بررسی میزان تأثیر نانو اسانس‌های گیاه زیره سبز و مرزه بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس* جدا شده از پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران

مهسا عنایتی[1*]، علیرضا مختاری[2]، منصور بیات[1]، افشین محسنی فر[3]، رضا خوانساری[4]

۱. گروه قارچ شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه میکروب 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:** *dvmmahsa@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۶

چکیده

آلودگی با انواع قارچ‌های مولد مایکوتوکسین علاوه بر کاهش تولید محصولات کشاورزی، خسارت‌های جبران ناپذیری را بر سلامت و بهداشت جامعه وارد می‌کند. آسپرژیلوس‌ها از مهم‌ترین قارچ‌های موجود در محیط می‌باشند که تقریباً در همه ترکیبات و مواد آلی قابلیت رشد دارند و کنیدی آن‌ها به مقدار فراوان در آب، خاک و هوا پراکنده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر مهاری نانواسانس‌های گیاه زیره سبز و مرزه بر گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی تولید شده در کارخانجات استان مازندران بود. در این بررسی ۱۲ جدایه آسپرژیلوس از ۸۹ نمونه پودر ماهی جدا گردید. اثر مهارکنندگی نانو اسانس‌ها به‌روش ریز رقت انجام شد که بیشترین و کم‌ترین مقدار مربوط به *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نیدولانس* بود. میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد در مورد گونه‌های 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 تاثیر بالای نانواسانس‌ها بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس* می‌باشد.

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

مقدمه

کپک‌ها بر روی مواد آلی مانند غلات در حال رشد و انبار شده قادر به رشد هستند که به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و ایجاد خطر برای انسان و دام، حائز اهمیت می‌باشند (رزاقی ابیانه و قهفرخی،۱۳۸۴). مهم‌ترین قارچ‌های تولید کننده مایکوتوکسین در سه جنس آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی‌سیلیوم قرار می‌گیرند. حضور مایکوتوکسین‌ها با غلظت‌های بالا در محصولات کشاورزی علاوه بر کاهش تولید، در صورت ورود به غذای انسان و دام موجب خسارت‌های جبران ناپذیری بر سلامت و بهداشت جامعه می‌شوند (Whitlow and Hagler, 2005). پودر ماهی به‌عنوان یک ماده خوراکی جهت تأمین قسمتی از پروتئین جیره دام، طیور و آبزیان از دیرباز مورد توجه بوده است. این فرآورده به‌علت داشتن اسیدهای آمینه مناسب و مقادیر کافی انرژی، ویتامین‌های گروه A، B، E و به‌خصوص B_{12} جزء تسریع کننده‌های رشد محسوب می‌شود. سابقه استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها به تاریخ تولد بشر باز می‌گردد. در پی ناکامی‌های مختلف در به‌کارگیری داروهای مختلف شیمیایی و ظهور سویه‌های مقاوم جدید، بشر با بکارگیری دانش و تکنولوژی امروزی، اقدام به تولید فرآورده‌های دارویی با منشأ گیاهی نموده است (محبوبی و فیض آبادی، ۱۳۸۸). امروزه در اکثر کشورهای جهان به گیاه درمانی توجه زیادی می‌شود و پژوهشگران متعددی در این رشته مشغول به فعالیت می‌باشند. اسانس مرزه (*Satureja montana*) علاوه بر داشتن اثر ضد قارچی، دارای ترپن‌ها و ترپنوئیدهایی با اثرات ضد میکروبی نیز می‌باشد. این گیاه دارای ۰/۸ تا ۱/۵درصد

اسانس به‌همراه تانن، رزین و موسیلاژ است. تیمول وکارواکرول و پاراسیمن مواد تشکیل دهنده اسانس مرزه می‌باشند (شهرکی و همکاران، ۱۳۸۸). آلدئید کومینیک یا کومینول[۱]، کومینول الکل[۲]، سیمونن[۳]، آلفاپینن[۴]، بتاپینن[۵]، گاماترپینن[۶]، فلاندرن[۷]، سینول[۸]، ، کامفن[۹]، میرسن[۱۰]، میرتنال[۱۱]، دی هیدروکومین آلدئید[۱۲]، کاریوفیلین، آلفا ترپنیئول[۱۳]، لینالئول[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 جداشده 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، 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 دکستروزآگار سیب زمینی و رزبنگال‌آگار کشت داده شد و در گرم‌خانه ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 نانوژل به‌کار برده می‌شود ابتدا ۰/۵ گرم کیتوزان را در اسید استیک ۱ درصد با pH=۳-۳/۵ 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 به‌مدت 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 درنظر گرفته شد. تا قابلیت ایجاد پیوند را داشته باشد. پس از غلیظ شدن محلول، عمل سانتریفوژدر سه مرتبه صورت پذیرفت. درنهایت به‌منظور تهیه نانو اسانس با غلظت ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر، حدود ۲۵ میکرولیتر از اسانس با ۵۰۰۰ میکرولیتر نانوژل آماده شده در مرحله قبل، مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد.

روش تهیه محلول میکروبی

قارچ‌های آسپرژیلوس جداشده از پودرماهی، در محیط دکستروز آگار سیب‌زمینی کشت داده شد و در گرم-خانه یخچال‌دار، در دمای ۳۰ درجه به‌مدت یک هفته گرم‌خانه گذاری گردید. پس از یک هفته میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول PST (محلول استریل حاوی ۱۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی نرمال+۱۰میکرولیتر توین

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

۸۰) به محیط آگار شیب‌دار اضافه شد و با استفاده از سواب استریل، سطح اسپورها کاملاً شستشو داده شد. سوسپانسیون قارچی را به‌مدت ۱۵ ثانیه ورتکس نموده، سپس به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه به‌منظور ته نشین شدن میسلیوم‌ها 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 نانومترقرائت شد. میزان جذب نوری قارچ آسپرژیلوس باید برابر ۰/۱۷-۰/۱۵ باشد تا سوسپانسیونی برابر با غلظت 1×10^{5} CFU/ml به‌دست آید. این غلظت سوسپانسیون به‌منظور انجام آزمون حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و ریختن سوسپانسیون به داخل گوده‌ها، به‌میزان 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 ۲درصد RPMI1640 اضافه شد، سپس از نانو اسانس-های زیره سبز و مرزه (هر نانو اسانس به‌طور جداگانه)، به‌میزان ۱۰۰میکرولیتر برای هر گوده، رقت‌های سریالی در میکروپلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای تهیه شد. به -این‌صورت 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 به‌غیر از گوده ۱۱، به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر ازسوسپانسیون استاندارد شده اضافه شد تا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت‌های متفاوت نانواسانس شود. گوده ۱۱ محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر نانواسانس مربوطه، به‌عنوان کنترل منفی و گوده ۱۲ محتوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی، به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. این آزمون در دو تکرار انجام گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند و پس از گذشت این زمان، میکروپلیت‌ها از گرم‌خانه خارج و هم به‌صورت چشمی و هم توسط دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر، قرائت شدند. گوده‌ای که مانع رشد قارچ شده بود، به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، در نظرگرفته شد (Espinel 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 ۵۰میکرولیتر برداشته و به محیط دکستروزآگار سیب زمینی منتقل کرده و بعد از کشت به‌مدت 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 به‌عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد (Espinel Ingrof et al., 2002; Arikan et al., 1999).

تجزیه و تحلیل آماری

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

نتایج

از کل نمونه‌های پودر ماهی (۸۹ نمونه)، ۱۲ جدایه آسپرژیلوس با توجه به‌خصوصیات ظاهری جداسازی و تشخیص داده شد. از بین گونه‌های شناسائی شده، به‌ترتیب بیشترین و کم‌ترین تعداد مربوط به *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (۵ عدد) و *آسپرژیلوس نیدولانس* (۱ عدد) بود. جداول شماره ۱و ۲ نتایج آزمایش حداقل غلظت کشندگی قارچی و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد نانواسانس‌های زیره سبز ومرزه را نشان می‌دهد. نتایج آزمایشات حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، نشان دهنده تأثیر بالای نانواسانس مرزه و زیره سبز بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس* بود. در تمامی آزمایشات حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی قارچی در دو تکرار صورت گرفت و مشخص گردید که تأثیرات نانو اسانس‌ها در هر دوبار آزمون، نتایج مشابهی دارد. نتایج نشان داد که بین غلظت‌های ممانعت از رشد و کشندگی نانواسانس‌های زیره و مرزه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، در حالی‌که بین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ۱۲ نمونه آسپرژیلوس جداشده، با حداقل غلظت کشندگی رابطه معنی‌داری در سطح P=۰/۰۰۴ وجود دارد.

جدول ۱- نتایج آزمایش حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی نانواسانس زیره سبز برحسب µg/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 جدایه‌های آسپرژیلوس می‌باشد

جدول ۲- نتایج آزمایش حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگینانواسانس مرزه برحسب µg/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	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵

*A منظور جدایه‌های آسپرژیلوس می‌باشد

بحث

شرایط تولید پودر ماهی کیلکا و هم‌چنین شرایط نامناسب انبارداری، پتانسیل آلودگی آن به قارچ‌های مختلف از جمله آسپرژیلوس را فراهم می‌کند. پودر ماهی پس از تولید به‌علت گرم بودن و جمع شدن در کف کارخانه رطوبت محیط را جذب می‌کند و در نتیجه محیط مناسب برای رشد و تکثیر اسپورهای قارچی فراهم می‌شود (Olajuyigbe et al., 2011). از طرفی آلودگی دستگاه‌ها 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 (فئید، ۱۳۸۴). میاحی (۱۳۸۶) موفق به جداسازی آسپرژیلوس و اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در پودر ماهی شد بطوری‌که 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 ۱۵میکروگرم در کیلوگرم گزارش شده است. در تحقیق حاضر از بین ۸۹ نمونه پودر ماهی که از ۱۴ کارخانه فعال در سطح استان مازندران جمع‌آوری شد، ۱۲ نمونه به قارچ آسپرژیلوس آلوده بودند که بیشترین آلودگی مربوط به گونه‌ی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود. در مطالعه حاضر

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 به‌طوری‌که 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 آویشن 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 ساعت‌های 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 ممانعت کننده از رشد، در بررسی و مقایسه با سایر نتایج تفاوت چندانی ندارد و 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 این‌که در زمینه استفاده از نانواسانس‌ها فعالیت‌های بسیار محدودی انجام گرفته است، تحقیق در این زمینه بسیار مفید و کاربردی خواهد بود. باتوجه 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 به‌صورت عناصر ضد قارچی، ارزیابی خواص درمانی نانو اسانس‌ها بر روی حیوانات آزمایشگاهی و نهایتاً بیماران بررسی شود.

منابع

۱. رزاقی ابیانه، 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، نعناع 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.

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 قارچهای *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 ۱۰۵-۹۵.

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 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 Haghighi, M.H., Shokri. H., Emami, S.A., Alavi, S.M., and Asili, J. 2011. The potential inhibitory effect of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Niglla 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

.