التأثير ألتضادي الحيوي بين البكتريا *Bifidobacterium longum* للعفن *Aspergillus parasiticus* وبعض أنواع البكتريا

أ.د. صلاح عمر احمد أ.د. حامد صالح محمد أ.م.د. غانم محمود حسن

جامعة الموصل / كلية الزراعة والغابات / قسم علوم الاغذية

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٤/١٤ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٦/١١)

ملخص البحث:

تم عزل البكتريا *Bifidobacterium longum* من براز الأطفال حديثي الولادة وتنقيتها وتشخيصها من خلال الفحوصات الشكلية والكيميوحيويه. كما درس التأثير المثبط لراشح البكتريا *B.longum* على بعض أنواع البكتريا المرضية اذ وجد أن قطر المنطقة الخالية من النمو لبكتريا *Staphylococcus aureus* بلغ ١٣ملم في حين أن قطر المنطقة الخالية من النمو لبكتريا *Bacillus subtitlis* وصل الى ١٢ملم وكانت أكثر الأنواع مقاومة للبكتريوسين هي *Escherichia coli* ، *Salmonella typhi* إذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو١١ملم , كما درس تأثير بكتريا *B.longum* في نمو العفن *Aspergillus parasiticus* وإنتاج سموم ألآفلا B_1 و B_2 وG_1 وG_2 في وسط مكون من بيئة MRS ومستخلص الذرة.

(كلمات دالة : سموم الافلا ، بكتريا حامض اللاكتيك ، *B.longum*، *A. parasiticus* ، البكتريا المرضية ، البكتريوسينات)

Influence of Antibiosis of the Bacteria *Bifidobacterium longum* Against the Mold *Aspergillus parasiticus* and some Bacteria

Abstract:

Bifidobacterium longum was isolated from the feces of newborn babies. The bacteria was purified and identified through morphological and biochemical examinations. The inhibitory effect of the bacterial culture filtrate against the growth of some pathogenic bacteria was studied using the inhibitory zone method. Results showed that the culture filtrate caused inhibition of *Staphylococcus aureus* growth with a zone of 13 mm, while it was 12 mm for *Bacillus subtilis* in a zone of 12 mm. However, the most resistant bacteria were *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* as the zone of inhibition was 11 mm for both bacteria. The effect of *Bifidobacteriumlongum* was also tested against the growth and aflatoxins production by the aflatoxigenic mold *Aspergillus parasiticus* in a liquid culture composed of MRS and corn extract.

المقدمة

تعد بكتريا *Bifidobacterium sp.* من الأجناس المهمة لبكتريا حامض اللاكتيك المستوطنة في الأغشية المخاطية لأمعاء اللبائن وتسمى بالبكتريا الصديقة لأهميتها الصحية عند استهلاك الألبان المتخمرة الحاوية عليها ، اذ تعمل على تحسين التوازن المايكروبي للأحياء في الأمعاء وكذلك لها تأثير مثبط لبعض أنواع البكتريا المرضية اذ تنتج البكتريوسينات المثبطة للبكتريا المرضيه وهي مركبات حيوية ببتيدية مخلقة في الرايبوسومات وتعمل كأنظمة حماية ضد الأحياء المجهرية (Ennahar et al ,2000)، وتمنع تكوين الأنزيمات التي تفرزها البكتريا المرضية وبهذا تمنع تأثير السموم والمواد المسرطنة الأخرى , كما تنتج بعض مواد الايض مثل الأحماض العضوية التي تعمل على خفض الأس الهيدروجيني (pH) وهي أيضا مقاومة لأملاح الصفراء ومخفضة للكوليسترول في الجسم وتقلل من عدم تحمل اللاكتوز (Lactose intolerance) من قبل بعض المستهلكين(Gurosy et al,2005 و الخفاجي، ٢٠٠٠) .

تشير الدراسات إلى أن بكتريا حامض اللاكتيك لها تأثير مثبط لنمو الاعفان المنتجة لسموم ألآفلا وبالتالي تثبيط إنتاج هذه السموم (Onilude etal ,2005) ، إذ لاحظ Gerbaldo وآخرون (٢٠١٢) أن بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك التابعة للجنس *Lactobacillus sp.* وجدت مثبطة للاعفان المنتجة لسموم الأفلا فضلاً عن التقليل من قدرتها على إفراز هذه السموم في ألأعلاف الحيوانية وبنسبة وصلت إلى ١٠٠% , لذا عدت هذه البكتريا من أنواع البكتريا الصحية .

أن سموم الافلا هي مواد أيضية ثانوية تنتج من قبل مجموعة من الفطريات ومنها *Aspergillus flavus* , *A.parasiticus* وغيرها من أنواع هذا الجنس التي تنمو على الأغذية والأعلاف مؤدية الى خسائر اقتصادية للصناعات المعتمدة على المحاصيل أو منتجات الألبان وتسبب أيضا مشاكل صحية للإنسان والحيوان كونها عوامل مطفرة ومسببة لسرطان الكبد والكليتين ومثبطة للجهاز المناعي وتمثيل البروتين والدهن وذات تأثيرات ضارة على الأنظمة الخلوية وغير ذلك من التأثيرات الضارة (CAST , 2003) .

إشتملت هذه الدراسة على عزل بكتريا *B.longum* من براز الأطفال وتنقيتها وتشخيصها وتنميتها على الوسط MRS ودراسة تأثيرها على بعض انواع البكتريا المرضية وكذلك تأثيرها على نمو وإنتاج السموم الافلا B_1 و B_2 و G_1 و G_2 من قبل

العفن *A.parasiticus* NRRL 2999 في وسط غذائي سائل .

مواد البحث وطرائقه

عزلت بكتريا *Bififobacterium longum* من براز الأطفال حديثي الولادة وبعمر أسبوعين والمعتمدين في تغذيتهم على الرضاعة الطبيعية فقط وباستخدام الوسط الغذائي السائل MRS المعقم (الوسط يتكون من ١٠ غم pepton و ١٠ غم Beef extract وهغم Yeast extract وه غم Sodium acetate trihydrate و ٢٠ غم Glucose و ١ مل Tween 80 و ٢غم Tri ammonium citrate 0.2 غم $MgSO_4.7H_2O$ و 0.05غم $MnSO_4.4H_2O$) وحضنت عند درجة حرارة ٣٧مْ لتنمية البكتريا حسب طريقة حسن (٢٠٠٧) كما أجريت الفحوصات المظهرية والكيمياحيوية حسب طريقة (Harrigan and McCance , 1976) وبالاعتماد على Bergey's Manual (Holt et al , 1994) . نميت بكتريا *B.longum* في الوسط MRS حسب طريقة (et al , Anjani 1990) إذ حضر الوسط وتم توزيعه في دوارق زجاجية وبواقع ٩٠ مل من الوسط / دورق وضبط الأس الهيدروجيني 5.8 وعقم بالمؤصده على ١٢١مْ / ١٥ دقيقه ولقح ببكتريا *B.longum* (حضر لقاح البكتريا باستخدام وسط الـ MRS broth وجرى التحضين بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة) وجرى أنتاج البكتريوسين من العزلة المحلية وفصلت الخلايا بالطرد المركزي ٦٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ٢/١ ساعة وقدر تأثير المادة المثبطة في الراشح حسب طريقة (Karaoghlu et al ,2003) وبطريقة الانتشار بالأقراص وباستخدام الوسط المناسب لتنمية الأنواع المختلفة من البكتريا المرضية وتم تحديد ألتأثير التثبيطي بقياس المنطقة الخالية من النمو حول القرص للبكتريا *Staph.aureus* , *B.subtilis* , *E.coli* و *Salmonella typhi* وقد تم الحصول على عزلات البكتريا من قسم علوم الحياة في كلية العلوم بجامعة الموصل . نمي العفن *A.parsiticus* NRRL2999 في الوسط Potato dextrose agar وبعد التحضين لمدة أسبوع بدرجة حرارة ٢٨مْ ، وحضر معلق العفن *A.parsiticus* NRRL2999 حسب الطريقة الموصوفة من قبل Farag et al. (1987) بحيث احتوى المليليتر الواحد على ٦١٠ / سبور.

لقحت الدوارق الحاوية على وسط MRS ومستخلص الذرة الصفراء وبنسبة (١:١) وذلك بنقل١٠ مل من لقاح بكتريا

B.longum الى ٩٠ مل من الوسط ، خلت المعاملة القياسية من اللقاح البكتيري ، ثم أضيف ١ ملليلتر من المعلق السبوري للفطر *A.parasiticus* NRRL2999 الى الوسط اعلاه، وحضنت الدوارق على درجة ٢٨مْ ولمدة ١٥ يوماً . اخذ ١٠ مل عينه كل ٣ ايام لمتابعة التغيرات في الأس الهيدروجيني والعدد الكلي للبكتريا والعفن وتواجد سموم الافلا B_1 و B_2 و G_1 و G_2 ولوحظ النمو الظاهري لهايفات العفن في الدورق.

اعتمدت طريقة الإطباق القياسية في حساب العدد الكلي للبكتريا والاعفان وفق ماذكره (Anjani وآخرون (١٩٩٠) وتم التحضين للبكتريا عند ٣٧مْ لمدة ٤٨ ساعة على الاوساط التغذوية ، Mannitol salt agar و Nutrient agar و MacConkey agar و S–S agar لانواع البكتريا *Staph.aureus* و *B. subtilis* و *E. coli* و *S. typhi* ، على التوالي ، بينما تمت تنمية العفن على ٢٨مْ ولمدة ٥ أيام وباستخدام الوسط PDA وبإتباع طريقة (Yousef et al ,1980) في استخلاص سموم الأفلا وطريقة (Scott et al ,1970) في تقدير سموم الافلا الأربعة اذ جرى استخلاص سموم الافلا من وسط التنمية بالكلوروفورم لمرتين ثم جفف المستخلص تماماً وذوب بحجم معلوم من الكلوروفورم كمذيب بعدئذ تم فصل السموم بكروماتوكرافي الطبقة الرقيقة سمك ٠,٢٥ ملم باستخدام محلول تطوير كلوروفورم : ميثانول ٣ : ٩٧ وشخصت السموم بالمقارنة مع السموم القياسية وقدرت كمياتها .

استخدم جهاز pH meter نوع فيليبس هولندي الصنع لقياس الأس الهيدروجيني وقدرت الحموضة الكلية حسب طريقة Ling (١٩٦٣) كحامض لاكتيك بالمعايرة مع محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 عياري وبأستخدام دليل الفينوفثالين وحسبت النسبة المئوية للحموضة.

النتائج والمناقشة

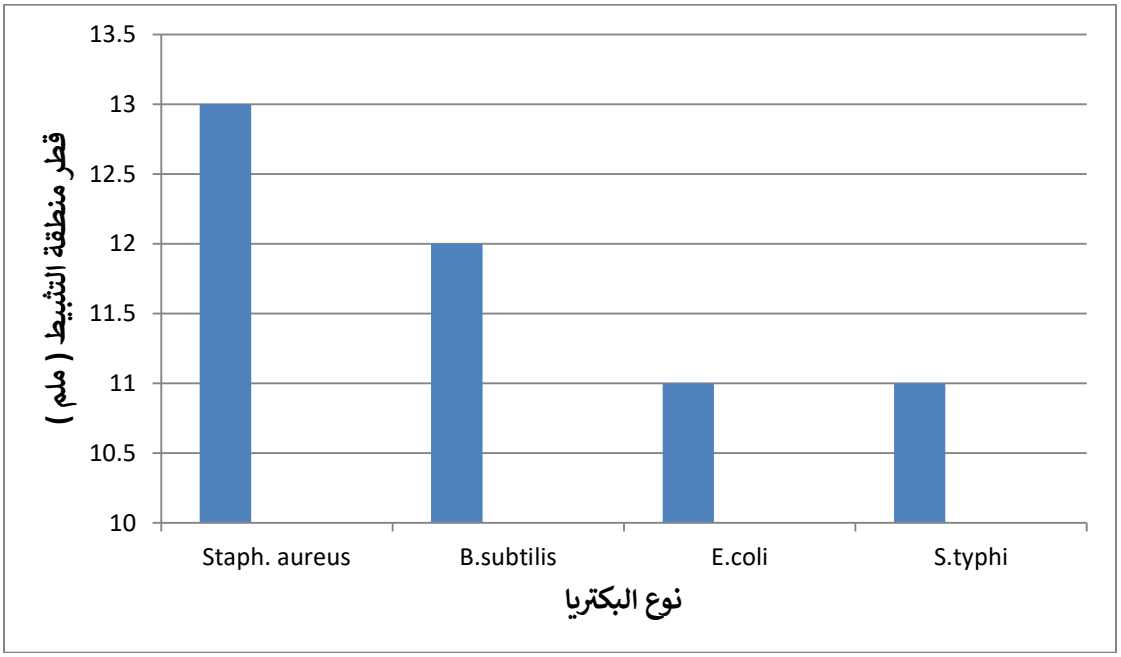
الصفات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *B.longum* :–

أظهرت نتائج الاختبارات أن العزلة المحلية المأخوذة من براز الأطفال مطابقتها مع موسوعة Bergey's (Holt et al ,1994) إذ وجد من الجدول(١) ان العزلة كانت موجبة لصبغة كرام وغير متحركة وغير مكونة للسبورات وذات شكل عصوي مفردة او ثنائية وغير محللة للكازين والجيلاتين والنشا وسالبة لانتزاع مجموعة الامين من الحامض الاميني وغير منتجة لانزيم الكتاليز والاندول وهي مخمره لكل من الكلوكوز والفركتوز والكالكتوز والسكروز واللاكتوز والمانوز والرافينوز والمالتوز والانيولين والاسكولين والمانيتول وغير مخمرة للسوربيتول والسالسين والارابينوز والزايلوز وهذه تتفق مع مابينه Moli et al. (1993) .

الجدول ١ : الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *B.longum* .

الصفات المظهرية				
موجبة لصبغة كرام	غير متحركة	لاتكون سبورات	شكلها عصوي وبعضها متفرع الى قسمين بشكل حرف لا.	توجد بشكل خلايا مفردة أو ثنائية
درجات حرارة التنمية (درجة مئوية)				
٥ لايوجد نمو	١٥ لايوجد نمو	٢٥ ضعيف	٣٠ جيد	٣٧ جيد جداً	٤٥ جيد
الصفات الكيموحيوية				
غير مسيلة للجلاتين	لاتحلل الكازين	لاتحلل النشا	سالبة لاختبار الكتاليز	لاتكون الامونيا من الارجنين	غير منتجة للاندول من التربتوفان
تخمر السكريات				
الكلوكوز (+)	الفركتوز (+)	الكلاكتوز (+)	السكروز (+)	اللاكتوز (+)	المانوز (+)	الرافينوز (+)	المالتوز (+)
الانيولين (+)	الاسكولين (+)	السوربيتول (-)	سالسين (-)	الارابينوز (-)	الزايلول (-)		

التاثير التثبيطي لراشح بكتريا *B.longum* في بعض أنواع البكتريا المرضية:- من الشكل(١) يتبين التأثير التثبيطي لراشح بكتريا *B.longum* على بعض الأنواع البكتريا المرضية وهي *Staph.aureus* , *B.subtilis* , *E.coli* و *S. typhi* في الأوساط الصلبة إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو ١٣ و ١٢ و١١ و١١ ملم للأنواع الأربعة من البكتريا , على التوالي , مما يعطي دلالة على أن راشح بكتريا *B.longum* أظهرت فعالية تثبيطية كبيرة لهذه الأنواع من البكتريا المرضية وأن التأثير الأعلى كان ضد البكتريا *Staph.aureus* , ويمكن أن يعزى هذا إلى إنتاج البكتريوسينات من بكتريا *B.longum* والتي تعد ذات فعل تثبيطي عالي تجاه البكتريا المستخدمة في الدراسة (Tharmaraj and ,Shah , 2009) .



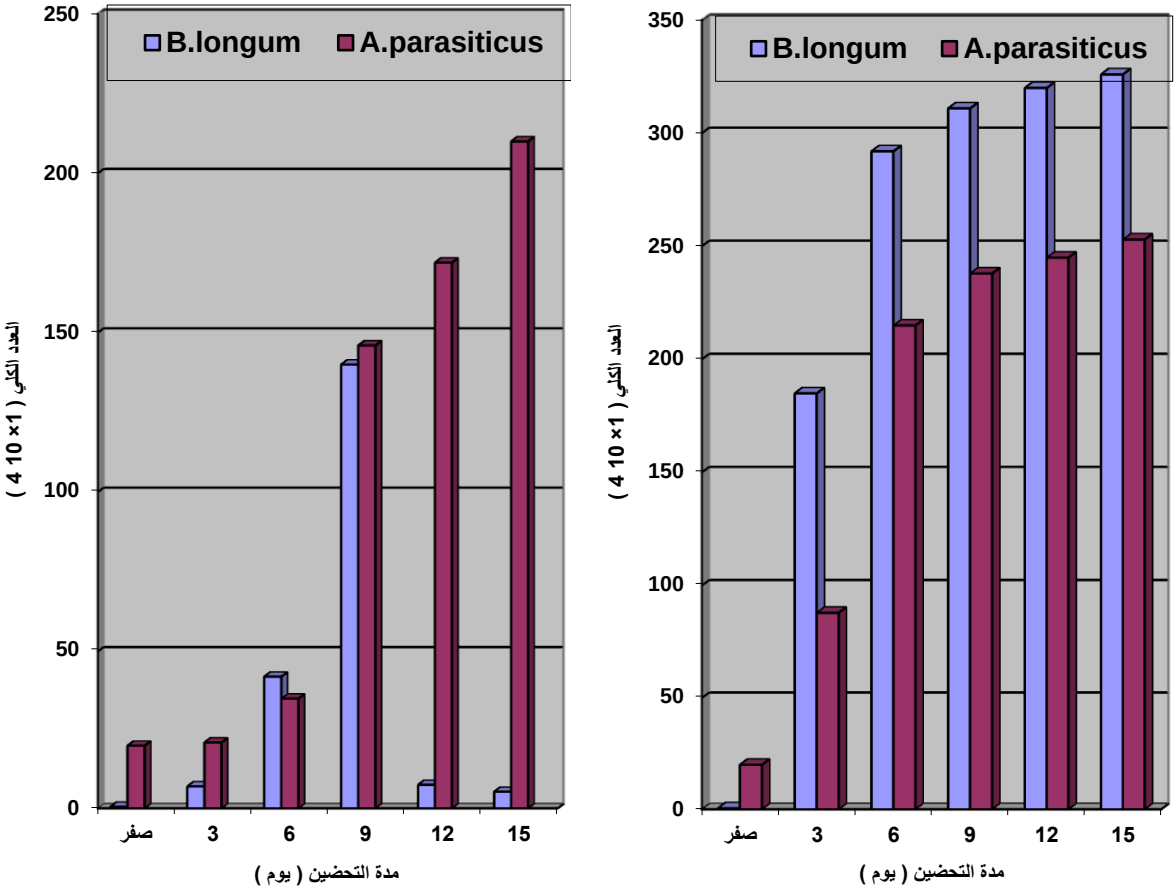
الشكل ١: التاثير التثبيطي لراشح بكتريا *B.longum* في بعض أن البكتريا المرضية

ألاس الهيدروجيني وحموضة وسط النمو والنمو الظاهري للعفن :- من الجدول(٢) يلاحظ ان نمو بكتريا *B.longum* أدى إلى تغير في الأس الهدروجيني (pH) إذ انخفض معدله في الوسط الغذائي من 6.45 إلى 3.84 بعد ٦ أيام من التحضين فيما ازدادت الحموضة من 0.14% الى 0.46% كنسبة مئوية للحموضة والتي تقدر كحامض اللاكتيك (كونه الحامض السائد في الوسط التغذوي) خلال نفس المدة , ثم حصل ارتفاع في قيمة الـ pH وانخفاض في الحموضة بسبب استهلاك الحموضة من قبل العفن *A.parasiticus* اذ وصل أعلى ارتفاع له بعد ١٥ يوم من التحضين إلى 4.9 بينما انخفضت الحموضة الى 0.28% كحامض لاكتيك, يعزى ذلك إلى تزايد أعداد العفن *A.parasiticus* واستهلاكه للحموضة من الوسط , تتفق النتائج مع ماوجده (Pundir and Jain , 2010) .

الجدول ٢ : الأس الهيدروجيني وحموضة الوسط الغذائي والنمو الظاهري للعفن *A.parasiticus* عند نموه مع بكتريا حامض اللاكتيك *B.longum*.

مدة التحضين / ساعة	ألأس الهيدروجيني	الحموضة %	النمو الظاهري للفطر *A.parasiticus*
صفر	6.45	٠.١٤	-
٣	٤.٥٤	٠.٣٥	+
٦	٣.٨٤	٠.٤٦	+++
٩	٤.٥٠	٠.٣٦	+++
١٢	٤.٨٠	٠.٣٠	++
١٥	٤.٩٠	0.28	++

العدد الكلي للعفن والبكتريا :- من الشكل (2) يتبين حصول نمو واضح لبكتريا حامض اللاكتيك في الأيام الأولى من التحضين , وازدادت إعدادها من٥.0 × 10٤ c.f.u /مل إلى ٤٢ و ١٤٠×١٠٤ c.f.u / مل بعد ٦ و ٩ أيام من التحضين , على التوالي , ثم بدأت الأعداد بالانخفاض لتصل إلى 5.3×١٠٤ c.f.u / مل بعد ١٥ يوم من التحضين ويعزى هذا الانخفاض إلى التأثير التنافسي للعفن *A.parasiticus* على المغذيات في الوسط وتغير الـ pH . في حين أعداد مستعمرات العفن في بداية التحضين كانت ٢٠×١٠٤ c.f.u / مل ثم ازدادت لتصل إلى ٢١٠×١٠٤ c.f.u /مل بعد ١٥ يوم من التحضين مما يعني سيادة العفن في وسط النمو بسبب انخفاض حموضة الوسط الغذائي بعد ١٥ يوم من التحضين بالمقارنة مع تلك المتكونة بعد ٦ أيام من التحضين(الجدول 2) . وبالمقارنة مع نمو كل من البكتريا والعفن على حدة يتضح الفارق في الأعداد إذ أن البكتريا نمت وازدادت الأعداد طردياً مع إطالة مدة لتحضين لتصل إلى أعلى أعدادها بعد ١٥ يوماً ، وهذا الأمر حدث كذلك مع الفطر *A. parasiticus* الذي نما هو الأخر بشكل جيد وازدادت أعداده مع إطالة فترة التحضين وبلغت أعلى الأعداد عند ١٥ يوماً ، وهذه الزيادة في أعداد البكتريا والفطر ترجع إلى تواجد النوعين كل على انفراد في الوسط .

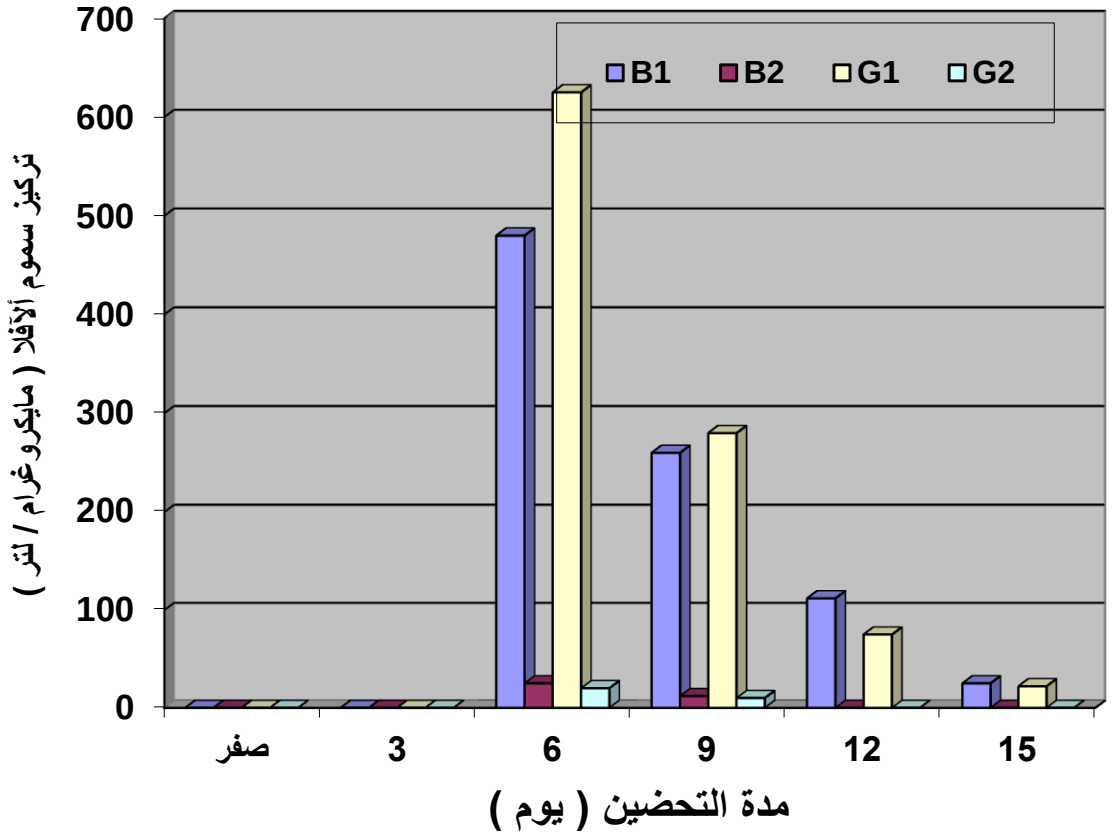


نمو البكتريا والعفن كل على حدا في الوسط **نمو البكتريا والعفن معاً في الوسط**

الشكل ٢ : العدد الكلي لبكتريا *B.longum* والعفن *A. parasiticus* المنميان في وسط MRS ومستخلص الذرة الصفراء .

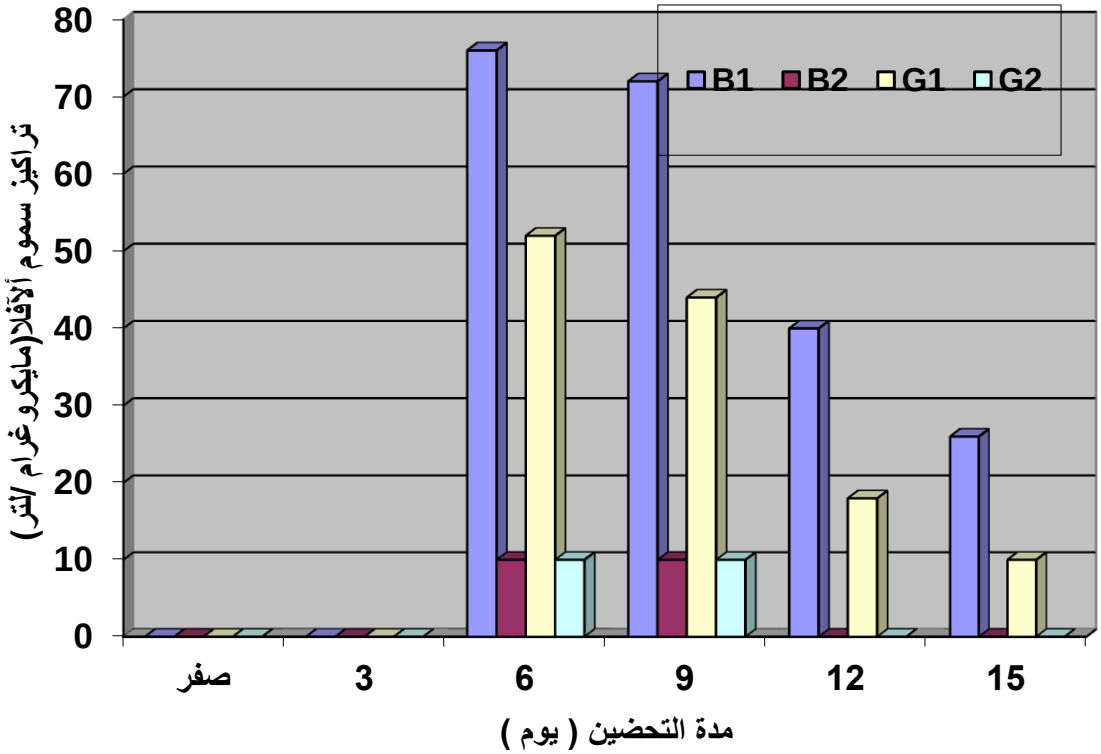
انتاج سموم الأفلا :- الشكل (٣) يوضح أن سموم الأفلا المنتجة بوساطة العفن *A.parasiticus* النامي في وسط MRS ومستخلص الذرة وبدون تواجد بكتريا *B.longum* تفاوتت بحسب مدة التحضين , إذ أن أعلى إنتاج للسموم الأربعة B_1 و B_2 وG_1 وG_2 كانت بعد ٦ أيام من التحضين وبلغت ٤٨٠ و ٢٥ و ٦٢٥ و ٢٠ مايكروغرام / لتر , على التوالي , ثم حصل انخفاض

في المنتج من السموم خاصةً بعد ١٥ يوم من التحضين ليصل الى ٤٥ و ٢٢ مايكروغرام / لتر لسمي الأفلا B_1 وG_1 , على التوالي وثبط كلياً إنتاج النوعين الأخرين من السموم , ويعزى هذا الانخفاض في إنتاج سموم الافلا إلى انخفاض تركيز المغذيات من الوسط مما دفع العفن إلى استهلاك سموم الأفلا التي يستخدمها العفن كمخزون غذائي عند انخفاض المغذيات من الوسط (El-Gazzar et al ,1986) .



الشكل ٣ : تراكيز سموم الأفلا B_1 و B_2 و G_1 و G_2 المنتجة بوساطة العفن *A.parasiticus* النامي في وسط MRS ومستخلص الذرة لوحده .

من الشكل(٤) لوحظ أن معدلات سموم ألأفلا B_1 و B_2 و G_1 و G_2 المنتجة بوساطة العفن *A.parasiticus* تأثرت بوجود بكتريا *B.longum* إذ لم ينتج العفن سموم الافلا خلال ٣ أيام الأولى بسبب مروره في الطورين التمهيدي واللوغارتمي (إن العفن ينتج سموم الأفلا خلال طور الركود) إضافة إلى التأثير المثبط للبكتريا وإنتاجها للبكتريوسينات , أما بعد ٦ أيام من التحضين فقد نشط العفن *A.parasiticus* وأنتج هذه السموم إذ بلغت المعدلات ٧٦ و١٠ و ٥٢ و١٠ مايكروغرام/لتر من السموم الأربعة , على التوالي . حصل انخفاض في إنتاج السموم بتقدم مدة التحضين لتصل المعدلات بعد ١٥ يوم من التحضين إلى أدنى تراكيزها فبلغت ٢٦ و ١٠ مايكروغرام/لتر لكل من النوعين B_1 و G_1 , على التوالي , فيما ثبط انتاج النوعين B_2 و G_2 بصورة تامة , ويعود سبب هذا إلى التأثير التثبيطي لبكتريا *B.longum* وإنتاج البكتريوسينات المؤثرة في قدرة العفن على إفراز السموم إضافة إلى ربط جزء من سموم ألأفلا على أسطح خلايا البكتريا السابقة إذ أن البكتريا ربطت سموم الافلا عن طريق تكوين معقد على سطح خلاياها وخاصة الجدار الخلوي وبالذات الـ Peptidoglycan الذي يعمل على ربط السموم في الوسط الحامضي للمعدة مما يؤدي إلى تقليل الامتصاص في الأمعاء(Gratz et al , 2004) , فضلاً عن انخفاض تراكيز المغذيات من الوسط بسبب استهلاكها من قبل البكتريا والعفن, تتفق هذه النتائج مع ماوجده (et al Sezer ,2013) .



الشكل ٤ : تراكيز سموم الآفلا B_1 و B_2 و G_1 و G_2 المنتجة بوساطة العفن *A.parasiticus* النامي في وسط MRS ومستخلص الذرة بتواجد بكتريا *B.longum* .

المصادر

حسن , غانم محمود (٢٠٠٧) . تصنيع منتوج لبني متخمر باستخدام عزلات مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيك . أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل ، العراق .

الخفاجي، زهرة محمود (٢٠٠٨) . الأحياء العلاجية " من أجل الحياة " . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد، العراق.

Anjani,K. ; Wezenberg E. and Bullerman L.B.,(1990).Inhibition of mold growth aflatoxin Production by *Lactobacillus Spp.J.Food Prot.53(3).*

CAST(Council for Agriculture Science and Technology) (2003). Mycotoxins : Risks in plant , Animal and Human systems.In:task force report,NO.139.Ames,Lowa,USA.

El-Gazzar ,F.E ; Rusul G. and Marth E.H. (1986) . Growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in the presence of sodium chloride. *J. Food prot. , 49 (6) : 461 – 466* .

Ennahar, M.A. ; Remiger V.G. ; Eijsink H..and Vogel R.F. (2000).A gene Cluster encoding Plantaricin1-25 beta and other Bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus Plantarum* TMW1-25 Biochemic-Biophysica-Acta.

Farag, R.S. ; El-leithy M.A. ; Bayony A.E. and Daw Z.Y. (1987). Growth and aflatoxin Production by *A.Parasiticus* in medium containing plant hormones hericides or insecticidies . *J. Food Prot.50(12):1044-1047.*

Gerbaldo , G.A. ; Barberis C. ; Pascual L. ; Dalcero A. and Barberis L. (2012) . Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties . *FEMS Microbiol. Letters , 332 (1): 27- 33* .

Gratz,S. ; Mykkanen H. ; Ouwehand A. ; Juvonen R.; Salminen S. and El-Newzami H. (2004).Intestinal mucus alter the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in Nitro *.Appl.Environ.Microbiol.70:6306 -6308.*

Gurosy,O. ; Kinik O. and Gokce (2005).The role of Dairy Foods and Probiotic bacteria in cancer Preventation . *Egyption J. of Dairy Sci.. 33: 13.*

Harrigan, W. F. and McCance M. E. (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press. London, NewYork, Sanfrancisco, USA.

during fermentation and storage .*World J. of Dairy and food Sci., 5(2): 221-225* .

Sezer , C. ; A. Guven ; N.B. oral and L. Vatansever (2013) . Detoxification of aflatoxin B_1 by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria . *Turk. J. Vet. Sci. , 37 : 594 – 601* .

Scott,P.M. ; W.Lawrence J. and Welbeek W.V. (1970).Detection for Mycotoxin by thin –Layer chromatography.application to screening of fungus extracts.*Appl Microbiol.,20:839-842*.

Tharmaraj , N. and Shah N.P. (2009) . Antimicrobal effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese – based dips. *Internation. Food Res. J. , 16 : 261 – 276* .

Yousef,A.E. ; El-Gendy S.M. and Marth E.H. (1980).Growth and Biosynthesis of aflatoxin by *Aspergillus Parasiticus* in cultures containing nisin,2-Lebensam unters.forsh.171:341-344.(C.F.El-Gazzar,F.E.etal ., *J.Food prot.49:461-466*.

Holt, J.C. ; Kreig N.R.; Statley J.T. and Willisms S.T. (1994). Bergey's Mannual of determinative bacteriology 9th edition.Williams and Wilkins Baltimore . Maryland,U.S.A.

Karaoghlu,S.A. ; Aydin F. ; Kilic S.S.and Kilic A.O. (2003).Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli.*Turk,J.Med.Sci.,33971 3*.

Ling, E. R. (1963). A Text Book of Dairy Chemistry. Vol. 2, Chapman and Hall, Ltd, London, UK.

Moli, G. ; Jeppsson B. and Ahrne S. (1993). Numerical taxonomy of *lactobacillus spp.* Associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J. Appli. Bacteriol, 74: 314-323*.

Onilude , A.A. ; Fagade O.E.; Bello M.M. and Fadahunsi I.F. (2005) . Inhibition of aflatoxin – producing aspergilli by lactic acid bacteria isolated from indigenously fermented cereals gruels . *Afric. J. Biotechnol. , 4 (12) : 1404 – 1408.*

Pundir , R.K. and Jain P. (2010) . Change in microflora of sauerkraut