تأثير البكتريوسين المنتج من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* على بلعمة خميرة *Candida albicans* المقتولة في الزجاج

سهام جاسم الكعبي
كلية التربية للبنات –جامعة الكوفة

أزهار جاسم الكعبي
كلية الصيدلة –جامعة الكوفة

الخلاصة

تضمن البحث استخلاص البكتريوسين الخام من عزلة محلية لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* وحضرت بتراكيز مختلفة من البكتريوسين الخام شملت (1000,500,250,50) مكغم / مل بعدها اجري اختبار تأثير هذه التراكيز من البكتريوسين على عيوشية الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى(Polymorphonuclear cells (PMNC , واختيرت ثلاثة تراكيز منها وهي (1000,500,250)مكغم / مل لمعرفة تأثير البكتريوسين الخام على عماية البلعمة ولم يكن لتركيز (250) مكغم /مل من البكتريوسين تأثير على عماية البلعمة وأدت زيادة التركيز إلى (1000,500) مكغم / مل إلى تنشيط الخلايا البلعمية وزيادة النسبة المئوية للخلايا الملتهمة لخميرة *Candida albicans* .

المقدمة

تعود بكتريا *Lactobacillus acidophilus* إلى بكتريا حامض اللاكتيك متجانسة التخمر المجبرة وتتواجد بشكل عصيات منفردة أو مزدوجة أو سلاسل قصيرة . وتعد من الفلورا الطبيعية للقناة الهضمية للإنسان والحيوان وتعيش كذلك في المهبل والفم (Jawetz *et al* ., 1995)وتستخدم هذه البكتريا في صناعة الحليب الاسيدوفيلي (Acidophilus milk) والذي له دور في معالجة الاضطرابات المعوية للإنسان (Salminen and Deighton). وان فعالية ضد مايكروبية متأتية من إنتاجها لحامض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين والمواد المضادة المعروفة بالبكتريوسينات (Bacteriocins) والأخيرة مركبات بروتينية ضد مايكروبية تنتج من قبل مختلف أنواع البكتريا وتثبط الأنواع الأخرى المتقاربة وغير المتقاربة . وهي نواتج لافرازات خلوية (Klaenhammer ,1988.Rammelsber *et al* ,1990)

وتعود البكتريوسينات المنتجة من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* إلى المجموعة الثانية والمجموعة الثالثة حسب التصنيف الذي وضعه Klaenhammer (1998) فهي إما أن تكون ببتيدات ثابتة بالحرارة وصغيرة الحجم يبلغ وزنها الجزيئي اقل من ١٠ الآلاف دالتن أو تكون كبيرة الحجم ومثالها Lactacin A,B. وتعد بكتريوسينات المجموعة الثانية من أهم البكتريوسينات المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك لأهميتها التكنولوجية واستعمالها كمضافات ضد مايكروبية بدلا من استخدام المضادات الحياتية في الغذاء (Ennahar *et al*,1999) أما فيما يتعلق بمكونات الجدار الخلوي لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* فقد

وجد إن لهذه المكونات ولاسيما الببتيدوكلايكان الموجودة في جدار هذه البكتريا القدرة على تحفيز عملية البلعمة من قبل خلايا الخلب البلعمية للفئران (DeAmbrosini *et al* ,1996).

وقد اقترح Perdigon *et al* (1996) استخدام بكتريا *Lactobacillus* spp. كمعدلات مناعية Immunomodulators في منع الإصابات المعوية وعلاجها حيث لا حضوا بأن إطعام الحيوانات المختبرية بكتريا *Lactobacillus acidophilus* يزيد من إنتاج الأجسام المضادة نوع IgA مقارنة بالسيطرة خلال فترة الإطعام .

ونظرا لأهمية هذا النوع البكتيري فقد أجري هذا البحث للتعرف على تأثير البكتريوسين الخام المنتج على خلايا الخميرة المقتولة في الزجاج .

المواد وطرائق العمل

- المزارع البكتيرية :-

استخدمت عزلة محلية من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* منتجة للبكتريوسين تم عزلها مسبقا اختبرت إنتاجيتها للبكتريوسين اعتمادا على طريقة الانتشار بالحفر (Vignolo *et al* .,1993) مع عزلة *Escherichia coli* كعزلة دالة على أساس حساسية هذه العزلة للبكتريوسين المنتج مع ثبات هذه الصفة بتكرار الاختبارات . نميت هذه العزلة المنتجة في وسط Modified Man –Rogosa Sharpe (MRS) السائل .

- استخلاص البكتريوسين الخام من عزلة **Lactobacillus acidophilus** المنتجة :-

استخدمت طريقة (Kanatani *et al* .,) وكالاتي :

١- نميت العزلة المنتجة في أنبوبة اختبار حاوية على (10) مل من الوسط الزرع MRS السائل بحرارة (37^{o}) م لمدة (24)ساعة .

٢- بانتهاء فترة الحضن نقلت المزرعة السائلة من الأنبوبة السابقة إلى دورق حاوي على (250) مل من الوسط الزرعي MRS السائل ذو pH مساوي لـ ٦٠,٥ وحضنت بحرارة (37^{o}) م لمدة (48)ساعة.

٣- بانتهاء فترة الحضن نبذ المزروع مركزيا بالمنبذ المبرد بحرارة (4^{o}) م بسرعة (3000) دورة \ دقيقة لمدة (10) دقائق .جمع الراشح وضبط الـ pH إلى (7) باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (١ع) المعقم.

٤- تم التأكد من عقمة (sterility) الراشح أو البكتريوسين الخام حيث استخدمت لهذا الغرض المرشحات الدقيقة (Milipore filters) ذات فتحات 0.22 مايكروميتر. وبعدها نقل (0.1)مل من الراشح المعقم وزرع في أطباق حاوية على وسط MRS -Agar ووسط Nutrient Agar وحضن الراشح بحرارة (37^{o}) م لمدة (24-48) ساعة للتأكد من خلو البكتريوسين الخام من الملوثات .

تقدير كمية البروتين في المستخلص المحضر

اعتمدت طريقة (١٩٥١) ,Lowery *et al* ., في تقدير تركيز البروتين الكلي في المستخلص المحضر وحضرت تراكيز مختلفة من البكتريوسين الخام بعد استخلاصه.

الوسط الزرعي النسيجي الكامل Tissue culture medium RPMI-1640:-

حضر بإذابة عبوة منه في لتر من الماء المقطر ،ثم أضيف إليه (10%) من مصل العجل الجنيني المثبط بالحرارة (56^{o}) م لمدة (30) دقيقة ، وكذلك أضيف (10) مل من محلول المضادات الحياتية الحاوي

على الامبيسلين والستربتومايسين ،ضبط pH الوسط إلى (7.2) باستعمال قطرات من بيكاربونات الصوديوم ، عقم عبر مرشحات دقيقة (0.22) مايكروميتر ثم وزع بأنابيب معقمة محكمة السد ،وحفظ بدرجة حرارة (4 ^{o} م) إلى حين الاستعمال .

عزل الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNS) من الدم :-

عزلت خلايا (PMNS) تبعا لطريقة (Cech& Lehrer , 1984) وكالاتي :-

- سحب الدم من متبرعين أصحاء ووضع في أنبوبة اختبار بلاستيكية معقمة حاوية على الهيبارين كمانع لتخثر الدم ،ومحلول الدكستران (6%) لترسيب كريات الدم الحمر بنسبة (3) مل لكل (10) مل من الدم ،بعدها مزجت محتويات الأنبوبة بلطف ووضعت في الحاضنة بحرارة (37 ^{o}) م لمدة (45) دقيقة .
- لوحظ تكون طبقين السفلى تحوي كريات الدم الحمر(أهملت) . والعليا تحوي البلازما الغنية بخلايا الدم البيض .نقلت إلى أنبوبة أخرى معقمة وغسلت الخلايا بمحلول ها نكس الملحي المتوازن لمرتين بسرعة (1500) دورة /دقيقة لمدة (10) دقائق .
- علقت الخلايا بالوسط النسيجي RPMI-1640 وحسبت أعداد الخلايا اعتمادا على طريقة (Hudson and Hay ,1980) . باستخدام صبغة التريبان الزرقاء (% 0.2) بوساطة شريحة عد خلايا الدم Haemocytometer تحت المجهر الضوئي حيث عدت الخلايا المصبوغة ميتة أما الخلايا التي لم تأخذ الصبغة فهي خلايا حية .

تحضير عالق خميرة الكانديدا *Candida albicans* :-

تم الحصول على خميرة *C. albicans* من مختبر الدراسات العليا قسم علوم الحياة \ كلية العلوم الجامعة المستنصرية. وحضرت وفقا لما ورد في Cech and Lehrer (1984) حيث ضبط عددها إلى (8×10^{7}) خلية \ مل ، وقتلت الخلايا بغلي العالق لمدة ساعة في حمام مائي .

اختبار تأثير البكتريوسين الخام على عيوشية الخلايا متعددة أشكال النوى (PMNS):-

اعتمدت طريقة Nonoyama *et al* , (1979) وفق الخطوات الآتية:-

١. حضر عالق الخلايا البيض متعددة أشكال النوى في وسط RPMI-1640 وبمعدل 8×10^{7} خلية \ مل
٢. حضر البكتريوسين الخام بتراكيز نهائية (1000,500,250,50) مكغم / مل في الوسط RPMI-1640 في أنابيب بلاستيكية معقمة .
٣. أضيف (0.5) مل من عالق الخلايا إلى كل أنبوب حاوي على (0.5) مل من البكتريوسين الخام بالتراكيز المطلوبة (مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج) بالإضافة إلى أنبوبة سيطرة احتوت على(0.5) مل من الوسط RPMI-1640 دون وجود البكتريوسين . ثم وضعت الانابيب في الحاضنة لمدة ساعة واحدة بحرارة (37 ^{o}) م .
٤. بعد انتهاء فترة الحضن حسبت أعداد الخلايا باستعمال صبغة التريبان الزرقاء (% 0.2) لاستخراج النسبة المئوية لعيوشية الخلايا وحسب القانون الأتي :

$$\text{النسبة المئوية لعيوشية الخلايا} = \frac{\text{عدد الخلايا الحية}}{\text{العدد الكلي}} \times 100$$

- كررت التجربة (3) مرات بمعدل مكررين لكل تركيز.

عملية التهام الخميرة المقتولة في الزجاج

اتبعت طريقة (Ceeh and Lehrer (1984 لإجراء اختبار التهام الخميرة من قبل خلايا متعددة أشكال النوى وكالأتي :

١. حضر عالق الخلايا متعددة أشكال النوى بمعدل (2×10^6) خليه / مل .
٢. حضر البكتريوسين الخام بالتراكيز (0, 250, 500, 1000) مكغم /مل في أنابيب بلاستيكية معقمه حسب التركيز المطلوب (مع مراعاة الحجم النهائي لكل أنبوبه) .
٣. أضيف إلى كل أنبوبه (0.25) مل من عالق الخلايا متعددة أشكال النوى و (0.25) مل من عالق الخميرة بنسبة (4:1) على التوالي و (0.25) مل من مصل فصيلة دم AB لإنسان طبيعي .
٤. حضنت الأنابيب بحرارة 37 °م في حمام ماني هزاز بسرعة 10 دوره / دقيقه للفترات الزمنيه (0, 30, 60, 90, 120) دقيقه .
- بانتهاء كل فتره زمنيه حضرت مسحات من كل تركيز على شرائح زجاجية نظيفة , تركت لتجف ثم ثبتت بالكحول المثيلي لمدة 5-10 دقائق وصبغت بصبغة كمزا 20 دقيقه . فحصت بالعدسة الزيتية وعدت 200 خليه لحساب معامل البلعمة وكالأتي :

$$\text{معامل البلعمة} = \frac{\text{عدد الخلايا البلعمية الملتهمه}}{\text{عدد الخلايا الكلي (الملتهمه + غير الملتهمة)}} \times 100$$

- اجري التحليل الإحصائي بأستعمال اختبار T-test واختبار تحليل التباين باتجاه واحد – ANOVA test one way كما أستخدم LSD للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات .

النتائج والمناقشة

بعد أن أستخلص البكتريوسين الخام من العزلة المنتجة حضرت تراكيز مختلفة منه لملاحظة تأثير هذه التراكيز على عيوشية الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى لكي يتسنى اختيار بعض التراكيز فيما بعد لمتابعة دراسة بلعمة الخميرة المقتولة بوجود البكتريوسين الخام .

تمت معاملة الخلايا متعددة أشكال النوى المعزولة من الإنسان بالبكتريوسين الخام الذي أستخلص بالتراكيز (1000,500,250,100,50,0) مكغم / مل ولمدة ساعة واحده , ومن النتائج المبينة في جدول (1) يتضح عدم وجود فروق معنوية بمستوى ($p>.05$) بين التراكيز (250,100,50) مكغم / مل من البكتريوسين إلى انخفاض في العيوشيه لتصل إلى 93.2% وقد وصلت نسبة عيوشية الخلايا في التركيز 1000 مكغم / مل

إلى 89.2% . ولذلك فأن هناك فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة ولكن على الرغم من هذه الفروقات إلا إن النسبة المئوية لعيوشية الخلايا لم تتأثر كثيرا حيث لم تؤدي المعاملة حتى بالتركيز العالي من البكتريوسين إلى موت ملحوظ للخلايا مما يدل على ان البكتريوسين المستخدم قد لا يمتلك سميه للخلايا المناعية , وأكد ذلك Hammond *et al.*,(1987) عندما لاحظوا عدم وجود تأثير للبكتريوسين المستخدم من قبلهم على الخلايا المناعية .

جدول (1) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا البلعمية متعددة النوى باستخدام تراكيز مختلفة من البكتريوسين الخام

تركيز البكتريوسين (مكغم / مل)	النسبة المئوية لعيوشية الخلايا (PMNS) (المعدل ± الانحراف المعياري)
0	a 1.2 ± 95.3
50	a 1.3 ± 95.5
100	a 0.6 ± 95.1
250	a 1.5 ± 94.95
500	a 1.1 ± 93.2
1000	a 0.9 ± 89.2

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية ($p>0.05$)/مقرنة بين المعاملات المختلفة.

ومن خلال ما سبق فقد تم اختيار التراكيز (100,500,250) مكغم /مل لدراسة تأثير البكتريوسين الخام على عملية البلعمة من قبل خلايا (PMNS) . وذكر Riley (1998) أن عمل البكتريوسينات على الخلايا البكتيرية يتم من خلال امتلاك الخلايا لمستقبلات هذه البكتريوسينات ,أما عملها على خلايا حقيقية النواة ومنها الانسان فلا زال قيد البحث ,حيث تختلف أراء الباحثين في ذلك تبعا لأنواع البكتريوسين ومصادر عزله . وقد جاءت دراسة Saito and Watanabe (1979) لتؤكد أن للتركيز المستخدم تأثير على الخلايا حقيقة النواة الطبيعية .

وعلى الرغم من انه لا يوجد مستقبلات على سطوح هذه الخلايا للبكتريوسينات إلا إنها ممكن أن تستخدم المستقبلات الخاصة بالفيروسات و الهرمونات وتستغلها لغرض الانغراز والدخول إلى داخل الخلايا .

تعد خلايا الدم متعددة أشكال النوى(PMNS) polymorph nuclear cells والخلايا وحيدة النواة في الدم والتي تصبح خلايا بلعم كبير بعد دخولها الأنسجة من الوسائل الدفاعية الأولى عند دخول الجراثيم أو حصول التلوث ,ويمكن قياس فاعلية هذه الخلايا ونشاطها من خلال عملية الالتهام وقابليتها على التخلص من الأجسام الغريبة الداخلة للجسم بما يعرف بعملية البلعمة (Paul,1984).

من خلال دراسة تأثير البكتريوسين الخام على عملية بلعمة الخميرة المقتولة في ولفترات زمنية مختلفة بينت نتائج التحليل الإحصائي إن هناك علاقة بين تراكيز البكتريوسين المستعملة والفترات الزمنية المختلفة . حيث نوحظ وكما مبين في الجدول (٢) إن هناك تأثير معنوي على عملية التهام الخميرة مع طول فترة التعرض للبكتريوسين وازدادت معامل البلعمة تدريجيا وبصورة معنوية ($p < 0.05$) بمرور الوقت . فقد ازداد معامل

البلعمة في السيطرة بمرور الوقت وكان هذا المعامل عند الزمن صفر (55.2) ،ثم بدأ بالزيـــادة (75.7 – 77.3
عند الزمن (90) دقيقة حتى بلغ ذروته (82.4) عند زمن (90) دقيقة بعدها بدا بالانخفاض ليصـــل إلـــى (61.5
عند زمن (120) دقيقة .

ومن ذلك يلاحظ إن هناك علاقة وثيقة بين عامل الوقت ومعامل البلعمة وبذلك يمكن الاستنتاج بان كفـــاءة الخلايا للالتهام تزداد بمرور الوقت ، فيما تبدأ بعد الدقيقة (90) بفقدان قدرتها على الالتهـــام .وقـــد بـــرر ذلـــك Loak *et al* ., (١٩٩٠) إلى زيادة تركيز الإنزيمات الحالة والمواد السامة التي تنتج من قبل الخلايا نفسها نتيجة تعرضها إلى ضغط العمل المستمر .كما أوضحت النتائج أيضا عدم وجود تأثير معنوي بمســـتوى ($p > 0.05$) للتركيز (250) مكغم ١ مل مقارنة بمعاملة السيطرة .في حين إن للتركيزين (1000,500) مكغم ١مـــل تـــأثير معنويا بمستوى ($p > 0.05$)، حيث لوحظ من النتائج الموضحة في الجدول (2) إن لزيادة التركيز دورا مهما في ارتفاع معامل البلعمة (PI)مقارنة مع معاملة السيطرة ولكافة الفترات الزمنية المستخدمة .

وتؤكد نتائج الدراسة إن لزيادة تركيز البكتريوسين دورا مهما في زيادة عملية البلعمة من خـــلال تحفيز الخلايا (PMNs) على الالتهام . وان ذلك يزداد بطول فترة التعرض خلال الـــ (90) دقيقة الأولى. وقد أشار Peak man and Vergani (1997) أن للخلايا البلعمية متعددة إشكال النوى القدرة على التهام أكثر من بكتريا (Bacterium) أو فطر (fungus) عند اللحظة الأولى من عملية البلعمة .

ان هناك العديد من التجارب التي أشارت إلى إن بكتريا حامض اللاكتيك أو نواتجها التخمرية تحث على تحفيز وظيفـــة الـــبلاعم (macrophage) فـــي الزجـــاج وداخـــل الجســـم الحـــي ،فقـــد أكـــدت دراســـة Laffineur et al ., (1996) إن راشح مزارع بكتريا *L.casei* و *L.acidophilus* حفـــز وحيـــدة النواة و البلاعم على إنتاج بين ابيضاضي (Interleukin – 12)و ألفا انترفيرون (IFN-α)اللذان يحفزان على إنتاج كاما انترفيرون (IFN -γ) والذي بدوره يؤدي إلى زيادة تعبير مستلمات الجزء المتبلور Fc من الكلوبيولين المناعي على سطح البلاعم .

جدول (2) تأثير البكتريوسين الخام على عملية التهام الخميرة المقتولة (في الزجاج)

تركيز البكتريوسين مكغم ١ مل	معامل البلعمة (PI) (المعدل ± الانحراف المعياري)				
	فترة التعرض للبكتريوسين (دقيقة)				
	0	30	60	90	120
0	0.2 ± 55.2 a	1.2 ± 75.7 a	0.5 ± 77.3 a	1.1 ±82.4 a	1.9 ± 61.5 a
250	1.8 ± 55.3 a	1.6 ± 76.1 a	1.3 ± 77.5 a	1.7 ± 82.6 a	3.1 ± 61.8 a
500	0 .8 ± 55.3 a	0.8 ± 78.6 a	1 ± 80.3 a	1.7 ± 85.4 a	1.2 ± 65.9 a
1000	1.2 ± 63.2 a	0.9 ± 79.2 a	1.3 ± 86.4 a	0.8 ± 87.7 a	[illegible] ± 76.6 a

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على وجود فروق معنوية ($p<0.05$) / مقارنة بين المعاملات المختلفـــة لكل عمود .

Abstracts

The raw bacteriocin was extracted from isolate of *Lactobacillus acidophilus* .Different concentration of bacteriocin were prepared (50,100,250,500,1000) µg /ml ,the effect of bacteriocin was experimented on viability of polymorphonuclear cells (PMNS),the bacteriocin had no toxic effect on these immune cells .

Three concentration (250,500,1000) µg /ml were selected to investigate the effect of raw bacteriocin on phagocytosis .Aconcentration (250) µg /ml had no effect on the phagocytosis ,other concentration (500,1000) µg /ml Stimulated phagocytosis cells through increased percentage of cells that phagocytic *Candida albicans* .

References :

- Cech , and Lehrer ,R.I.(1984).Heterogeneity of Human Neutrophil Phagolysosomes Functional consequence for candidacidal Activity ,Blood ,64:147 – 151 .
- De – Ambrosini , V.M.; Gonzalez ,S. ; Perdigon , G. ;De –Ruiz , A.P.and Oliver ,G.(1996)Chemical composition of the cell wall of Lactic acid bacteria and related species .Chem. Pharm. Bull.Kokyo.,44(12):2263- 7 (Abs)
- Ennahar ,S.;Sonomoto ,K.,and Ishizak ,(1999) .class II a bacterium from lactic acid bacteria :Antibacterial activity and food Preservation .J. Biosic. And Bioengin., 87:705- 716.
- Hammond ,B.F.Lillard, S.E. and Stevens ,RH.(1987). A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* .Inf. and Imm.55 :686-691 .
- Hudson ,L. and Hay,F.C.(1980) Practical Immunology .2nd ed. Black well Scient.Public .
- Jawetz ,E.,Meliniek, L. ; Adelberg, E.A.,Brook,G.F. ;Butel ;J.S. and Ornston,L.N.(1995).Medical Microbiology ,20 nded.Appleton and Lang,Norwalk,Connecticut.
- Kanatani ,K.;Oshimura ,M. and Sano,K.(1995).Isolation and Characterization of Acidocin A and Cloning of the Bacteriocin Gene from *Lactobacillus acidophilus* . Appl. Environ. Microbiol., 61(3): 1061-1067 .
- Klaenhammer , T. R. (1988). Bacteriocin of lactic acid bacteria . Biochimie., 70: 337-3439.
- Klaenhammer , T. R. (1993).Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria . FEMS Micobiol. Rev. , 12:39-86.
- Laffineur. E. ;Genetet, N. and Leonil, J. (1996) .Immunomodulatory Activity of β-Casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria , J . Diary Sci., 79: 2112-2120 .
- Lowry , O. H.; Rosebrough , N. J.; Farr, A. L. and Randal, R. J. (1951). Protien Measurement with the folin phenol Reagent . J. Biol. Chemical., 193:265-275.
- Nonoyama , S.; Kajo, H.; Mine, Y.; Nishida , M; Goto, S. and Kuwahara , S. (1979). Inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing of Rabbit polymorphonuclear leukocytes ; Mechansm of action of a polymorphonuclear leukocytes Inhibitor . Infect. Immun., 24: 399-403.
- Paul, W. E. (1984). Fundamentals of Immunology . Raven Press New york .
- Peak man , M. and Vergani, D. (1997). Basic and Clinical Immunology 1sted . Churchill Livingstone . New York .

- Perdgon , G. ; Medici, M; ; Bibas, M.E.; Valverde, M. and Pesce , A. (1993). Immunomdulating effect of lactic acid bacteria mucosal and tumoral immunity . Int . J. Immunotherapy , IX (1): 29-52.
- Rammelsberg , M.; Muller, E. and Radler, E. (1990). Caseicin 80: Purification and charachteization of a new bacteriocin from *lactobacillus casei* .Aech. Microbiol.,154:249-252.
- Riley , M. (1998). Molecular Mechanism of bacteriocin Evolution Annual . Rev. Genet. , 32:255-278.
- Saito, H. and Watanabe , T. (1979). Effect of a bacteriocin produced by *Mycobacterium smegmatis* on growth of cultured tumor and normal cell. Cancer Res., 39:5114-7.
- Salminen , S. and Deighton , M. (1992). Lactic acid bacteria in the gut in normal and disordered states. Dig. Dis., 10:227-238.
- Vignolo, G. M.; Suriani, F., Halgado, A.P.R. and Oliver , G. (1993).Antibacterial activity of *Lactobacillus* strain isolated from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol, 75:344-349.