التحري عن النشاط التضادي لبكتريا *Bacillus subtilus* في نمو بعض الأحياء المجهرية المرضية

أ.م.د. مهدي العمار م.د. فاطمة عبد الحسين مجبل
م.د. ميادة فرحان

كلية العلوم، جامعة الكوفة

الخلاصة:

تضمنت الدراسة الكشف والتحري عن قابلية بكتريا *Bacillus subtilus* على انتاج مركبات ايضية ثانوية **(**المضادات الحيوية**)** واختبار فعاليتها في تثبيط نمو عدد من الاحياء المجهرية المرضية المتمثلة بالبكتريا (*Klebsiella pneumonia , Escherichia coli , Pseudomonase aerogenosa , Stapheyllococcus aureus*) والفطريات والخمائر (*Aspergillus flavns, Aspergillus niger , Candida albicans, Cryptococcus neoformans*).

كذلك تم استخدام تراكيز مختلفة من الرائق البكتيري في الدراسة التضادية تجاة الاحياء المجهرية المرضية وان الفعالية التضادية تزداد تدريجيا لتصل اقصاها عند التركيز 100 ملغم / مل الذي يمتلك القدرة على تثبيط كافة أنواع الأحياء المجهرية قيد الدراسة بأقطار تثبيطية تراوحت مابين (0.9-20) ملم بالنسبة البكتريا ، أما الفطريات والخمائر فقد تراوحت أقطار التثبيط مابين (30.2- 18.6) ملم.

Abstract:

The study concluded the discovery and investigation of the ability of bacteria bacillus subtilus to produce the secondary metabolism (antibiotic) and to consider its activity in dampening the growth of pathogenic microorganism which is represented by (*Klebsiella pneumonia , Escherichia coli , Pseudomonas aerogenosa* , and *Staphellococcus aureus)* and fungi, yeast e.g. (*Candida albicansg, Cryptococcus neoformans*).

We also used different consentration from CFU in the contrastive study . The activity increased to reach its maximum at the concentration 100 mg/ ml which has the ability to dampen all types of bacteria by diameters dampening which ranged from (0.9-20) mm , while the fungi and yest diameter damping which ranged from (18.6-30.2) mm. And also the value of MIC and MBC was specified.

المقدمة:

تتميز الأحياء المجهرية وموادها المثبطة الفعالة بالعديد من التأثيرات المفيدة في علاج العديد من الأصابات البكتيرية والفطرية، أذ تلعب دوراً مهماً في تثبيط نمو البكتريا من خلال قدرتها على منع نمو وألتصاق الأحياء المجهرية المرضية بالأغشية ، فضلاً عن أنتاجها العديد من المضادات التي تبدي تأثيرات علاجية ووقائية أضافة الى دورها في تحفيز الأستجابة المناعية للجسم في معالجة حالات مرضية عديدة (1).

وتميزت البكتريا بإفرازها مضادات حيوية ببتيدية وإنزيمات خارج خلوية extracellular enzymes جعلها مؤهلة لتستخدم في علاج الإصابات الجرثومية (2) كما ان لها دور في الاستجابة المناعية والقدرة على تنشيط الخلايا البلعمية ، داخل الجسم الحي كما تلعب دوراً في زيادة الاستجابة المناعية غير المتخصصة في الدورة الدموية للخلايا الحبيبية مما يؤدي إلى تعزيز دور IgA في الأطفال المصابين بالفايروس (3).

تمتاز البكتريا بامتلاكها الطبقة الحيوية biofilm بسبب كثافة أعداد الخلايا البكتيرية المنقسمة التي يمكن بواسطتها إن توفر الحماية لبطانة الامعاء لقدرتها على الالتصاق على بطانة الامعاء والتنافس مع البكتريا المرضية وإنتاج مواد ذات تأثير قاتل ، كما تملك القدرة على تقوية الجهاز المناعي لمقاومة البكتريا المعوية المرضية(4).

كما انها بسبب إفرازها لهذه المضادات الحيوية تؤثر وبصورة فعالة في السيطرة على نمو الفطريات والخمائر حيث ان البكتريا تنتج المضاد الحيوي *Bacillomycin* والذي يعتبر العامل الاساسي في السيطرة على نمو الفطريات وبالتالي السيطرة على انتاج السموم أي (5) وايضا اختبرت مدة المضاد الحيوي Iturin A وهو بروتين دهني له القدرة على كبح نمو الفطر *Aspergillus Parasiticus* وقدرته على تثبيط انتاج الافلاتو كسينات عند استعماله 50 جزء بالمليون كما ان بكتريا *Bacillus Subtilus* تستطيع انتاج المضاد الحيوي Bacillomysin والذي يتميز بفعالية العالية ضد الكثير من الفطريات والخمائر مثل *Aspergillus* و *Saccharomyces cerevisiae* (6).

وتهدف الدراسة عزل وتشخيص الفطريات والخمائر والبكتريا المرضية، الكشف والتحري عن قدرة الراشح البكتيري *B . subtilus* في تثبيط نمو بعض الكائنات الدقيقة التي تتضمن البكتريا والفطريات والخمائر قيد الدراسة. مع فصل وتنقية الرائق البكتيري Cell free supernatant (CFS) الحاوي على المضادات الحيوية واختبار فعاليتها التضادية تجاه الكائنات الدقيقة المرضية.

المواد وطرق العمل:

- تحضير الاوساط الزرعية:

اولا: الاوساط الزرعية الخاصة بالبكتريا:

حضرت الاوساط الزرعية بحسب تعليمات الشركة المنتجة لها والمبينة على العبوات وضبط الأس الهيدروجيني الى(7.2) ثم عقمت بجهاز الموصدة Autoclave في درجة حرارة (121) م° ولمدة (15) دقيقة وبضغط (15) باوند /انج². حضنت الاوساط الزرعية بدرجة حرارة (37) م° ولمدة (24) ساعة للتاكد من عدم تلوثها ، ثم حفظت بدرجة حرارة (4) م° لحين الاستعمال.

ثانيا: الاوساط الزرعية الخاصة بتنمية الفطريات والخمائر

1- وسط اكار السابرويد Sabouroud agar حضر هذا الوسط حسب ما ذكره (7).

2- وسط PDA Potato dextrose agar حضر هذا الوسط حسب ما ذكره (8).

3- وسط تمثيل السكريات الصلب Sugar assimilation agar حضر حسب ما ذكره (7).

4- وسط مرق السكريات Sugar broth حضر حسب ما ذكره (9).

- جمع وتشخيص العينات:

أولا: العينات البكتيريا: جمعت البكتريا *B . subtilus* من عينات التربة حسب طريقة(10).

اما عزلات البكتريا المرضية فقد شخصت اعتمادا" على ماورد في (11).

تحديد الجين بواسطة PCR (12).

ثانيا: تشخيص الفطريات والخمائر

1- الفحص المجهري المباشرة باضافة (KOH 15%).

2- الفحوصات الكيوحيوية

أ) Sugar assimilation test (13).

ب) Urease test (14).

ج- Sugar fermentation test (13).

د- Germ tub test (15).

- تحضير الراشح البكتيري : حضر راشح المزرعة السائلة لتنمية عزلات بكتريا *Bacillus subtilus* في أنابيب اختبار حاوية على وسط المرق المغذي السائل ذو أس هيدروجيني (6) ثم حضنت الأنابيب بحرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة و تحت الظروف الهوائية ، بعدها عرضت للطرد المركزي 6000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق للحصول على سائل الخلايا الحرة للمزروع ثم رشح السائل من خلال مرشحات Millipore بقطر (0.22) مايكروميتر (16) **.**

- فحص الحساسية الدوائية بطريقة الانتشار من الاقراص : تم اجراء فحص الحساسية الدوائية حسب طريقة (17)**.**

- الفعالية التثبيطية لراشح بكتيريا *B . subtilus* في نمو بكتريا الاختبار.

1- تقدير الفعالية التثبيطية في الوسط الصلب:

أستخدمت طريقة الأنتشار في الاقراص Disc diffusion method التي وضعها (18) للكشف عن الفعالية التثبيطية للراشح البكتيري) إذا زرعت الأطباق الحاوية على وسط الأكار المغذي و ذلك بنشر (0.1) مليلتر من لقاح عزلات بكتريا الدراسة بأستخدام الناشر الزجاجي المعقم ، وأستعمل ثاقب الفلين لعمل ثقوب قطرها (5) مليمتر على سطح الوسط ، ثم ملئت كل حفرة بـ 50 مايكروميتر من رواشح المزرعة السائلة والمتمثلة بـ (الراشح المركز بكبريتات الأمونيوم المشبعة ، راشح بكتريا الوسط الصلب) لبكتريا *B . subtilus* ، حضنت بعدها الأطباق بحرارة 37 مْ لمدة (18-24) ساعة . بعدها تم قياس مناطق التثبيط حول الحفر و قورنت مع السيطرة الحاوي على الوسط السائل دون لقاح بكتيري (16).

اختبار الكفاءة التثبيطية لبكتريا *Bacillus subtilus* في نمو الفطريات والخمائر:

بعد التأكد من العزلة، تم تنقيتها بشكل مستعمرات منفردة ومن ثم عملت Slant من وسط Nutrient agar وحفظها في الثلاجة و تم إكثار العزلة بوسط سائل Nutrient broth وتم تحضين الوسط الذي حضر بواقع 100 مل وسط زرعي مضافا إليه مادة Glycerol بواقع% 10-7 لاستعماله في الاختبارات اللاحقة بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة، تم زرع العزلات الفطرية المشخصة على وسط PDA لمدة 3-7 ايام، بعد ذلك تم تحضير وسط PDA وتم مزجه مع الراشح البكتيري لبكتريا *Bacillus Subtilus* بتركيز (5،10،15،20) مل وبمعدل 3 مكررات لكل تركيز وبعد تصلب الوسط الغذائي وضع في مركز الطبق اللقاح الفطري من الفطريات قيد الدراسة وكان اللقاح عبارة عن قرص يقطر 5 ملم مقطوعة من مستعمره كل من الفطريات *Aspergillus flavns Aspergillus niger* اما بالنسبة الى الخمائر *Candida albicans Cryptococcus neoformans* ثم اخذ من 2-3 مستعمرات ووضع اللقاح للفطريات والخمائر في حضرة مصنوعة في الوسط الزراعي اما بالنسبة الى السيطرة تتضمن طبق حادي على الوسط الزراعي بدون اضافة أي تركيز من الراشح البكتيري ومزروع بالفطريات والخمائر المذكورة. بعدها حضنت الأطباق بدرجة 30 مْ لمدة من 3-7 ايام وتم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل 3 أقطار) وسجلت النتائج في جدول (19).

النتائج والمناقشة

1- العزل والتشخيص

أ- تشخيص الفطريات والخمائر:

شخصت عزلات الفطريات والخمائر بالاعتماد على الفحص المجهري المباشر للعينات الجلدية والزرع على االاوساط الزرعية الخاصة بالفطريات والخمائر والفحص المجهري لجزء المستعمرات النامية فضلا عن

الفحصوات الكيوحيوية واعتمد التشخيص على (20)(21).

جدول (1) يبين الصفات التشخيصية لمستعمرات الفطريات والخمائر

اسم الفطر	النمو على وسط Sabouroud agar	الصفات الشخصية
Aspergillus niger	+	النمو سريع بعد مرور 48 ساعة فصل المستعمرات ذات لون ابيض سرعان ما يتحول الى اللون الاسود
Aspergillus flavus	+	مستعمرات صفراء قطنية
Candida albicans	+	ظهرت المستعمرات خلال مدة 48 ساعة المستعمرات تشبه البكتريا البكتريا لكنها اكبر حجما ودائرية الشكل.
Cryptococcus neoformans	+	مستعمرات دائرية ملساء ذات لون كريمي الى اصفر.

يبين جدول (1) الصفات التشخيصية للفطريات المعزولة في القشور والاظافر والشعر حيث ان مستعمرات الفطر *Aspergillus niger* اظهرت نمو سريع على وسط Sabouroud agar بعد مرور 48 ساعة وكانت المستعمرات ذات لون ابيض يتحول الى لون الوسط بينما مستعمرات الفطر *Aspergillus flavus* صفراء قطنية القوام بعد فترة تحولت الى اللون الاصفر المخضر ويعود ذلك لامتلاك انواع هذا الجنس القابلية الانزيمية العالية التي تمكنه من استغلال مختلف مصادر المواد الغذائية وتحمله مختلف الظروف البيئية (5) اما بالنسبة الى الخمائر فكانت مستعمرات المبيضات البيضاء *Candida albicans* مستعمراتها تشبه البكتريا لكنها اكبر حجما وذات لون ابيض مائل الى الكريمي اما خميرة *Cryptococcus neoformans* تحت مستعمراتها خلال 72 ساعة وكانت مستعمرات ملساء ذات لون كريمي الى اصفر شاحب. وتعتبر هذه الصفات صفات تشخيصية تفريقية يعتمد عليها في تشخيص الخمائر(7).

اما الجدول (2) يبين الاختيارات الكيموحيوية التي استعملت لتشخيص المبيضات البيضاء *Candida albicans* والمكورات الخبيئة *Cryptococcus neoformans* حيث ان *Candida albicans* اعطت نتيجة موجبة من فحص تكوين انبوب الانبات germ tub test ويعتبر صفة تشخيصية تفريقية بين انواع الخمائر. اما خميرة المكورات الخبيئة *Cryptococcus neoformans* اعطت نتيجة سالبة في نفس الاختبار اما فحص تحلل اليوريا كانت النتيجة عكسية بالنسبة الى الاختبار الاول مما يدل على قدرة هذه الخميرة على افراز انزيم urease. في اختبار تخمر السكريات وتمثيل السكريات تمكنت خميرة *Candida albicans* تخمر كل من الكلوكوز والكالكتوز والمالتوز كما استطاعت تمثيل سكر كلوكوز وسكروز فالكتوز ومالتوز. اما خميرة *Cryptococcus neoformans* تمكنت من تخمر سكر فلوكوز، فالكتوز اسكروز ومالتوز وتمثيل سكر كلوكوز وكالكتوز يدل على قدرة الخمائر عى امتلاك انزيمات تعمل على تخمر السكريات والاستفادة منها.

جدول (2) يبين بعض الفحوصات الكيموحيوية التشخيصية للخمائر

اسم الفطر	Germ tub	Urease test	Sugar fermentation test	Sugar assimilation agar
Candida albicans	+	-	كلوكوز + كالكتوز + الماتوز +	كلوكوز + سكروز + مالتوز +
Cryptococcus neoformans	-	+	كلوكوز - كالكتوز - سكروز - مالتوز -	كلوكوز + كالكتوز +

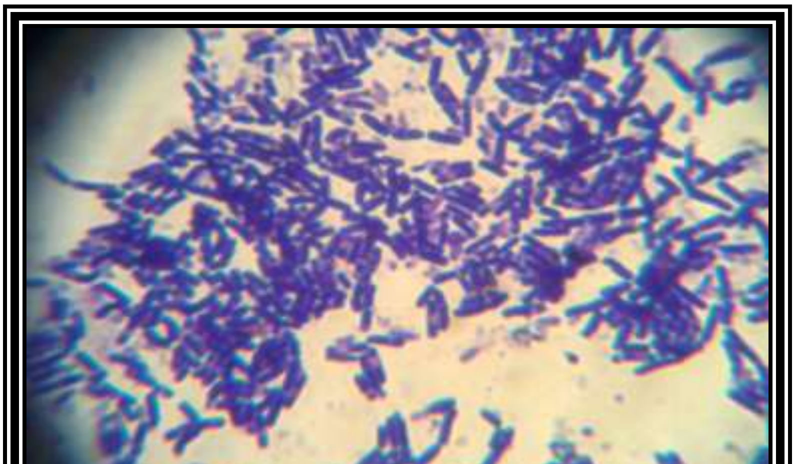
اختبار الكفاءة التثبيطية لبكتريا *Bacillus subtilus* في نمو الفطريات والخمائر:

أما جدول (3) يبين معدلات اقطار التثبيط لكل من الفطريات والخمائر. نلاحظ في الجدول ان معدلات اقطار التثبيط تزداد كلما ازداد تركيز الراشح البكتيري. في الفطرين *Aspergillus flavus* و*Aspergillus niger* بلغت اقطار التثبيط عند التركيز (5) مل (17.2،22.4) ملم وعلى التوالي بينما ازدادت معادلات اقطار التثبيط عند التركيز (20) مل لتصبح (28.2-21.6) ملم على التوالي اما النسبة الى الخمائر فكانت معدلات اقطار التثبيط في خميرة الـ*Candida albicans* (18.6) ملم في التركيز (5) مل اما في التركيز (20) مل فكان معدل اقطار التثبيط (24.2) ملم اما خميرة المكورات الخبيئة *Cryptococcus neoformans* كان معدل اقطار التثبيط في التركيز (5) مل (22.2) ملم اما في التركيز (20) مل فكان معدلات اقطار التثبيط (30.2) ملم في هذه النتائج يتضح لنا ان البكتريا *Bacillus Subtilus* تمتلك تاثيرا مضادا للفطريات والخمائر قيد الدراسة من خلال تاثيرها على الانزيمات والبروتينات الناقلة الموجودة في غشاء الخلية حيث تعمل على تثبيطها اضافة الى ذلك تعمل البكتريا على تثبيط الفعاليات الايضية المهمة التي تقوم بها تلك الانزيمات مثل النمو والتكاثر وتصنيع البروتينات المختلفة (22) ايضا تستطيع البكتريا في انتاج مركبات ايضية ذات اثر مثبط لتجرثم الفطر او اثبات الجراثيم في الفطريات والخمائر لذلك تستخدم هذه البكتريا في السيطرة الحيوية على بعض الامراض الفطرية من خلال قدرة بكتريا *Bacillus* على افراز مركبات مختلفة تسهم في كبح المسببات المرضية ومنها الانزيمات المحللة مثل protease وchitinase وGlucanase التي تعمل على تحليل جدر الهايفات الفطرية مما يؤدي الى قتل الفطريات، فضلا عن انتاجها انزيم cellulose القادر على تحطيم مادة السليلوز المتواجدة بكثرة في جدران هايفات الفطريات البيضية (23) (24).

جدول (3) يبين تاثير راشح البكتريا *Bacillus Subtilis* في نمو الفطريات والخمائر

التركيز/ مل	معدل اقطار التثبيط (ملم)			
	Cryptococcus neoformans	*Candida albicans*	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus niger*
5	22.2+1.02	18.6+0.59	22.4+1.12	17.2+0.58
10	24.4+0.98	20.6+0.4	23.8+1.53	19.2+0.49
15	26.6+0.75	22.4+0.51	25.2+1.24	19.4+0.93
20	30.2+0.66	24.2+0.6	28.2+0.8	21.6+0.03

ب- عزل وتشخيص البكتريا:
من خلال الفحوصات المختبرية لنمو البكتريا *B.subtilis* على وسط الاكر المغذي N.A ظهرت مستعمراتها بشكل دائري وكبيرة نسبيا ملساء ذات حافة مستديرة سرعان ما تتحول الى حافة مفصصة بتقادم النمو ولونها ابيض الى تبني باهت وتميل الى اللون التبني الأدكن بتقادم النمو وتراوح قطر المستعمرة بين 1.5-3.5 ملم ، وهذا يتطابق مع ما جاء به (10).
أظهرت نتائج الفحص ألمجهري للشرائح المثبتة والمصبوغة بصبغة كرام لمستعمرة بكتريا *B.subtilis* أنها بكتريا عصوية قصيرة نسبيا موجبة لصبغة كرام ومكونة للسبورات وتتكون هذه السبورات بشكل واضح بعد مدة تحضين 24 ساعة وتكون وسط الخلايا الخضرية للبكتريا وعند استمرار النمو لفترة 48 ساعة تتحلل معظم الخلايا البكتيرية وتتحرر السبورات وتبقى أعداد قليلة من الخلايا الخضرية كما مبين في الصورة (1) (25)(10).



صورة (1) خلايا بكتريا *B.subtilis* كما تبدو تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير X100بعد تحضين 24 ساعة بدرجة 37 مْ

الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا:

بينت نتائج الاختبارات الكيموحيوية لهذه العزلة (جدول4) أنها عائدة للنوع *B.subtilis* ، وهذا ينطبق مع ما جاء به (11) .

جدول (4) الفحوصات الكيموحيوية والتشخيصية ا لبكتريا *Bacillus subtilus*

	الاختبارات	النتيجة
-1	Catalase	+
-2	Oxidase	+
-3	Hemolysis	ά hemolysis
-4	Lecithinase	+
-5	Spore location	Central
-6	Spore shape	Ellipsoidal
-7	Arabinose	+
-8	Xylose	+
-9	Sucrose	+
-10	Fructose	+
-11	Mannitol	+
- 12	Raffinose	—
-13	Glucose	+
-14	Rhamnose	—
-15	Galactose	+
-16	Ribose	+
-17	Lactose	—
-18	Motility	+
-19	Citrate utilization	+

وايضا تم إجراء الاختبارات التاكدية على البكتريا المرضية وفقا للنتائج (10) والموضحة في الجدول (5).

جدول (5) الاختبارات التشخيصية التأكدية للبكتريا المرضية

Staphylococcus araus	*Pseudomonas aeruginosa*	*E.coli*	
+	-	-	Gram stain
+	-	-	Coagulase
-	+	-	Oxidase
-	-	+	Indol
-	-	+	Methylred
-	-	-	Vagos prosukur
-	+	-	Simmon citrate
AA	AA	AA⁻	KFA
+	+	+	Catalase
+	-	-	Urease
-	+	+	H2S
+	+	+	Gelatin
+	+	-	Lactose
+	+	-	Mannitole

اختبار كفاءة بكتريا *B. subtilus* في تثبيط نمو بعض البكتريا المرضية

- طريقة اقراص الاكار

أوضحت الدراسة قدرة بكتريا *B. subtilus* والمنماة في وسط Nutrient broth وB.H.I.B في تثبيط نمو كل من *Staph. aureus* , *E.coli* , *Pseu. Aerogenosa* حيث بلغ معدل اقطار مناطق التثبيط(16،18،20)ملم، (0.9،11.1،19) على التوالي .

كما وتبين من النتائج وجود زيادة معنوية $P< 0.00$ في معدل اقطار التثبيط للوسط الزرعي Nutrient broth وB.H.I.B ، وقد يعود ذلك الى خاصية هذة البكتريا على انتاج مضادات حيوية والتي لها دور فعال في تثبيط نمو عدد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام وهذا يتماشى مع ما توصل الية اليه الباحث (6) عن كون البكتريا تملك قدرة عالية على انتاج لبعض التضاد المايكروبي وانتاج المضادات الحيوية في الوسط الزرعي وهذه النتائج تتفق مع ما أشار الية (26) ان سبب فقدان قسم من القابلية التضادية يعود الى تركيز البكتريا المنتجة في الوسط حيث ان تركيز البكتريا يزداد في الاوساط السائلة مقارنة بالاوساط الصلبة لكونه يتيح للبكتريا حرية الانقسام ولعدم التصاق الخلايا فيما بينها فضلا" عن الحصول على O_2 بشكل جيد.

جدول (6) معدل اقطار التثبيط للبكتريا *B. subtilus* المنماة في وسط .B.H.I , Nutrient broth **بطريقة الاقراص**

BACTERIA	A.	B.	L.S.D.
Staph . aureus	20± 46.000	19 ± 30.000	1.121
E.coli	18 ± 30.000	11.1 ± 25.66	0.940
Psedu.aerogenosa	16 ± 14.820	0.9 ± 21.55	0.760

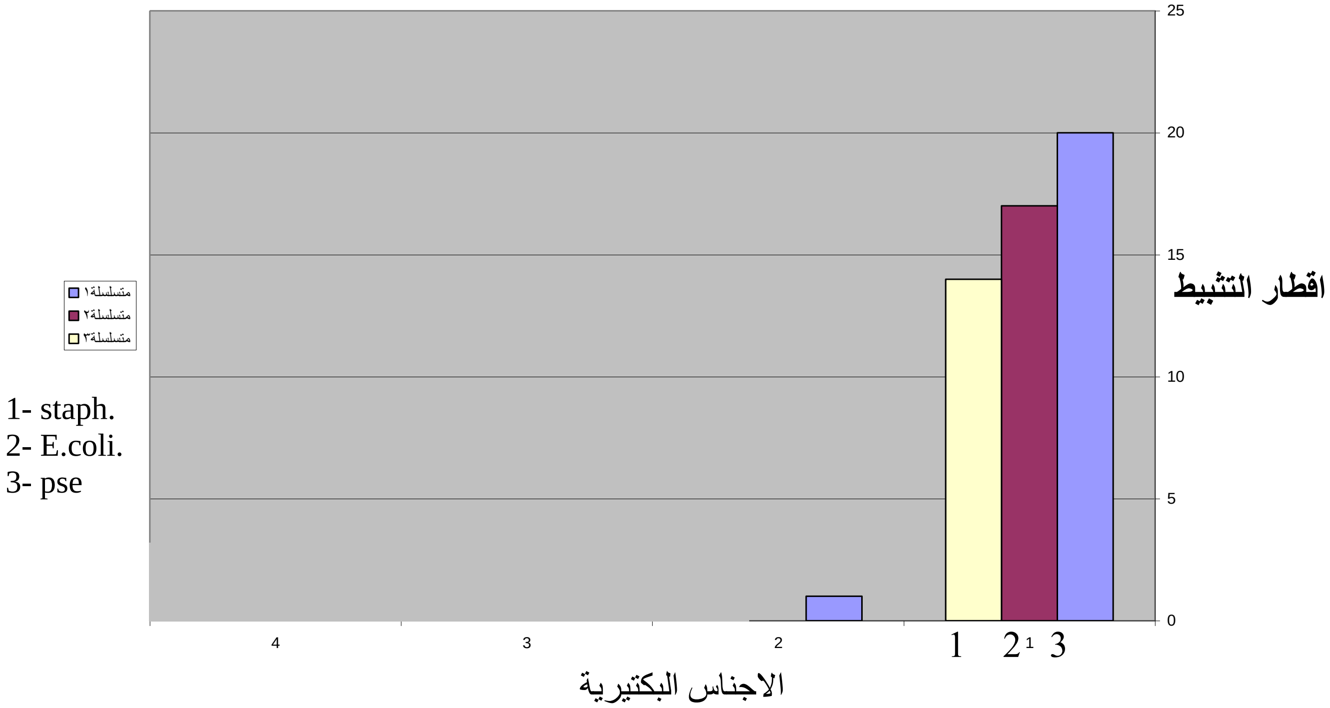
A معدل قطر التثبيط للبكتريا المرضية المعاملة بأقراص ***B. subtilus*** المنماة في وسط Nutrient broth

B معدل قطر التثبيط للبكتريا المرضية المعاملة بأقراص ***B. subtilus*** المنماة في وسط ..B.H.I

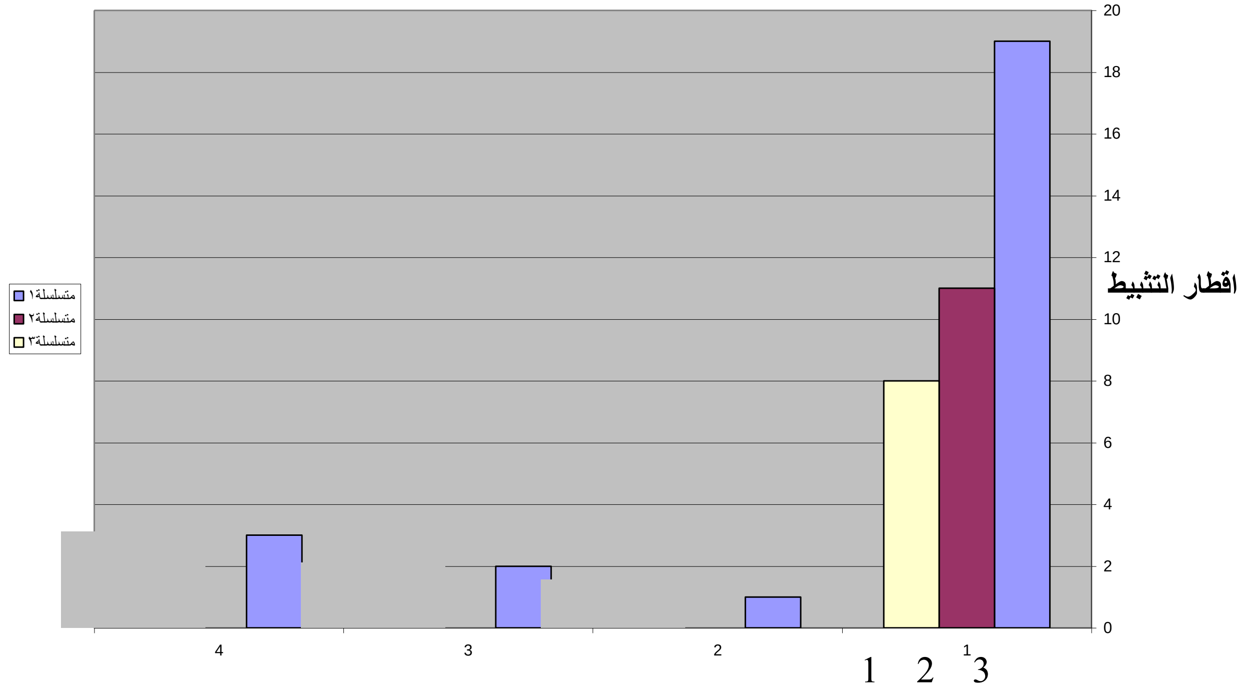
.L.S.D اقل فرق معنوي بين A,B عند مستوى معنوية P < o.o5

* وجود فرق معنوي بين A,B ..B.H.I

كذلك لوحظ من خلال الدراسة ان هناك تباين واضح تحت مستوى احتمالية P < o.o1 وسط الاكار المغذي و وهذا يعني ان للاوساط الزرعية اهمية واضحة في زيادة انتاجية المضادات الحيوية.



شكل (2) معدل قطر التثبيط (ملم) للبكتريا المرضية المعاملة بالبكتريا B. subtilus والمنماة في وسط Nutrent broth بطريقة الاقراص .



شكل (3) معدلات اقطار التثبيط (ملم) للبكتريا المرضية المعاملة بالبكتريا B. subtilus والمنماة في وسط B.H.I. بطريقة الاقراص.

المصادر:

1- Wright,A.;Vilpponen-Salmesla,T; Liopis,Mp.; Kiely, B. and Dunne. (2002). The survival of pathogenic bacteria in patient, colitis. Intern, Dairg. J. ,12:197 – 200.

2- Prescott, L.M. (2002). Introduction to all major areas of microbiology. Amazon co. uk. The sixth edition, pp. 410.

3- Baron ,J.M. ; Schepper , L.D. ; Domingue , G. ;Everett , B.; Hughes , H. and Wunderlich , K. R.(2006) : Friendly bacteria . The Arthritis Trust of America. ,pp.2-8 .

4- Bais , H.P. ; Fall, R. and Vivanco, J.M.(2004) . Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of Arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by Biofilm formation and Surfactin production .Plant physiology .vol.134.pp:307-319.

5- Moyne , A.L.; Shellby ; Cleveland , T.E. and Tuzun , S.(2001). Bacillomycin D: an Iturin with antifungal activity against Aspergillus flavus . Jour. Appl. Microbiology . 90:622-629.

6- Tamehiro , N. ; Okamoto-Hosoya , Y. ; Okamoto , S. ; Ubukata , M. ; Hamada , M. ; Naganawa , H. and Ochi ,K.(2002). Bacilysocin ,anovel phospholipid antibiotic produced by Bacillus subtilis 168 .antimicrob agents chemother. 46:315-320.

7- McGinnis, M.R. (1980). Laboratory handbook of medical mycology. Academic press NewYork. USA. pp:661.

8- العـاملي، زينـة طـارق عبـد الوهـاب. (2001). عـزل تشـخيص بعـض الفطريـات المسـببة للاصـابات الجلديـة فـي الحيوانـات والعـاملين عليهـا ومعالجتهـا باسـتخدام مستخلصـات الحبـة السـوداء والثـوم. رسـالة ماجستير/ كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

9- الاسدي، الاء كاظم، 1998، دراسة التاثير الاثبـاطي لجراثيم العصـيات اللبنيـة فـي خميـرة المبيضـات *Candida albicans* رسـالة ماجستير، كلية الطب البيطري- جامعة بغداد.

10- Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmon, A. (1996) Mackie and McCartney medical microbiology. 14th ed ., The Churchill livingstone. Inc. USA.

11- Holt , J.G. ; Kriegean , N.R.; Sneather , P.H. ;Staleyley , J.T. and Williamsers ,S.T. (1994) : Bergeś manuals of determination bacterio-logy .9th ed. , Williamś and Wilks Baltimor,USA.

12- Chagnoud, P. machinis, k,coutte, L.A marecat A. and mercenier A(2001). Rabrd pcr and asedproccdure tidndentifiy lactic acid bacteria aplication to six comman *lactobacills s.p* J. micrbiol. Method. 44:139-148.

13- AL-thwaini, A.N.Hassan, F.K. (1987). Pathologyical effects and immune response of Candida albicans and Candida Krusri in mice. Athsesis submitted to the college of Vet.Med. university of Baghdad.

14- Baron, E.J. and Finegold, S.M (1990). Dignostic microbiolojy. 8th. ed. The C.V. Mosby Co. Battimore.

15- Odds, F.C. (1994). Presidential addess Candida albicans, the life and times of pathogenic yeast. J.Med.Vet.Mycol.32(1): 1-8.

16- Martinez – Gonzalez , B. ; Eriotou , E. ; Michopoules ,S. and Mentis , A. (2004). Invitro and invivo inhibition of Helicobacter puglori by Lactobacillus strain . Appl . Environ , Microbiol 70 (1): 518 – 526 .

17- Chukeatirote,E. (2003). Potential use of probiotics. J. Sei. Technol. 25(2):250 – 255.

18- Ellen, J.B.; Lance ,R.P. ; and Sydeny ,M.F.(1994) : Baily and Scotts Diagnostic microbiology . 9th ed. Mosby- yearbook ,Inc .

19- AL-Akayleh, A.T. (1999). Invasive wound infaction. Vet.Med.J.Cairo university (36): 110-122.

20- Ellis, D.H (1994). Clinical mycology. The human opportunistic mycosis. Pfizer. NewYork.

21- Raper, K.B. & Fennell, D.I. (1965) . The genus Aspergillus . Williams & Wikins Company, Baltimore. 686 pp.

22- Farag, R.S. ; ElLeigthy , M.A. ; Basyony, A.F. & Daw, Z.Y. (1987) . Growth and aflatoxin production by A. parasiticus in a medium contain Plant hormones, herbicides or insecticides J. Food Prot. 50 : 1044 - 1050.

23- Cho, J. & Kang, K.J., (2000) . Control of aflatoxin B1 production of A. parasiticus using Antagonistic Microorganisms and its application in Meju. Food Sci. Biotechnol. 9 : 151 – 156 .

24- Cho, S.H. ; Chung, D.H. ; Seo, I.W. ; Lee, H.S. ; Hwang, B.H. & Park, W.P. (1992) . Inhibitory effects of grapefruit seed extract on growth and aflatoxin production of A. parasiticus . Kor. J. Food Hyg. 7: 15 – 22 .

25- MacFaddin , J.F. (2000) : Biochemical test for identification of medical bacteria . 1st ed .The williamś and wilkins, Baltimore ,USA.

26- Claus, D. & Berkeley, R.C. (1986) . Genus Bacillus cohn 1872, Bergeyes manual of systematic Bacteriology, vol.Z. Williams and Wilkins co., Baltimor, MD. In : P.H.A. Sneath, etal. (eds.) .1105 – 1139 pp.