تأثير الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فورت *Citrus paradise* Macfad في نمو الفطر *Aspergillus flavus* Link ex Fries وانتاجه لسم الافلا B_1

بتول زينل علي وهديل وائل الوائلي

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة/ ابن الهيثم، جامعة بغداد

Batolzainal18@yahoo.com

الملخص:

هدفت الدراسة الحالية اختبار تأثير الزيت الطيار المستخلص من قشور ثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وانتاجه لسم الافلاB_1. أظهر الكشف الاولي للعزلات قابلية (10) عزلات فقط من مجموع (19) عزلة للفطر *A. flavus* على انتاج سم الافلاB_1. اظهر الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت تأثيراً مخفضاً للنمو بزيادة التركيز وباختلاف طرائق الاختبار، اذ أظهر بخار الزيت الطيار فعالية مضادة أعلى وبنسبة تثبيط لأقطار المستعمرات على الوسط الصلب بلغت 90.24% عند إضافة الزيت بتركيز 0.75 مل، تلاه طريقة التخافيف في الوسط السائل والذي اظهر أعلى نسبة تثبيط 87.15% عند التركيز 1%، ثم طريقة التخفيف في الوسط الصلب الذي أظهر أعلى نسبة تثبيط لأقطار المستعمرات 89.69% عند التركيز 2%، وأدت التراكيز المختلفة للزيت الطيار الى حصول انخفاض في شدة تألق بقعة الافلاB_1 المنتجة من قبل أكفأ عزلة عند التركيز 0.125 و0.25% مقارنة مع الافلاB_1 القياسي، ولم يظهر مستخلص الفطر المعامل بالتركيز 0.5% من الزيت أي بقعة للسم على صفيحة الكروماتوغرافيا الرقيقة.

الكلمات المفتاحية: الزيت الطيار، Citrus paradise Macfad، Aspergillus flavus

Effect of essential oils extracted from the peels of grape fruits *Citrus paradise* Macfadon on growth of *Aspergillus flavus* Link ex Friesand Aflatoxin B_1 production

Batool Z. Ali and Hadil W. Alwaily

Department of Biology, College of Education for Pure Sceince/ Ibn Al-Haitham, University of Baghdad

Abstract:

The present work was aimed to study the effect of the essential oil extracted from the peels of grape fruits *Citrus paradisi*on on growth of the fungus *Aspergillus flavus* and production of Aflatoxin B_1. Preliminary screening of 19 isolates of *A. flavus* showed the ability of only 10 isolates to produce AFB_1. Essential oil treatment showed gradual reduction of fungal growth with the increasing concentration of the oil using different test methods. Treating the fungus with the vapour of the essential oil showed the highest inhibitory activity at percentage of inhibition on solid media reaching 90.24% when added at 0.75 ml, followed by the dilution method in liquid media which revealed higher inhibition 87.15% at concentration 1%., then the dilution method in solid medium in which the percentage inhibition reached 89.69% at concentration of 2% varying concentration of essential oil showed also reduction in fluorescence intensity of AFB_1 spots produced by the efficient isolate of *A. flavus* on TLC plate at concentration 0.125% compared with standard AFB_1. No spots revealed on TLC plate from the fungal extract treated with 0.5% essential oil.

Keywords: oils, Citrus paradise, Aspergillus flavus

المقدمة:

تعد الفطريات من الكائنات المتلفة للعديد من المواد الغذائية والمحاصيل الزراعية خلال مدة الخزن مما يجعلها غير صالحة للاستهلاك البشري عن طريق تغيير قيمتها الغذائية وفي أحيان أخرى انتاجها للسموم الفطرية ومن امثلة هذه السموم، سموم الافلا التي تمثل أيضات ثانوية في الغالب لسلالات الفطر *A.flavus* و*A.parasiticus*والتي لقيت اهتماماً كبيراً في انحاء مختلفة من العالم منذ اكتشافها في بداية الستينيات من القرن الماضي ولغاية الوقت الحاضر بسبب تأثيراتها السمية والمسرطنة للإنسان والحيوان، اذ صنفت هذه السموم من قبل الوكالة الدولية لبحوث السرطان ضمن الصنف الأول class I كمواد مسرطنة للإنسان (1). لذلك كان لابد من حماية الانسان والحيوان من الاضرار لناتجة عن هذه السموم، وتأتي هذه الحماية بعدة وسائل غالباً ما تكون أما بالسيطرة على الإنتاج والتخزين والتداول للحد من التلوث (2) أو منع نمو الفطريات المنتجة للسم ومنع انتاجه أو ازالته بوسائل مختلفة منها فيزيائية وكيميائية (2، 3) وبالنظر لأن اغلب المواد الكيميائية لها العديد من التأثيرات السلبية تجاه الانسان والبيئة فضلاً عن المقاومة المتزايدة لهذه الفطريات تجاه تلك المواد، كان لابد من إيجاد بدائل طبيعية وأمينة ومتوفرة لذلك اتجهت العديد من الدراسات لاستخدام المستخلصات النباتية والزيوت الطيارة المعروف استخدامها لأغراض واسعة ومتعددة منذ سنوات طويلة.

وفي هذا المجال فقد اختبرت العديد من المستخلصات النباتية للحد من نمو الفطريات المنتجة لسموم الافلا وانتاجها لهذه السموم وأثبتت فعاليتها (4، 5، 6)، كما استخدمت الزيوت الطيارة المستخلصة من العديد من النباتات في السيطرة على الفطريات المنتجة وانتاجها لهذه السموم (1، 5، 7، 8) إضافة الى إمكانية استخدام الزيوت الطيارة كمواد مبخرة Fumigants لحماية المنتجات الزراعية وللسيطرة على فطريات الخزن ومنع تكوين هذه السموم (9).

لذلك هدفت الدراسة الحالية الى تقييم فعالية الزيت الطيار المستخلص من قشور ثمار الكريب فروت الصفراء *Citrus paradisi*تجاه نمو الفطر *A. flavus* وانتاجه لسم الافلاB_1.

المواد وطرائق العمل:

- **الفطر *Aspergillusflavus*:** تم الحصول على عدد من عزلات الفطر *A. flavus*وذلك بعزلها من عينات حبوب مخزونة في مخازن تابعة للدولة في بغداد، شملت حبوب الحنطة، الشلب والذرة الصفراء باستخدام طريقة التخافيفDilution Plate method والوسط الزرعي PDA (10).
- **اختبار قابلية عزلات الفطر *A. flavus*لانتاج سموم الافلا:** تم اختبار قابلية (19) عزلة من فطر *A. flavus*على انتاج سموم الافلا وذلك بتنميتها على وسط AspergillusFlavusParasiticus Agar (AFPA)الذي يظهر لوناً براقاً للسطح السفلي للمستعمرات عند نمو عزلات الفطر *A. flavus*و*A. parasiticus*المنتجة لسموم الافلاعليه (11)، كما استخدم وسطاً آخر لهذا الغرض هو وسط جوز الهند أذ يؤدي الى تكوين هالة زرقاء حول مستعمرة السلالة المنتجة لسموم الافلا عند تعريضها الى الاشعة فوق البنفسجية على طول موجي (365) نانوميتر (12).
- **انتاج سم الافلاB_1 من قبل عزلات الفطر *A. flavus*:** تم تحضير عالق ابواغ الفطر *A. flavus*بتركيز 1×10^6بوغ/ مل، واستخدام وسط Yeast extract sucrose broth (YES)لكونه وسطاً جيداً لنمو الفطريات وانتاجها للسموم (13). حضنت الدوارق بعد تلقيحها بدرجة حرارة 20°م لمدة أسبوعين، بعدها تم استخلاص السم من المزارع الفطرية بأتباع طريقة (14) وتم الكشف عن سم الافلاB_1 في مستخلصات مزارع الفطر *A. flavus*على صفائح السيليكا جيل (Silica gel G 60) (20×20) سم بوجود السم القياسي AFB_1 واستخدام نظام الفصل كلوروفورم: ميثانول (90:10) حجم: حجم. فحصت الصفائح في نهاية الفصل تحت الاشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 365 نانوميتر وتم مطابقة معامل الترحيل (RF) ولون التألق مع السم القياسي AFB_1 (15). كما تم تقدير تركيز السم المنتج AFB_1من قبل أكفأ عزلات الفطر *A. flavus*النامية على وسط YES والموضحة في أعلاه والتي أعطت أعلى تألق

على صفيحة الكروموغرافي مقارنة بسم الافلا القياسي وذلك باستخدام جهاز Scanner densitometer.

- **نبات الكريب فروت *Citrus paradisi* واستخلاص الزيت الطيار منه:** تم جمع قشور ثمار نبات الكريب فروت الصفراء واستخدمت مباشرة دون تجفيفها (16) اتبعت طريقة (17) لاستخلاص الزيت الطيار واستخدام جهاز الاستخلاص Clavenger apparatus بدرجة حرارة 100°م لمدة 1.5-2 ساعة، جمع الزيت في قنينة معتمة معقمة وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.
- **تأثير الزيت الطيار في الوزن الجاف للفطر *A. flavus*:** اتبعت طريقة (18) باستخدام سلسلة من التراكيز للزيت الطيار تراوحت بين 0.125-2%، حضرت هذه التراكيز بإضافة تركيز معين من الزيت الى احجام معلومة من الوسط السائل YES المعقم والمحضر في دوارق زجاجية، اضيف الى هذه الدوارق مادة Tween 80 بتركيز 0.05% لتسهيل عمل مستحلب من الزيت قابل للذوبان في الوسط الزرعي. لقحت الدوارق بمحلول الابواغ بواقع 1 مل ($10^6\times1$) لكل دورق، رجت الدوارق وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 25°م لمدة 14 يوم بعدها تم ترشيح محتوى الدوارق باستخدام أوراق ترشيح Whatman no.1 وغسل الغزل الفطري بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات، ثم اخذت أوراق الترشيح الحاملة للغزل الفطري وجففت بدرجة حرارة 70°م لحين ثبات الوزن وتم تعيين الوزن الجاف للفطر. اما الراشح فجمع لكل معاملة وتم فصلوتعيين سم الافلا B_1 فيه بالطريقة الموصوفة سابقاً.
- **تأثير الزيت الطيار في النمو القطري لفطر *A. flavus*:** استخدمت لهذا الغرض طريقة الصب في الاطباق Pour plate method باستخدام تراكيز مختلفة من الزيت الطيار والوسط الزرعي PDA مع إضافة مادة Tween 80بتركيز 0.05%، مزج الزيت مع الوسط بصورة جيدة ثم صب في اطباق معقمة، لقحت الاطباق بتركيز 0.02مل من محلول الابواغ المحضر مسبقاً بشكل قطرة في مركز الطبق، حضنت الاطباق بدرجة 25°م لحين وصول النمو في طبق السيطرة الى حافة الطبق (18).
- **تأثير بخار الزيت الطيار في نمو الفطر *A. flavus*:** اتبعت لهذا الغرض طريقة (19) باستخدام أقراص ورق الترشيح المشبعة بتراكيز مختلفة من الزيت الطيار، بعد تلقيح الوسط الزرعي الخالي من الزيت بقطرة من محلول الابواغ وضعت في مركز الطبق كما في الفقرة السابقة، وضعت أقراص ورق ترشيح معقمة بقطر 1.5 سم في مركز غطاء الطبق ثم اضيف اليها بتراكيزمختلفة من الزيت الطيار تراوحت بين 0.03-2 مل، واضيف قطرات من الكحول الاثيلي الى أوراق ترشيح معاملة السيطرة، حضنت الاطباق بوضع مقلوب وتمت متابعة النمو في طبق السيطرة الى حافة الطبق.
- **التحليل الاحصائي:** استعملت طريقة ANOVA للتحليل الاحصائي وعند مستويات احتمالية 0.001 و0.01 و0.05باستخدام نظام spss.

النتائج والمناقشة:

- **اختبار كفاءة عزلات الفطر *A. flavus* في انتاج سم الافلا B_1:** تم مبدئياً تحديد عزلات الفطر *A. flavus* التي لها القابلية على انتاج الافلا B_1 وذلك بتنمية العزلات على وسط AFPA حيث أظهرت العزلاتالكفوءة في انتاج السم B_1 لونا برتقالياً مصفراً وبراقاً في خلفية المستعمرة الفطرية، السبب في هذا اللون يعود الى قابلية هذه العزلات على انتاج حامض الاسبرجيليكAspergillic acid وحامض النوراسبرجيليكNor aspergillic acid اللذان يتفاعلان مع Ferric ammonium citrate وهو احد مكونات الوسط AFPA ليعطي اللون البرتقالي المصفر البراق في خلفية المستعمرة، ويعد هذا الكشف مهماً في تحديد العزلات المنتجة لسموم الافلا (20). كما استخدم وسط خلاصة جوز الهند للكشف عن العزلات المنتجة لسموم الافلا والتي أظهرت تألقاً على هذا الوسط عند فحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية.أظهرت نتيجة الفحص المبدئي هذا لـ 19 عزلة لفطر *A. flavus* قابلية 10 عزلات فقط لانتاج السم (جدول 1) أي بنسبة 52.63%. تتفق هذه النتيجة مع ما وجده (21) من ان ثلث عزلات الفطر *A. flavus* فقط

كانت منتجة للافلاB_1 وB_2 وان عزلات الفطر تنتج مستويات مختلفة من الافلاB_1، وذلك يرجع الى اختلاف القابلية الوراثية للسلالات (22، 23).

انتاج سم الافلاB_1 من قبل عزلات الفطر *A. flavus*: أظهرت نتائج تنمية العزلات التي أعطت نتيجة موجبة للفحص (جدول 1) في الفقرة السابقة في وسط YES الذي يحفز انتاج سموم الافلاوبعد عملية الاستخلاص والفصل على صفائح الكوماتوغرافي ومقارنة البقع المفصولة مع بقع الافلاB_1 القياسي. ظهر تبايناً في شدة تألق مستخلص نمو هذه العزلات مما يدل على اختلاف قابلية العزلات في انتاجها الكمي للافلاB_1، وظهرت العزلة Z_8 اكثرها تألقاً تليها العزلتين Z_4 و Z_5واقلها تألقاً العزلة Z_{10}. كما أظهرت التجربة ان سم الافلا المنتج من قبل العزلات كافة كان من نوع B فقط دون تكوين الافلاG اذ لم تتكون بقع خضراء براقة. لقد تم تقدير كمية الافلاB_1 المنتجة من قبل أكفأ العزلات (العزلة Z_8) والتي أعطت أعلى تألقاً (++++) على صفيحة الكروماتوغرافي باستخدام جهاز Scanner densitometer والذي ظهر بتركيز 8.395 جزء بالبليون لذلك اختيرت هذه العزلة في الدراسات اللاحقة المتعلقة بتأثير الزيوت الطيارة في نمو وإنتاج السم.

جدول (1): اختبار عزلات الفطر *A. flavus* لانتاج الافلاتوكسين B_1 في وسط YES.

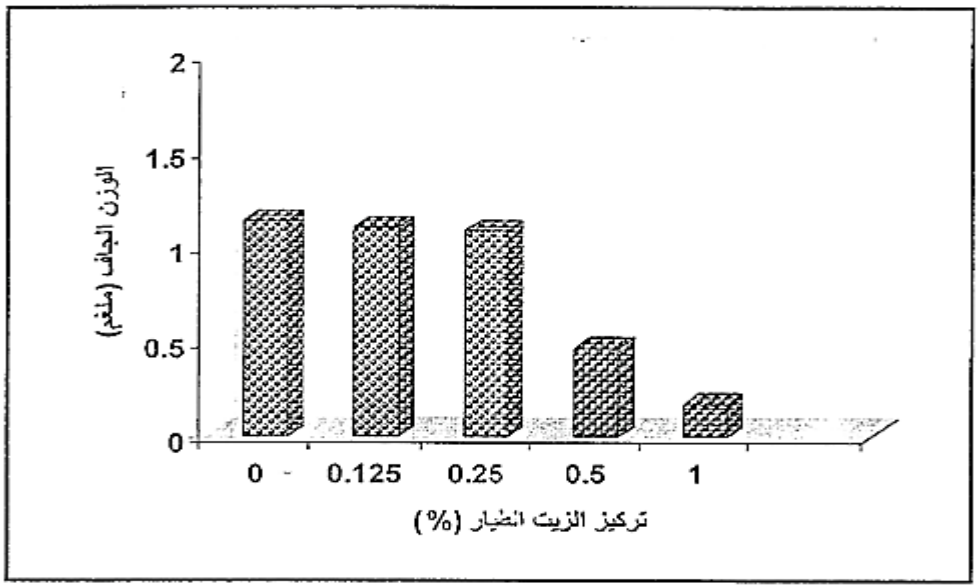
رمز العزلة	شدة التألق تحت UV مقارنة بالسم القياسي
W_1	–
W_2	–
W_3	–
W_4	–
W_5	–
R_1	+ +
R_2	+ +
R_3	+ +
R_4	–
Z_1	–
Z_2	–
Z_3	–
Z_4	+ + +
Z_5	+ + +
Z_6	+ +
Z_7	+ +
Z_8	+ + + +
Z_9	+ +
Z_{10}	+

- (+): تألق ضعيف.
- (++): تألق متوسط.
- (+++): تألق عالي.
- (++++): تألق عالي جدا.
- (–): غير متألق.

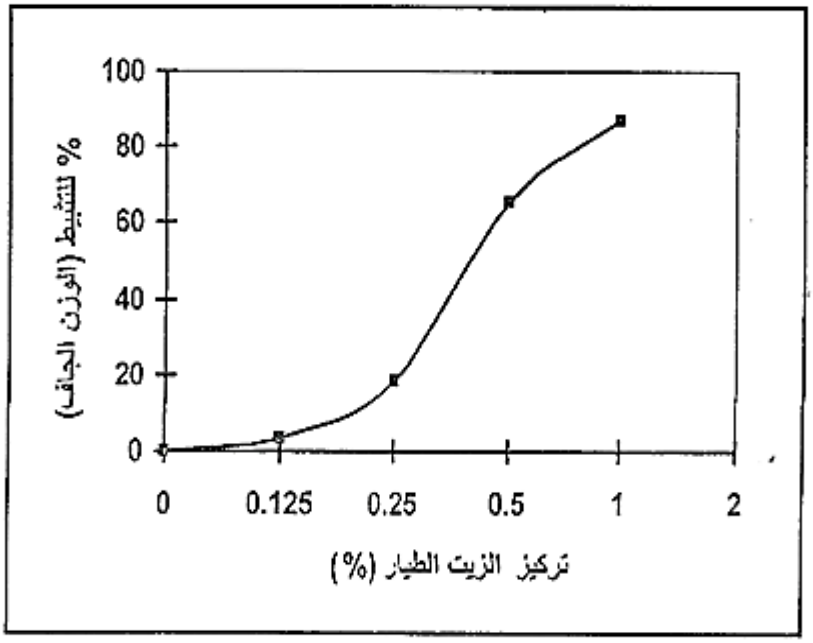
- W: حنطة.
- R: شلب.
- Z: ذرة.

- **تأثير الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت في الوزن الجاف للفطر *A. flavus*:** أظهرت نتائج إضافة تراكيز مختلفة من الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت الى وسط YES وتنمية الفطر فيه الى حصول انخفاض تدريجي أدى الى أنخفاض حاد بزيادة التركيز وصولاً الى التركيز 1% والذي أدى الى خفض حاد في الوزن الجاف (شكل 1) وبفروق معنوية تحت مستوى $P<0.001$لجميع للتراكيز عدا التركيز 0.125%

والذي اظهر فروقات معنوية تحت مستوى $P<0.05$، تراوحت النسب المئوية للتثبيط نسبة الى معاملة السيطرة بين 3.4% لأقل تركيز للزيت الطيار 0.125% الى 87.15% لأعلى تركيز للزيت 1% (شكل 2).

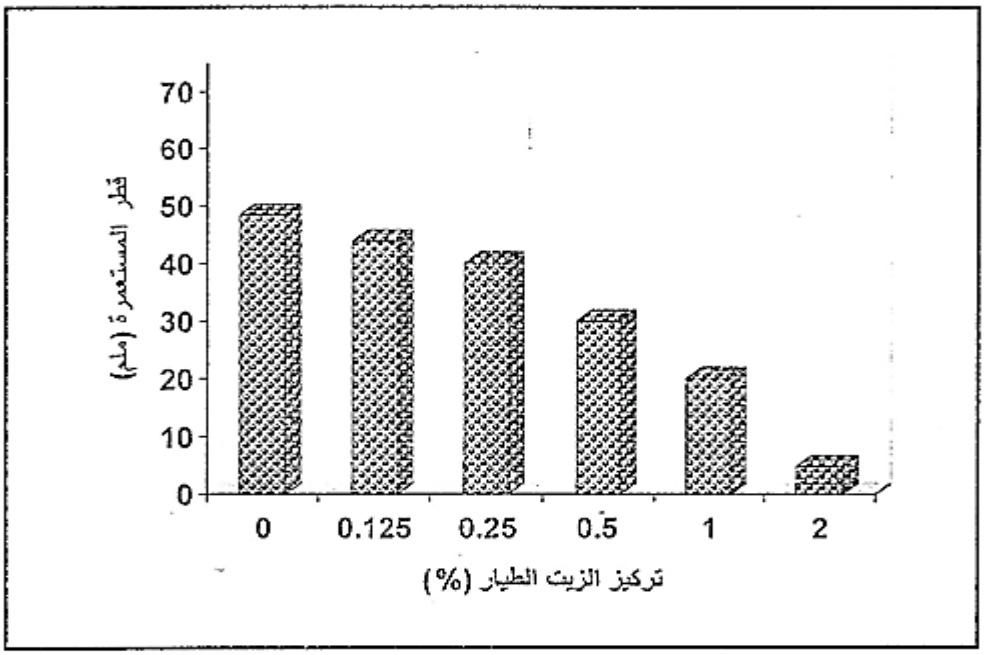


شكل (1) : تأثير الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت في الوزن الجاف للفطر النامي على وسط YES لمدة (14) يوم بدرجة حرارة (25)° م . *A. flavus*

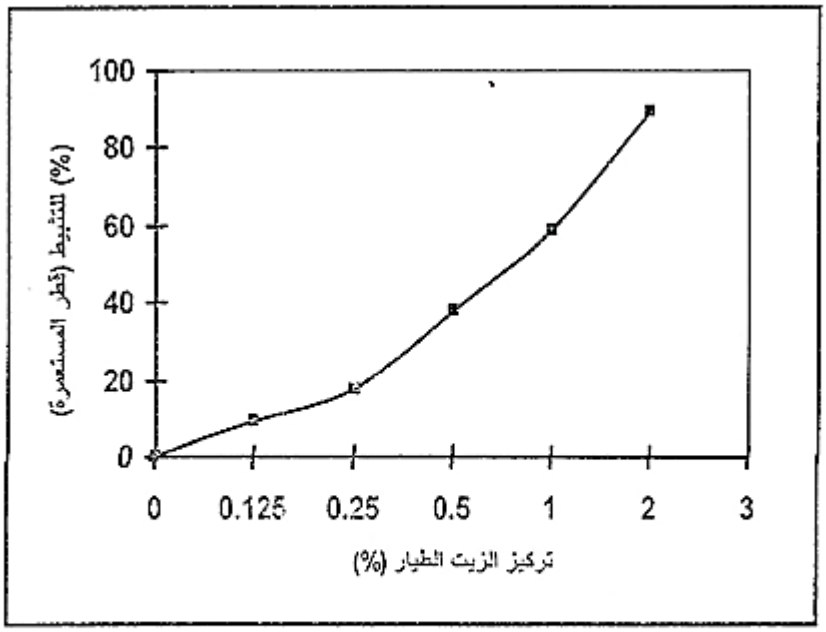


شكل (2): النسب المئوية لتثبيط الوزن الجاف للفطر *A. flavus* لتراكيز مختلفة من الزيت الطيار للكريب فروت في وسط YES لمدة (14) يوم بدرجة حرارة (25)°م .

- **تأثير الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت في النمو القطري للفطر *A. flavus*:** أظهرت النتائج تأثيراً مضاداً للنمو بزيادة تركيز الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت وصولاً الى التركيز 2% والذي أدى الى أنخفاض حاد في أقطار المستعمرات (شكل 3) وبفروق معنوية تحت مستوى $P<0.001$ عدا التركيز 0.125% الذي أظهر فرقاً معنوياً تحت مستوى $P<0.01$. تراوحت النسب المئوية للتثبيط مقارنة بمعاملة السيطرة بين 9.2% لأقل تركيز للزيت الطيار 0.125% الى 89.69% لأعلى تركيز للزيت 2% شكل (4).

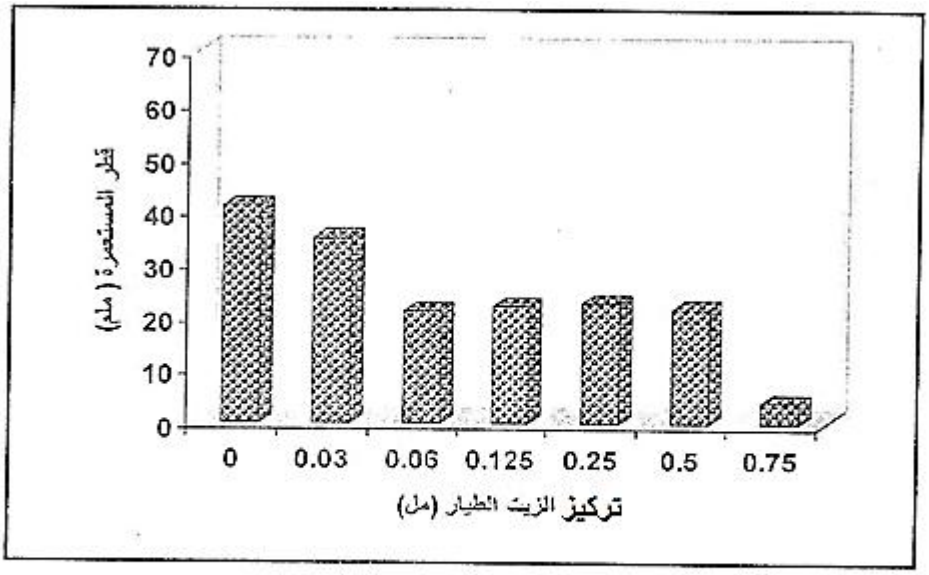


شكل (3) : تأثير الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت في اقطار مستعمرات الفطر *A. flavus* النامي على وسط PDA .

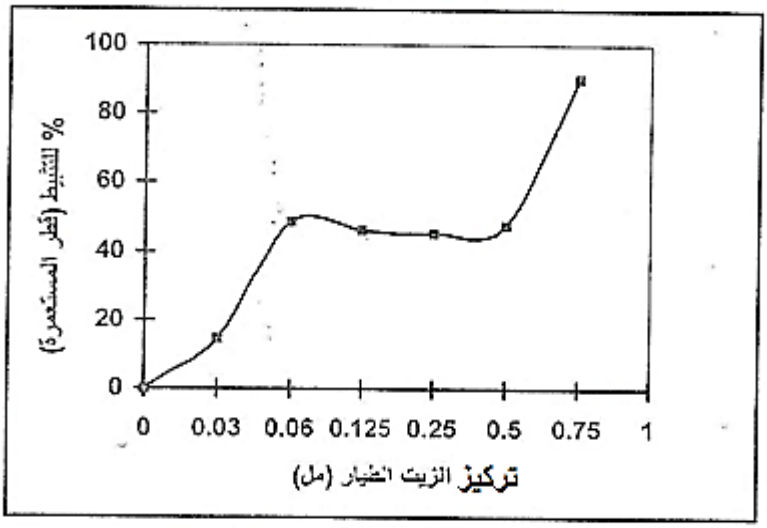


شكل (4) : النسب المئوية للتثبيط نتيجة معاملة الفطر *A. flavus* بتراكيز مختلفة من الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت على وسط PDA .

- **تأثير بخار الزيت الطيار في نمو الفطر باستخدام الأقراص المشبعة:** أظهرت نتائج تعريض الفطر الى بخار الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت المضافة بتركيز مختلفة الى أقراص أوراق الترشيح في هذه الاطباق فعالية مضادة للنمو بزيادة التركيز المضاف وصولاً الى التركيز 0.75 مل الذي أظهر انخفاضاً حاداً في أقطار المستعمرات وبفروقات معنوية ولجميع التراكيز$P<0.001$ شكل (5). كما أظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية في أقطار المستعمرات عند معاملتها بالتراكيز (0.06، 0.125، 0.25، 0.5) مل، ولكن التأثير الظاهر لهذه التراكيز هو من خلال منع التبويغ اذ ظهر الفطر بشكل غزل فطري ابيض دون تكوين الابواغ. تراوحت نسب التثبيط مقارنة بمعاملة السيطرة بين 14.63% لأقل تركيز 0.03 مل الى 90.24% لأعلى تركيز 0.75 مل للزيت الطيار (شكل 6).



شكل (5) : تأثير بخار الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت في نمو الفطر *A. flavus* على وسط PDA باستخدام الاقراص المشبعة .



شكل (6) : النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* الى احجام مختلفة من بخار الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت .

- **تأثير الزيت الطيار في انتاج سم الافلاB_1 من قبل الفطر *A. flavus*:** تم تحديد الافلاB_1 المنتج من قبل العزلة Z_8 في وسط YES الحاوي على تراكيز مختلفة من الزيت الطيار بعد تنمية العزلة فيه لمدة 14 يوماً ومن خلال تحديد شدة التألق مقارنة مع الافلاB_1 القياسي. أظهرت معاملة الفطر بتراكيز مختلفة من الزيت الطيار انخفاضاً في شدة التألق عند التراكيز 0.125 و0.25% اذ مثلت شدة التألق للتركيزين (++، +) على التوالي مقارنة بشدة تألق معاملة السيطرة (++++) ولم يظهر مستخلص الوسط في التركيز 0.5% أي بقعة للسم على الصفيحة.

تشير النتائج بصورة عامة الى زيادة كفاءة استخدام بخار الزيت الطيار للحد من نمو الفطر المنتج للافلاB_1تليه استخدام طريقة التخفيف في الوسط السائل (الوزن الجاف) ثم طريقة التخفيف في الوسط الصلب والتي أعطت أقل فعالية. ان اختلاف حساسية الطرق المستخدمة لاختبار فعالية الزيوت الطيارة والمستخلصات النباتية وقد لوحظ من قبل العديد من الباحثين (1، 18، 24) والذين عزوا ذلك الى ان هذه الطرق تتأثر بالعديد من

العوامل ومنها طبيعة النمو الفطري، مدى تعرض الغزل الفطري للزيت، ذوبانية الزيت ومكوناته وغيرها من العوامل.

لقد اختبر الزيت الطيار والمستخلص من اطباق مختلفة من جنس الـ *Citrus*من قبل العديد من الباحثين تجاه الفطريات المنتجة لسموم الافلا، من هذه الدراسات (25) والتي استخدم فيها الزيت المستخلص من قشور ثمار الليمون الحامض *C. limon* والبرتقال *C. sinensis* بتركيز 0.05-2% والتي أدت الى خفض النمو وإنتاج الافلا من قبل الفطر *A. flavus* بنسبة وصلت الى 90% عند أعلى تركيز. كما أظهر الزيت الطيار لقشور ثمار *Citrus maxima* والبرتقال *C. sinensis* قابلية تثبيط عالية لنمو العديد من الفطريات المتلفة للمواد الغذائية وإنتاج سم الافلا بتركيز 500 جزء بالمليون (26). وأظهر الزيت الطيار المستخلص من قشور ثمار (*Citrus histrix*) Kaffir limeوالنومي بصرة (*Citrus aurantifolia*) Acid lime فعالية تجاه عدد من أنواع الجنس *Aspergillus* و*Penicillium* من ضمنها *A. flavus* و*Aspergillusparasiticus*وانتاجها لسم الافلا وبتركيز 0.56-1.13 ملغم/ مل، وأظهر الزيت الطيار فعالية تثبيط تامة لانتاج سم الافلا بتركيز 2.25 ملغم/ مل (27).

وأختبر الزيت الطيار المتخلص من ثمار *Citrus* في الحد من التأثير المسرطن لسم الافلاB_1 في افراخ البط، وأظهرت النتائج بعد اضافته الى طعام الفراخ الى خفض اعراض التسمم والتسرطن المسبب عن هذا السم بنسبة متوسطة عند التركيز 2.5 غم/ كغم وزن جسم (28). أشار العديد من الباحثين الى ان فعالية الزيت الطيار لجنس *Citrus*بصورة عامة تعود الى احتواءه على نسبة عالية من زيت d-limonine وهو من التربينات الأحادية الحلقية، كما يحوي الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت بصورة خاصة على مركبات أخرى منها Octral بنسبة 2.22% و Octylformate بنسبة 0.95% (15). وفي دراسة أخرى وجد ان مكونات الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت هي Limonene، Paradisial، Niral، Geranial، Citronellal وCitral (29). ان التربينات الأحادية تتداخل مع الاغشية السايتوبلازمية فتؤثر بالدرجة الأساس على إيقاف آلية النقل الفعال وعملية الفسفرة التأكسدية فضلاً عن تثبيطها للتنفس في موقع السايتوكروم b والذي يعد جزء من سلسلة نقل الالكترونات في الخلية (30). فضلاً عن ان التربينات الأحادية تكون محبة للدهون وكلما زادت هذه الصفة في الزيوت الطيارة كانت أكثر سمية للكائنات الحية (31).

المصادر:

1. Adjou, E. S., Ahoussei, D. E.; Degnon, R. G.; Soumanou, M. M. and Sohounhoue, D. C. K. (2012). Bioefficacy of essential oil of *Lantana camara* from Benin against the growth of fungi and aflatoxin production. J. Rec. Adv. Agr., 1(4): 112-121.
2. Choudhary, A. K. and Kumari, P. (2010). Management of mycotoxin concentration in preharvest and postharvest crops: Present status and future prospects. J. Phytol., 2(7): 37-52.
3. Reddy, K. R. N.; Salleh, B.; Saad, B; Abbas, H. K.; Abel, C. A. and Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. Toxin Rev., 29: 3-26.
4. Pundir, R. K. and Jain, P. (2010). Antifungal activity of twenty two ethanolic plant extract against food-associated fungi. J. Pharm. Res., 3: 506-510.
5. Thanaboripat, D. (2011). Control of aflatoxins in agriculture products using plant extracts. KMTL, Sci. Tech. J., 11(1): 35-40.
6. Pacheco, C.; Savi, G. D. and Scussel, V. M. (2014). Inhibition of growth and aflatoxin production of Aspergillusparasiticus by guarana (PaulliniacupanaKunth) and (LibidibiaferreaMarth) extracts. African J. Biotechnol., 13(1): 131-137.
7. Abdel-Rahim, A. M.; Abdel Moneim, E.; Sulieman, E. and Mohammed, H. (2003). Effects of some essential oils on Aspergillusflavus growth and aflatoxin production. Gezira J. Engin. & Appl. Sci., 15(1): 1-8.
8. Moreira, A. C. P.; Camo, E. S. Wanderley, P. A.; Souza, E. L. and Lima, E. O. (2013). Inhibitory effect of the essential oil from Hyptissuaveolens (L.) poit on the growth and aflatoxins synthesis of Aspergillusflavus. J. Life Sci., 7(3): 276-281.
9. Mishra, A. K. and Dubey, N. K. (1994). Evalution of some essential oil for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities Appl. Environ. Microbiol., 60(40): 1101-1105.
10. الوائلي، هديل وائل (2005). تأثير الزيت الطيار للقشور الصفراء لثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* واوراق حشيشة الليمون *Cymbopogoncitratus* في نمو الفطر *Aspergillusflavus* وانتاجه للافلاتوكسين B_1. رسالة ماجستير، كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد.
11. Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. (1996). Principles of seed pathology 2nd Ed. Lewis Publishers, New York: 539.
12. Lemke, P. A.; Davis, N. D.; Lyer, S. K. and Creech, P. W. (1989). Direct visual detection of aflatoxin synthesis by minicolonies of *Aspergillus*species. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1808-1810.
13. Holmberg, T.; Kaspersson, A.; Goransson, B.; Kozakiewicz, Z. and Krammans, L. (1989). Aflatoxin production and tolerance to organic acid by *Aspergillusflavus* and *A. parasiticus* isolates from acid treated moist grain. Acta. Agric., 39: 449-455.
14. الجراح، نيران سالم (1988). دراسة تعفن ثمار الكمثرى والرمان والسموم المفرزة من قبل مسببات التعفن بفترة ما بعد الخزن. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

15. Gonzalez, C. N.; Sanche, Z. F.; Quintero, A. and Usubillage, A. (2004). Chemotaxonomic value of essential oil compounds in *Citrus* species, ISHS actahorticultare 576: International conference on medicinal and aromatic plants.
16. Vekiari, S. A.; Protopadakis, E. E.; Papadopoulou, P. Papanicolaou, D. Panon, C. and Vamovakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a certain lemon variety. J. Agric. Food Chem., 50(1): 147-153.
17. Bankole, S. A. and Joda, A. O. (2004). Effect of lemon grass (Cymbopogoncitratus) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (Colocynthiscitrullus L.). J. Biotechnol., 3(1): 52-59.
18. Graven, E. H.; Dean, S. G.; Svoboda, K. P.; Mari, S. &Gundidza, M. G. (1992). Antmicrobial and antioxidative properties of volatile (essential) oil of Artemisia afraJarq. Falv. & Frag. J., 7: 121-123.
19. Fahri, Y.; Ozcan, M. and Akgul, A. (2000). Inhibitory effect of some spice essential oil on Penicilliumdigitatum causing post harvest rot in citrus. GrasasAceites, 15(4): 237-240.
20. الرجبو، مها كرم محمد علي (1994). دراسة الفطريات الممرضة والمنتجة للافلاتوكسينات المصاحبة لبذور فول الصويا. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.
21. Batista, L. R.; Chalfoum, S. M.; Prado, G.; Schwan, R. F. and Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed green coffee beans (Coffee Arabica L.). Int. J. Food Microbiol., 85(3): 293-300.
22. حسين، حليمة زغير (1995). دراسات سمومية لبعض الفطريات وتأثيراتها على القوارض. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
23. مجيد، مجيد علي (1997). دراسة تأثير اليوريا على فطر A. flavusوالافلاتوكسينB1 في البلوكات العلفية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
24. Smith-Palmer, A.; Stewart, J. and Eyfe, L. (1998). Antimicrobiol properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Appl. Microbiol., 26: 118-122.
25. Hassan, M. M.; Chowdhury, S. P.; Shahidul, B. H. and Alam, M. S. (2005). Antifungal effect of plant extracts on seed borne fungi of wheat seed regarding seed germination, seedling health and vigour index. Pak. J. Biol. Sci., 8: 1284-1289.
26. Singh, P.; Shukla, R.; Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, S.; Mishra, P. K. and Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burn, and Citrus sinensis(L.) osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-Limonene. Food Chem. Toxicol., 48(6): 1734-1740.
27. Rammanee, K.; Hongpattarakene, T. (2011). Effect of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of Aspergillusflavus and A. parasiticus: Food Bioprocess Technol., 4: 1050-1059.
28. Kumar, D. S.; Rao, S.; Satyanaryana, M. L. Kumar, P.G.P. and Anitha, N. (2013). Amelioration of hepatotoxicity induced by aflatoxins using citrus fruit oil in boilers (Gallus domesticus). Toxical&Industr. Health, 29(10): 80-89.

29. Nature direct 24 (2004). Itrusparadisihttp://www.naturdirect24.com.
30. Amaral, J. A.; Ekins, S. R. R. and Knowles, R. (1998). Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. Appl. Environ. Microbiol., 64(2): 520-525.
31. Mann, C. M.; Cox, S. D. and Markham, J. L. (2000). The outer membrane of Pseudomonas aeroginosa NCTC 6749 contributed ti its tolerance to the essential oil of Melaleucaalternifolia (tea tree oil). Lett. Appl. Microbiol., 30: 294-297.