

بررسی میزان تأثیر نانو اسانس های گیاه زیره سبز و مرزه بر روی گونه های آسپریژیلوس جدا شده از پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران

مهسا عنایتی^{۱*}، علیرضا مختاری^۲، منصور بیات^۱، افشین محسنی فر^۳، رضا خوانساری^۴

۱. گروه قارچ شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. گروه سم شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسؤل: dvmahsa@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸

چکیده

آلودگی با انواع قارچ های مولد مایکوتوکسین علاوه بر کاهش تولید محصولات کشاورزی، خسارت های جبران ناپذیری را بر سلامت و بهداشت جامعه وارد می کند. آسپریژیلوس ها از مهم ترین قارچ های موجود در محیط می باشند که تقریباً در همه ترکیبات و مواد آلی قابلیت رشد دارند و کنیدی آن ها به مقدار فراوان در آب، خاک و هوا پراکنده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر مهار کننده های گیاه زیره سبز و مرزه بر گونه های آسپریژیلوس جدا شده از پودر ماهی تولید شده در کارخانجات استان مازندران بود. در این بررسی ۱۲ جدایه آسپریژیلوس از ۸۹ نمونه پودر ماهی جدا گردید. اثر مهار کننده گی نانو اسانس ها به روش ریز رقت انجام شد که بیشترین و کمترین مقدار مربوط به آسپریژیلوس فومیکاتوس و آسپریژیلوس نیدولانس بود. میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد در مورد گونه های مختلف در محدوده ۱/۵۶ تا ۶/۲۵ و حداقل غلظت کشندگی قارچ در محدوده ۳/۱۲ تا ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر قرار داشت. نتایج آزمایشات حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد نشان دهنده تأثیر بالای نانو اسانس ها بر روی گونه های آسپریژیلوس می باشد.

واژگان کلیدی: آسپریژیلوس، نانو اسانس، مرزه، زیره سبز.

مقدمه

کافی انرژی، ویتامین های گروه A، B، E و به خصوص B₁₂ جزء تسریع کننده های رشد محسوب می شود. سابقه استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری ها به تاریخ تولد بشر باز می گردد. در پی ناکامی های مختلف در به کارگیری داروهای مختلف شیمیایی و ظهور سویه های مقاوم جدید، بشر با بکارگیری دانش و تکنولوژی امروزی، اقدام به تولید فرآورده های دارویی با منشأ گیاهی نموده است (محبوبی و فیض آبادی، ۱۳۸۸). امروزه در اکثر کشورهای جهان به گیاه درمانی توجه زیادی می شود و پژوهشگران متعددی در این رشته مشغول به فعالیت می باشند. اسانس مرزه (*Satureja montana*) علاوه بر داشتن اثر ضد قارچی، دارای ترپن ها و ترپنوئیدهایی با اثرات ضد میکروبی نیز می باشد. این گیاه دارای ۰/۸ تا ۱/۵ درصد

کپک ها بر روی مواد آلی مانند غلات در حال رشد و انبار شده قادر به رشد هستند که به دلیل تولید متابولیت های ثانویه و ایجاد خطر برای انسان و دام، حائز اهمیت می باشند (رزاقی ابیانه و قهفرخی، ۱۳۸۴). مهم ترین قارچ های تولید کننده مایکوتوکسین در سه جنس آسپریژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم قرار می گیرند. حضور مایکوتوکسین ها با غلظت های بالا در محصولات کشاورزی علاوه بر کاهش تولید، در صورت ورود به غذای انسان و دام موجب خسارت های جبران ناپذیری بر سلامت و بهداشت جامعه می شوند (Whitlow and Hagler, 2005). پودر ماهی به عنوان یک ماده خوراکی جهت تأمین قسمتی از پروتئین جیره دام، طیور و آبزیان از دیرباز مورد توجه بوده است. این فرآورده به علت داشتن اسیدهای آمینه مناسب و مقادیر

اقدام به کشت اسانس‌ها در محیط‌های کشت مختلفی از جمله رزبنگال آگار و مک کانکی شد. جداسازی قارچ آسپرژیلوس از پودر ماهی بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروب شناسی، هر کدام از نمونه‌ها به‌طور مجزا رقت سازی و در محیط‌های دکستروز آگار سیب زمینی و رزبنگال آگار کشت داده شد و در گرم‌خانه ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز قرار گرفت. سپس از نظر رشد کلنی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

تهیه نانو اسانس‌ها

برای تهیه‌ی محلول کیتوزان ۰/۵ درصد، که در ساخت نانوذله به کار برده می‌شود ابتدا ۰/۵ گرم کیتوزان را در اسید استیک ۱ درصد با $\text{pH}=3-3/5$ حل کرده و همراه با یک مگنت روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده شد تا کاملاً حل شود. به‌منظور یکنواخت سازی، محلول در دستگاه اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس به محلول کیتوزان، کربامید و اسید بنزوئیک به‌صورت قطره قطره اضافه شد و با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ مولار، pH آن به ۹-۸/۵ رسانده شد. مقدار کربامید، ۳ برابر اسید بنزوئیک در نظر گرفته شد. تا قابلیت ایجاد پیوند را داشته باشد. پس از غلیظ شدن محلول، عمل سانتریفیوژن سه مرتبه صورت پذیرفت. در نهایت به‌منظور تهیه نانو اسانس با غلظت ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر، حدود ۲۵ میکرولیتر از اسانس با ۵۰۰۰ میکرولیتر نانوذله آماده شده در مرحله قبل، مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد.

روش تهیه محلول میکروبی

قارچ‌های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی، در محیط دکستروز آگار سیب‌زمینی کشت داده شد و در گرم‌خانه یخچال‌دار، در دمای ۳۰ درجه به مدت یک هفته گرم‌خانه گذاری گردید. پس از یک هفته میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول PST (محلول استریل حاوی ۱۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی نرمال + ۱۰ میکرولیتر توپین

اسانس به‌همراه تانن، رزین و موسیلاژ است. تیمول و کارواکرول و پاراسیمین مواد تشکیل دهنده اسانس مرزه می‌باشند (شهرکی و همکاران، ۱۳۸۸). آلدئید کومینیک یا کومینول^۱، کومینول الکل^۲، سیمون^۳، آلفاپین^۴، بتاپین^۵، گاماترپین^۶، فلاندرن^۷، سینول^۸، کامفن^۹، میرسن^{۱۰}، میرتنال^{۱۱}، دی هیدروکومین آلدئید^{۱۲}، کاریوفیلین، آلفا ترپینول^{۱۳}، لینالول^{۱۴}، ترپینولن^{۱۵}، پولگون^{۱۶} مواد تشکیل دهنده اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) هستند. مطالعات گوناگونی بر روی اثرات اسانس‌های گیاهی از جمله زیره سبز و مرزه انجام شده است (Cowan, 1999; Khosravi et al., 2011) ولی مطالعه‌ای در خصوص اثر ضد قارچی نانو اسانس‌های زیره سبز و مرزه بر گونه‌های آسپرژیلوس انجام نشده است. هدف از این تحقیق، جداسازی و تشخیص گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران و بررسی اثر نانو اسانس‌های زیره سبز و مرزه بر گونه‌های آسپرژیلوس است.

مواد و روش کار

آماده سازی نمونه‌ها

در این تحقیق از ۱۴ کارخانه‌ی تولید کننده‌ی پودر ماهی واقع در سطح استان مازندران در مجموع ۸۹ نمونه به‌صورت تصادفی جمع آوری گردید. اسانس‌های مورد مطالعه در این تحقیق به‌صورت تجاری از شرکت باریج اسانس تهیه شد. برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها به میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی،

1. Cuminic Aldehyde
2. Cuminol Alchole
3. Cymene
4. α -pinene
5. B-pinene
6. γ Terpinenes
7. Phellandrene
8. Cineole
9. Camphene
10. Myrcene
11. Myrtenal
12. Di Hydro Cuminaldehyde
13. α -Terpineole
14. Linalool
15. Terpinolen
16. Pulegone

۱۱ محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر نانواسانس مربوطه، به عنوان کنترل منفی و گوده ۱۲ محتوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. این آزمون در دو تکرار انجام گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند و پس از گذشت این زمان، میکروپلیت‌ها از گرم‌خانه خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر، قرائت شدند. گوده‌ای که مانع رشد قارچ شده بود، به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، در نظر گرفته شد (Espinell Ingrof et al., 2002; Arikan et al., 1999).

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی، با استفاده از سمپلر، از گوده حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و گوده‌های قبل از حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته و به محیط دکستروز آگار سیب زمینی منتقل کرده و بعد از کشت به مدت یک هفته گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از گرم‌خانه گذاری هر رقتی که مانع رشد کامل قارچ شده بود یا کمتر از ۳ کلونی (تقریباً معادل ۹۹/۵-۹۹٪ فعالیت کشندگی) وجود داشت به عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد (Espinell Ingrof et al., 2002; Arikan et al., 1999).

تجزیه و تحلیل آماری در این مطالعه به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد.

۸۰) به محیط آگار شیب‌دار اضافه شد و با استفاده از سواب استریل، سطح اسپورها کاملاً شستشو داده شد. سوسپانسیون قارچی را به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس نموده، سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه به منظور ته نشین شدن میسلایوم‌ها و باقی ماندن اسپورها در محلول، در آزمایشگاه قرار داده شد. در ادامه، این سوسپانسیون با استفاده از سمپلر به لوله دیگر منتقل و با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید. غلظت سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. میزان جذب نوری قارچ آسپرژیلوس باید برابر ۰/۱۷-۰/۱۵ باشد تا سوسپانسیونی برابر با غلظت 1×10^5 CFU/ml به دست آید. این غلظت سوسپانسیون به منظور انجام آزمون حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و ریختن سوسپانسیون به داخل گوده‌ها، به میزان یک به نه رقیق شد. همزمان با این عمل، از لام هموسیتومتر نیز برای شمارش اسپورها و تعیین میزان اسپور برابر با استاندارد، استفاده گردید (Kavanagh, 2006).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، ابتدا به هریک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه، با استفاده از سمپلر هشت کاناله، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ۲ درصد RPMI 1640 اضافه شد، سپس از نانو اسانس-های زیره سبز و مرزه (هر نانو اسانس به طور جداگانه)، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برای هر گوده، رقت‌های سریالی در میکروپلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای تهیه شد. به این صورت که به گوده اول از سمت چپ اضافه و به خوبی با سمپلر مخلوط شد و در ادامه از گوده اول به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به گوده دوم منتقل شد و در نهایت از گوده دهم ۱۰۰ میکرولیتر نانواسانس خارج گردید. سپس به هریک از گوده‌ها به غیر از گوده ۱۱، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد شده اضافه شد تا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت‌های متفاوت نانواسانس شود. گوده

نتایج

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی قارچی در دو تکرار صورت گرفت و مشخص گردید که تأثیرات نانو اسانس ها در هر دو بار آزمون، نتایج مشابهی دارد. نتایج نشان داد که بین غلظت های ممانعت از رشد و کشندگی نانو اسانس های زیره و مرزه اختلاف معنی داری وجود ندارد، در حالی که بین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ۱۲ نمونه آسپرژیلوس جدا شده، با حداقل غلظت کشندگی رابطه معنی داری در سطح $P=0/004$ وجود دارد.

از کل نمونه های پودر ماهی (۸۹ نمونه)، ۱۲ جدایه آسپرژیلوس با توجه به خصوصیات ظاهری جداسازی و تشخیص داده شد. از بین گونه های شناسائی شده، به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد مربوط به آسپرژیلوس فومیگاتوس (۵ عدد) و آسپرژیلوس نیدولانس (۱ عدد) بود. جداول شماره ۱ و ۲ نتایج آزمایش حداقل غلظت کشندگی قارچی و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد نانو اسانس های زیره سبز و مرزه را نشان می دهد. نتایج آزمایشات حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، نشان دهنده تأثیر بالای نانو اسانس مرزه و زیره سبز بر روی گونه های آسپرژیلوس بود. در تمامی آزمایشات

جدول ۱- نتایج آزمایش حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی نانو اسانس زیره سبز بر حسب $\mu\text{g/mL}$

شماره نمونه ها	*A _۱	A _۲	A _۳	A _۴	A _۵	A _۶	A _۷	A _۸	A _۹	A _{۱۰}	A _{۱۱}	A _{۱۲}
حداقل غلظت ممانعت از رشد	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱/۵۶۲	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۱/۵۶۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵
حداقل غلظت کشندگی	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۲۵

*A منظور جدایه های آسپرژیلوس می باشد

جدول ۲- نتایج آزمایش حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی نانو اسانس مرزه بر حسب $\mu\text{g/mL}$

شماره نمونه ها	*A _۱	A _۲	A _۳	A _۴	A _۵	A _۶	A _۷	A _۸	A _۹	A _{۱۰}	A _{۱۱}	A _{۱۲}
حداقل غلظت ممانعت از رشد	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵
حداقل غلظت کشندگی	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵

*A منظور جدایه های آسپرژیلوس می باشد

بحث

(فئید، ۱۳۸۴). میاحی (۱۳۸۶) موفق به جداسازی آسپرژیلوس و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین در پودر ماهی شد بطوری که نتایج ایشان نشان داد که پودر ماهی تولید داخل، بیشترین میزان آلودگی به آسپرژیلوس را دارا بوده است و بیشترین مقدار آلودگی به سم آفلاتوکسین B1 برابر با ۱۵ میکروگرم در کیلوگرم گزارش شده است. در تحقیق حاضر از بین ۸۹ نمونه پودر ماهی که از ۱۴ کارخانه فعال در سطح استان مازندران جمع آوری شد، ۱۲ نمونه به قارچ آسپرژیلوس آلوده بودند که بیشترین آلودگی مربوط به گونه ی آسپرژیلوس فومیگاتوس بود. در مطالعه حاضر

شرایط تولید پودر ماهی کیلکا و هم چنین شرایط نامناسب انبارداری، پتانسیل آلودگی آن به قارچ های مختلف از جمله آسپرژیلوس را فراهم می کند. پودر ماهی پس از تولید به علت گرم بودن و جمع شدن در کف کارخانه رطوبت محیط را جذب می کند و در نتیجه محیط مناسب برای رشد و تکثیر اسپوره های قارچی فراهم می شود (Olajuyigbe et al., 2011). از طرفی آلودگی دستگاه ها و خط تولید به آسپرژیلوس نیز اهمیت خاصی در بروز آلودگی دارد. در برخی مطالعات قبلی حضور آسپرژیلوس در پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان گیلان مورد اشاره قرار گرفته است

نشان از حساس بودن جدایه‌ها به اسانس‌های مورد بررسی است و طبیعتاً برای از بین بردن آن نیاز به تجویز بیشتر ماده ضد قارچی نمی‌باشد. با توجه به این- که در زمینه استفاده از نانواسانس‌ها فعالیت‌های بسیار محدودی انجام گرفته است، تحقیق در این زمینه بسیار مفید و کاربردی خواهد بود. با توجه به اثرات جانبی کم نانو اسانس‌ها در مقایسه با ترکیبات شیمیایی، پیشنهاد می‌گردد که اثرات ضد قارچی نانو اسانس‌های تولید شده از اسانس‌های گیاهی، مقایسه همزمان اثر ضد قارچی اسانس و نانو اسانس با یکدیگر، استفاده از اسانس‌ها و نانو اسانس‌ها به‌عنوان نگهدارنده غلات و حبوبات در انبارها برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، استفاده از نانو اسانس‌ها به‌منظور کاربرد در امور پزشکی، داروسازی و دامپزشکی و صنایع غذایی به- صورت عناصر ضد قارچی، ارزیابی خواص درمانی نانو اسانس‌ها بر روی حیوانات آزمایشگاهی و نهایتاً بیماران بررسی شود.

منابع

۱. رزاقی ایبانه، مهدی و قهفرخی، معصومه. (۱۳۸۴). قارچ شناسی عمومی دامپزشکی. تهران، موسسه آموزش علمی کاربردی جهاد کشاورزی، صفحه ۷۱-۵۰.
۲. شهرکی، رضا، شیبانی صفت، مهدی و حداد خداپرست، محمد حسین. (۱۳۸۸). بررسی اثرات ضد قارچی اسانسهای اویشن، مرزه، اکالیپتوس، لیمو، نعنای و باریجه بر روی قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، (عامل فساد محصولات کشاورزی). همایش ملی انسان، محیط زیست و توسعه پایدار. باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان.
۳. فیید، منیره، مظفری نور، امیر و شجاعی آرانی ابولفتح. (۱۳۸۴). جداسازی و شناسایی مهمترین باکتری‌ها و قارچ‌های مولد فساد از پودر ماهی کیلکا در استان گیلان. مجله علمی شیلات ایران. سال چهاردهم، شماره ۴، صفحه ۱۳۲-۱۲۷.

نیز حضور *آسپرژیلوس* در پودر ماهی اثبات شد که یکی از دلایل آن وجود رطوبت در منطقه شمال ایران می‌باشد. بررسی نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که اسانس‌ها تاثیرات ضد قارچی بارزی دارند که این امر در گزارش‌های متعدد مورد اشاره قرار گرفته است (Khosravi et al., 2011). تحقیقات متعدد نشان داده است که اسانس درمنه از رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند به- طوری که در بعضی موارد، فعالیت ضد میکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر است. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که اسانس‌ها و نانواسانس‌ها اثرات قابل توجهی بر روی قارچ‌ها به‌ویژه قارچ *آسپرژیلوس* دارند و از اسانس زیره به‌عنوان ضد قارچ قوی نام برده شده است. نانواسانس‌های مورد استفاده در این تحقیق نیز اثرات ضد قارچی قوی بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس* جدا شده از پودر ماهی داشتند. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با نتایج (Bansod and Mehendra 2008) نشان از تأثیر بالای اسانس زیره سبز بر روی قارچ‌های رشته‌ای دارد. نتایج تحقیق شهرکی و همکاران (۱۳۸۸) بیان‌گر این مطلب است که دو اسانس مرزه و اویشن بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* داشته‌اند و به‌ترتیب در غلظت‌های ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ به‌طور کامل جلوگیری نمودند که همگی با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. با مقایسه بین مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت میکروپلیت‌ها در گرم‌خانه و مشاهده عدم اختلاف بین این دو زمان، بیان‌گر این موضوع است که مواد مؤثر نانواسانس‌های مورد مطالعه، در همان ساعت-های ابتدایی در محیط، آزاد شده و تأثیر خود را برجا گذاشته و افزایش مدت زمان انکوباسیون تأثیری بر روند ضد قارچی بیشتر نانواسانس‌ها ندارد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد، در بررسی و مقایسه با سایر نتایج تفاوت چندانی ندارد و

- fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds. *J Clin Microbiol.* 40: 3776-3781.
11. Kavanagh, K. 2006. *Medical Mycology Cellular and Molecular Techniques*, Wiley Publication, New York, U.S.A.
 12. Khosravi, A.R., Minooeian Haghghi, M.H., Shokri, H., Emami, S.A., Alavi, S.M., and Asili, J. 2011. The potential inhibitory effect of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essential oils on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Brazil J Microbiol.* 42: 216-224.
 13. Kim, J.C. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol J.* 23: 17-19.
 14. Mahmoud, A.E. 1994. Antifungal action and anti aflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Lett Appl Microbiol.* 19: 23-27.
 15. Olajuyigbe, O.O., Akanda, G., Ezekiel, M.O., Olusola, A.O., Salaudeen, M.M., Amusan, E.E., and Babalola, A.F. 2011. Microbial and proximate composition of some fish meal samples. *Int J Food Saf.* 13: 41-44.
 16. Whitlow, L., and Hagler, J. 2005. Mycotoxins in feeds, *Feed Stuffs.* 14: 69-79
۴. محبوبی، محدثه و فیض ابادی، محمد مهدی. (۱۳۸۸). بررسی اثر ضد میکروبی اسانسهای آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتریهای اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس، فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، شماره ۳۰، صفحه ۱۴۴-۱۲۷.
 ۵. میاحی، منصور، راضی جلالی، محمد و سلامات، نگین. (۱۳۸۶). جداسازی آسپرژیلوس و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی، ذرات و کنجاله سویا. مجله علوم دانشگاه شهید چمران. سال ششم، شماره ۱۷، صفحه ۹۵-۱۰۵.
 6. Arikan, S., Mario Lozano, C., Victor, P., Sunaina, N., and John, H. 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin b, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol.* 37: 3946-3951.
 7. Bansod, S., and Mehendra, R. 2008. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. *World J Med Sci.* 3: 81-88.
 8. Coulombe, R.A. 1993. Biological Action of mycotoxins. *J Dairy Sci.* 76: 880-891
 9. Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12: 564-82.
 10. Espinel Ingroff, A., Chaturvedi, V., Fothergill, A., and Rinaldi, M. 2002. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum