *E. coli* (EPEC) Enteropathogenic و *E.* *coli* (EAEC) Enteroaggregative و *E. coli* (ETEC) Enterotoxigenic تسبب حالات مرضية مختلفة كالتهابات المجاري البولية وحالات الاسهال والتهاب الكلى والقرحة في الامعاء وغيرها من الاصابات التي قد تكون حالات مرضية وبائية او فردية قد تؤدي الى الوفاة [4-2]. اذ تمتلك بكتيريا *E.coli* المرضية العديد من عوامل الضراوة التي تلعب دورا في امراضيتها أهمها قدرتها على أفراز الذيفانات الخلوية التي تكون سامة للخلايا كالذيفان Shiga-like toxin (SLT) و وجود الأهلاب التي تمكنها من الألتصاق في البطانة الطلائية للقناة البولية او المعوية فضلا عن ظهور السلالات المقاومة للمضادات الحيوية مما يجعلها قادرة على احداث إصابات متكررة [5،2]. بعد ان اصبحت مشكله المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية شائعة بصورة واسعة شرع الباحثون للبحث عن وسائل جديدة للعلاج 0 واحد اهم البدائل العلاجية هو استخدام الأحياء العلاجية للمحافظة على التوازن الجرثومي الطبيعي داخل جسم المضيف والأسراع في حث الإستجابة المناعية وتعرف المعززات الحياتية Probiotic عرفت على أنها متممات غذائية جرثومية حية تعود بالفائدة على الإنسان لذا أستعملت كعلاجا حيويا للعديد من الأمراض بعدما لوحظ تدني الفاعلية العلاجية لعدد كبير من المضادات الحياتية Antibiotics و حصول مقاومة الجراثيم لها [6-8] ومنها بكتريا حامض اللاكتيك التي تعد أكثر الأنواع شيوعا في المجالات العلاجية و الغذائية لأمتلاكها العديد من الصفات التي تميزها كنموها بوجود أو عدم وجود الهواء وعدم إنتاجها للسموم ومقاومتها للرقم الهيدروجيني المنخفض فضلاًعن كونها من الاحياء غير الممرضة فضلاً عن فعلها التثبيطي لنمو عدد من الأحياء المجهرية الممرضة [9-14] . ولذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن تاثير بعض ظروف النمو على الفاعلية التثبيطية لبكتيريا *L. delbrueckii* و *L.fermentum*على نمو و فاعلية بكتيريا *E.coli* للحد والسيطرة على الاصابات المتسببة بفعل هذه البكتيريا المرضية بديلا عن استعمال المضادات الحياتية .

طرائق العمل:

1- مصدر العزلة البكتيرية *E. coli* :

تم الحصول على عزلة لهذه البكتيريا معزولة سريريا ومشخصة من مختبر الاحياء المجهرية في قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات ، زرعت على سطح عدد من الاوساط الزرعية كوسط الأكار المغذي والماكونكي ووسط EMB عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة لملاحظة نموها ودراسة الصفات الشكلية للمستعمرات النامية مع فحص عدد من المسحات المصبغة لها بصبغة غرام ثم فحصت بالمجهر الضوئي وسجلت صفاتها من حيث الشكل والحجم والقابلية على الاصطباغ وفقا لما ذكره كلا من [15، 16].

2- تحضير اللقاح لبكتيريا *L. delbrueckii* و *L.fermentum* :

حضرالعالق البكتيري لبكتيريا *L. delbrueckii* و *L.fermentum* من افراغ محتويات كيس جاهز حاوي عليهما بشكل مجفد شكل-1 الى انابيب اختبار حاوية على 100مل من وسط مرق MRS وحُضنت الانابيب بظروف لاهوائية عند درجة حرارة 37 م°

لمدة 48 ساعة لغرض تنشيطها ثم لقح من هذا النمو في مرق MRS عند درجة حرارة 37 م° بظروف لاهوائية ولمدة 24 ساعة لغرض تحضير اللقاح البكتيري وقورنت كثافة العالق البكتيري بالمحلول القياسي ماكفرلاند (0.5 McFarland standard of ~1 x 810 خلية / مل).والذي استعمل في التجارب اللاحقة.

شكل 1- العزلتان البكتيريتان *L. delbruecki* و *L.fermentum* المستخدمتان في البحث بالشكل المجفد والعالق.

3- اختبار الفعل التثبيطي لعالق لبكتيريا *L. delbrueckii* و*L.fermentum* على نمو و فاعلية بكتيريا *E.coli* :

أستعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion method للكشف عن الفاعلية التثبيطية للعالق البكتيري الذي حُضر بتنمية عزلات بكتريا*Lactobacillus* بتركيز 810 × 1 خلية/مل في أنابيب إختبار حاوية على وسط مرق MRS ذو رقم هيدروجيني 5.5 ثم حُضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 م ° لمدة 24 ساعة تحت ظروف لاهوائية. واثناء ذلك تم نشر عالق العزلة البكتيرية *E. coli* الممرضة بتركيز 810 × 1 خلية/مل على وسط الأكار المغذي وبأستعمال ثاقب الفلين المعقم عملت ثقوب قطرها 5مليمترات على سطح الوسط بواقع 4 حفر في كل طبق ، ثم ملئت كل حفرة بـ 50 مايكروليتر من عالق المزرعة السائلة لعزلات بكتريا *Lactobacillus* الذي حضر بتراكيز مختلفة (100,90,70,50) % حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24ساعة، بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط حول الحفر وسُجلت النتائج وقُورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على وسط مرق MRS دون اي لقاح بكتيري [17].

4- ثباتية البكتريوسينات تجاه التغيير في الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة :

تم تحضير العالق لعزلات بكتريا *Lactobacillus* في وسط MRS السائل ثم طرد العالق مركزيا (6000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة للحصول على راشح البكتريا الحاوي على البكتريوسينات المنتجة من قبل هذه البكتريا ثم ضبط الرقم الهيدروجيني لهذا الراشح على القيم الهيدروجينية (4 و 8) ،تم قياس فاعلية البكتريوسينات المنتجة من قبل البكتريا في الراشح بطريقة الأنتشار بالحفر بعد ما نشر عالق البكتريا المرضية *E.coli* على وسط الأغار المغذي وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة بعدها قيست مناطق التثبيط حول الحفر وسجلت النتائج وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية راشح البكتريا برقم هيدروجيني 6.4 [18] واعيدت نفس الخطوات السابقة عند اختبار تاثير التغير في درجات حرارة الحضن (37,25) م° على ثباتية الفعل التثبيطي للراشح البكتيري الحاوي على البكتريوسينات على نمو *E.coli* .

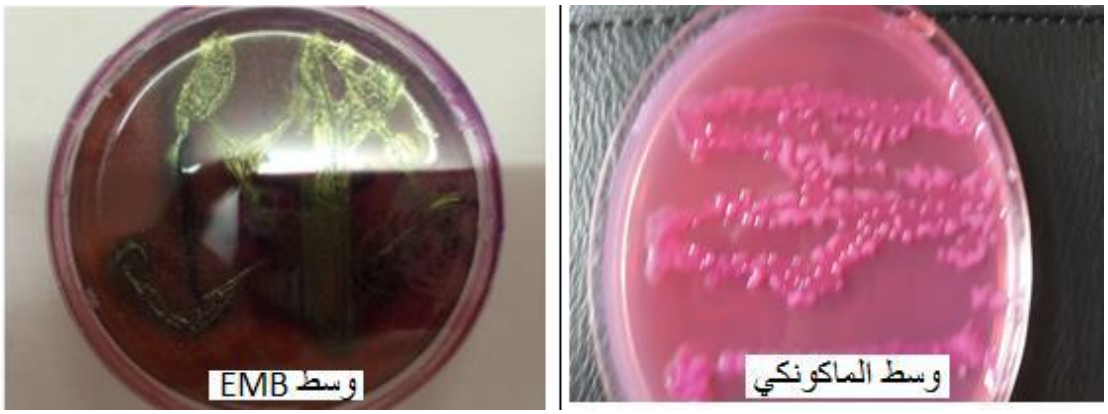
5- حساسية البكتريوسينات تجاه بعض الاملاح :

تم تحضير عدد من المحاليل الملحية وهي NaCl و KCl وبتراكيز 1 و 5 % لكلا منهما وعقمت بالمؤصدة عند درجة حرارة 121م وضغط 15 باوند/أنج 7 لمدة 15 دقيقة ,تم تحضير العالق لعزلات بكتريا *Lactobacillus* في وسط MRS السائل ثم طرد

العالق مركزيا (6000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة للحصول على راشح البكتريا الحاوي على البكتريوسينات المنتجة من قبل هذه البكتريا بعدها عومل 1 مل من راشح العالق البكتيري الحاوي على البكتريوسين المنتج من قبل البكتريا مع 1 مل من المحاليل الملحية المذكورة وحضن المزيج عند درجة حرارة 37 م° لمدة 3 ساعات ثم أختبرت فاعلية البكتريوسين المتبقية وذلك بأستخدام طريقة الأنتشار بالحفر وبأستخدام 100 مايكروليتر من البكتريوسين المعامل في وسط الأغار المغذي المنشور عليه عالق البكتريا الممرضة *E.coli* وحضنت عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة بعدها قيست مناطق التثبيط حول الحفر وسجلت النتائج وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على راشح البكتريا بدون اي من المحاليل الملحية المذكورة [19].

النتائج والمناقشة :

اعتمدت نتائج اختبار بعض الصفات التعريفية لتاكيد تشخيص عزلة بكتريا *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة وذلك من خلال نتائج التصبيغ بصبغة غرام والتي بينت ان هذه البكتيريا ظهرت بشكل عصيات سالبة لصبغة غرام و بعد زرع العزلة على وسطي اغار الماكونكي ووسط EMB ظهرت مستعمراتها على وسط الماكونكي والتي كانت جافة ومنتظمة و وردية اللون لتخميرها سكر اللاكتوز (Lactose fermentation) في حين ان مستعمراتها كانت على وسط EMB كانت معتمة اللون ومحاطة بهالة خضراء معدنية كما ورد في [15,2]

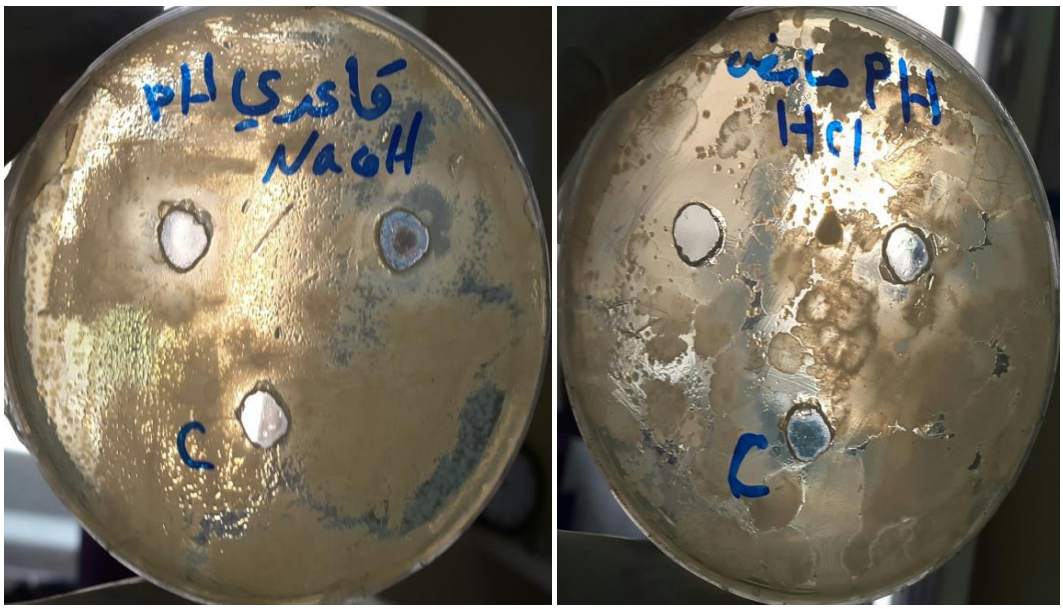


شكل 2– مستعمرات عزلة بكتريا *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة

وقد دلت نتائج دراسة اختبار الفاعلية التثبيطية للعزلتان البكتيريتان *L. delbrueckii* و *L.fermentum* ضد العزلة البكترية *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة عند التراكيز المختلفة (100,90,70,50)% بان عالق العزلتان البكتيريتان *L. delbrueckii* و *L.fermentum* عند التركيز % 100 اعطى اعلى فاعلية تثبيطية ضد بكتريا *E.coli* حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 27 ملم ، بينما بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 17 ملم عند التركيز % 50 كفاعلية تثبيطية لعالق العزلتان البكتيريتان ضد بكتريا *E.coli* عند استخدام طريقة الحفر، في حين ان راشح العزلتان البكتيريتان *L. delbrueckii* و *L.fermentum* عند التركيز % 100 اعطى منطقة تثبيط قطرها 23 ملم وكما موضح في شكل–3 والذي يتفق مع ما اظهرته نتائج Nigam وزملائه [20] في ان لانواع بكتريا حامض اللاكتيك هذه صفة التأثير التثبيطي ضد العديد من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ومنها بكتريا *E.coli* لقدرتها على أنتاج الحوامض والتنافس على المغذيات فضلا عن أنتاجها لعدد من المواد المثبطة والسامة للخلايا المؤثرة عليها[21] .

شكل 3– التأثير التثبيطي للعزلتان البكتيريتان *L. delbrueckii* و *L.fermentum* ضد العزلة البكترية *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة بعد مدة حضن 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م C * = سيطرة

وعند دراسة ثباتية البكتريوسين المنتج من قبل هاتان العزلتان العلاجيتان تجاه التغاير في قيم الاس الهيدروجيني ، اظهرت النتائج ثباتية الفعل التثبيطي للبكتريوسين المنتج عند قيم الاس الهايدروجيني الحامضي من خلال قطر منطقة التثبيط لبكتريا *E.coli* 22 ملم في حين انها بلغت 17 ملم عند قيم الاس الهايدروجيني القاعدي والذي يتفق مع ما ذكره Jack وزملائه (1995) بخصوص ارتباط الفعل التثبيطي للبكتريوسين بمجموعة الكاربوسيل الموجودة في جزيئته والتي يزداد تأينها عند الاس الهيدروجيني المرتفع مما يؤثر سلبا على فعلها التثبيطي وهذا ما اشار اليه ايضا Guder وزملائه [23,22] .



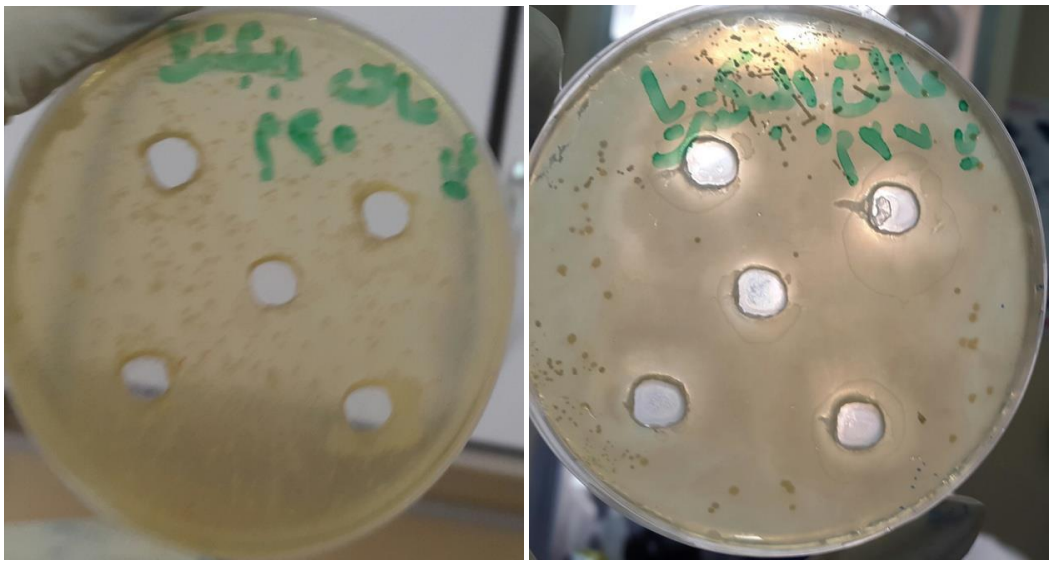
شكل 4– ثباتية البكتريوسين المنتج من قبل العزلتان البكتيريتان *L. delbrueckii* و *L.fermentum* ضد العزلة البكترية *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة عند قيم الاس الهيدروجيني الحامضي والقاعدي C * = سيطرة

في حين ان نتائج اختبار تاثير كل من الملحين Nacl و Kcl عند التركيزين 1 و 5% في فاعلية البكتريوسين بينت ان فاعليته التثبيطية ضد بكتيريا *E.coli* كانت اعلى عند التراكيز الملحية الواطئة 1% مقارنة بفعله عند التراكيز الملحية العالية 5% من خلال نتائج اقطار مناطق التثبيط والتي كانت 16 و 18 ملم لكل من الملحين NaCl و KCl عند التركيز % 1 على التوالي في حين انها انخفضت الى 14 و 15 ملم لكل من الملحين NaCl و KCl عند التركيز % 5 على التوالي . كما موضح في الشكل-5 إتفقت النتائج أيضا مع ماأشار اليه [24] من أن البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *L.acidophilus* له أفضل فاعلية في تركيز % 1 من

NaCl إلا أنها قلت بزيادة التركيز .ويرجع السبب في تأثر فاعلية البكتريوسينات بالأملاح الى إمتلاك هذه المواد الحيوية لبعض الصفات ومنها تاينها كما ان التفاعل بين الجزء غير المحب للماء في البكتريوسين مع غشاء خلايا بكتريا الاختبار يولد قنوات أيونية غير متخصصة وإن عملية تكوين هذه القنوات تقل عند وجود الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ مثل Ca^{+2} أو Mg^{+2} وذلك لمعادلة الشحنات السالبة في فوسفوليبيدات غشاء الخلايا واختزال نفاذية الغشاء الخلوي ، أي أن وجود الأملاح بتراكيز معينة يمكن ان يعيق عمل البكتريوسينات بتفاعلها أو تداخلها مع المجاميع الأيونية لجزيئات البروتين وبهذا تقلل من التداخلات التي قد تحصل بين جزيئات البروتين نفسها مما يقلل من الفعاليات الحيوية لهذه المواد [25].

شكل 5– ثباتية البكتريوسين المنتج من قبل العزلتان البكتيريتان *L.delbrueckii* و *L.fermentum* ضد العزلة البكترية *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة عند اختبار تاثير كل من الملحين KCl وNaCl . C * = سيطرة

كما بينت النتائج ثباتية الفعل التثبيطي للبكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *Lactobacillus* عند درجة الحرارة 37 م° في حين انه انعدم عند درجة الحرارة 25 م° شكل–6 والذي قد يعود الى ان انتاجها للبكتريوسينات مرتبطا بنموها ولكون درجة الحرارة المثلى لنمو بكتيريا *Lactobacillus* هي 37 م° بالتالي فان ثباتية الفعل التثبيطي للبكتريوسين المنتج من قبل هذه بكتريا يكون اعلى عند هذه الدرجة الحرارية .



شكل 6– ثباتية الفعل التثبيطي للبكتريوسين المنتج من قبل العزلتان البكتيريتان *L. delbrueckii* و *L.fermentum* ضد العزلة البكترية *E.coli* المستخدمة في هذه الدراسة عند اختبار تاثير درجتي الحرارة 37 و 25 م° عليه.

المـــصـــــادر :

1. Baron, E.J., Peterson, L.R. and Finegold, S.M. **1994**. *Bailey & Scotts- Dia gnostic Microbiology* . Ninth Edition, Mosby- year books , Inc . st . Louis, Missouri , U S A.
2. Brooks , G. F. , Butel , J. S. and Morse , S. A. **2004** . *A lange Medical Book- Jawetz , Melinick & Aldelberg, S Medical Microbiology*. Twenty Third Edition, McGraw Hill Companies, United States .
3. Albert, M.J., Ansaruzzaman, M. and Bhuiyan, N. A. **1993**. Epithelial cell invasiveness of enteropathoenic serotypes of *Escherichia coli. J. Darrhoeal Dis.Res*. 11(2), pp:101-104.
4. World Health Organization. **1997**. Prevention and Control of Enterohaerrhagic *Esherichia coli* (EHEC) Infection. Report of WHO Consultation WHO / FSF / FOS / 97.6.Geneva.
5. ALthwani, N.A., Ashwaq, B.A. and Haitham , A.B. **2003**.The effect of cytotoxins produced by Enteroheamorrhagic *E.coli*O157:H7 Isolated from bloody in children on suckling mice and vero cell. *J. Iraqi. Biotech.*, 2 (1), pp: 128 – 141.
6. Roberfroid, M.B. **2000**. Prebiotics and Probiotics :are they functional foods ?. *Am.Clin. Nutr.*, 71 (suppl.6), pp: 1682S-1690S.
7. FAO/WHO. **2001**. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
8. Rayes ,N . seehofer, D , Muller, A.R , Hansen S, Bengmark S and Neuhaus P . **2002**. Influence of probiotics and fibre on the incidence of bacterial infections following major abdominal surgery .Z. *Gastroenterol.*,40, pp:869-76.
9. Asahara , T ., Nomoto,K ., Watanuki, M . and Yokokura ,T . **2001**. Antimicrobial Activity of Intraurethrally Administered Probiotic *Lactobacillus casei* in a Murine Model of *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ., 45 (6), pp:1751–1760 .
10. Servin, A. L. **2004**. Antagonistic activities of *lactobacilli* and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev*. 28, pp:405-440.
11. Burkholder, K. M. and Bhunia, A. K. **2009**. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus rhamnosus GG*. *Gut Pathog*., 1, p:14.
12. Banerjee, P., Merkel, G. J. and Bhunia,A. K. **2009**. *Lactobacillus delbrueckii ssp.* bulgaricus B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathog.*, 1, p:8.
13. Moorthy, G., Murali, M. R. and Niranjali, S. **2010**. *Lactobacilli* inhibit *Shigella dysenteriae* 1 induced pro-inflammatory response and cytotoxicity in host cells via impediment of *Shigella*-host interactions. *Dig Liver Dis.*, 42, pp:33-39.
14. Alwan, A. H. **2011**. The protective effect of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*) against urinary tract infections caused by Proteus mirabilis in vitro. *Journal of Al-Kufa University for Biology*, 3(2), pp:75-86.
15. Morello, J .A. and Mizer, H.E. **2006**.*Labrotory manual working in microbiology* (*application to patient care*). Eighth Edition. USA.
16. Forbes, B.A., Saham, S.F. and Weissfeld, A. S. **2007**. *Diagnostic Microbiology* . Twelfth Edition. Mosby. Inc . USA.
17. Paluszak,Z., Kaszewska,J.E. and Szala ,B. **2007**. Inhibitory effect of lactic acid bacteria of genus *lactobacillus* on the survival of *proteus* and *Shigella* Rods in Mixed Culture. *Bull. Vet. Inst .Pulawy.*, 50, pp: 335-340.
18. Larsen, A.G., Vogensen, F.K. and Josephen, J. **1993**. Antimacrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: Purification and characterization of bavaricin A, abacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401.*J.Appl.Bacteriol*.,75(2), pp:113-122.
19. Karaoghlu, S.A., Aydin, F., Kilic, S.S. and Kilic, A.O. **2003**.Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by Vaginal lactobacilli. *Tark.J.Med.Sci.*, 33, pp:7-13.
20. Nigam,A., Kumar,A., Madhusudan, H. and Bhola,N. **2012**. *In-vitro* Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against common enteric pathogens. *iMedPub Journals*,1(4), pp:1-6.
21. AL-Shaikly,Damia M.I **1999**. Study the Bacteriosins produced by lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis. College of Science, University of Al-Mustansiriya.

22. Jack, R.W., Tagg, J. R. and Ray, B. **1995**. Bacteriocin of gram- positive bacteria. *Microbiology Review*, 59(2), pp:171-200.
23. Guder, A., Wiedeman, J. and Sahi. H.G.**2000**. Post-transtationally modified bacteriocin . The L antibiotics. *Biopolymers*, 55, pp:62-73.
24. Karaoghlu, S.A., Aydin, F., Kilic, S.S. and Kilic, A.O. **2003**.Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by Vaginal *lactobacilli*, *Tark.J.Med.Sci*.,33, pp:7-13.
25. Leer, R.J., Van der Vossen, J.M.B.M., Van Giezen, M. and Van Noort, J.M. **1995.** Genetic analysis of acidin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol*.,141, pp:1629-1635.