اثر سطوح مختلف اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بر تولید آفلاتوکسین از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*

فانی مکی، ا.*[۱]، افضلی، ن. [۱]، امیدی، آ. [۱،۲]، فروزان مهر، م.[۱]، محمدی، ح .م.[۳]

دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۸

خلاصه

آفلاتوکسین به عنوان یکی از خطرناک ترین توکسین های قارچی برای انسان و دام محسوب می شود. آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین، سبب زیان اقتصادی در کشاورزی، صنایع غذایی و دامی می شود. در مطالعه حاضر، اثر غلظت های مختلف اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بر تولید سم آفلاتوکسین ب ۱ از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار گرفت. پنج تیمار غلظتی (صفر، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ درصد حاوی ترکیبات مورد نظر)، در چهار تکرار جهت مقایسه میزان تولید آفلاتوکسین استفاده گردید. غلظت های مورد نظر از این ترکیبات تهیه و به محیط های کشت سیب زمینی – دکستروز – آگار (PDA) اضافه شدند. پس از گذشت ۲۱ روز قارچ های تولید شده بر روی محیط های کشت PDA به فلاسک های حاوی برنج جهت تولید سم آفلاتوکسین منتقل گردیدند. به غلظت های مورد مطالعه حاوی هر کدام از ترکیبات مورد نظر ۴ عدد فلاسک اختصاص داده شد، (۲۰ عدد فلاسک به ازاء هر ترکیب). میزان سم آفلاتوکسین ب ۱ تولید شده مربوط به هر یک از گروه های اشاره شده، توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) اندازه گیری گردید. کمترین بازده تولید سم آفلاتوکسین (۱/۲ ppm) متعلق به غلظت ۱/۲۵ میلی لیتر از جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بود ($P < ۰/۰۵$). همچنین بیشترین بازده تولید سم در تیمار پایه مشاهده گردید (۶۰/۸ ppm). در نتیجه به ترتیب با افزایش غلظت اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* میزان تولید سم آفلاتوکسین به کمترین میزان ممکن می رسد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین ب ۱، *آسپرژیلوس فلاووس*، اسید سیتریک، اسید پروپیونیک، *باسیلوس سابتیلیس*.

۱.گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

۲ .گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۳.گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: **ofanimakki@birjand.ac.ir**

مقدمه

مواد غذایی همواره در سراسر جهان مورد حمله قارچ های گوناگون قرار می گیرند. آفلاتوکسین ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین ها می باشند که به وسیله گونه های خاصی از جنس *آسپرژیلوس* بویژه *فلاووس* (*Aspergillus flavus*) و پارازیتیکوس (*Aspergillus parasiticus*) تولید می شوند (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱). آفلاتوکسین های شایع در صنعت پرورش دام و طیور B۱، B۲، G۱ و G۲ هستند که مسمومیت با آفلاتوکسین ب ۱ شایع ترین آفلاتوکسیکوزیس (*Aflatoxicosis*) است. *آسپرژیلوس فلاووس* بیشترین میزان سم آفلاتوکسین ب ۱ را تولید می کند (Galvano و همکاران، ۲۰۰۵). آفلاتوکسین ها به عنوان یکی از سمی ترین متابولیت های قارچی، موجب ضعیف شدن سیستم دفاعی بدن و بروز برخی سرطان ها در انسان می شوند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸). آلودگی محصولات غذایی به آفلاتوکسین در سال های اخیر به عنوان مشکلی جهانی و ویران کننده در عرصه های کشاورزی، صنایع غذایی و دامی به حساب می آید. با توجه به آسیب های شناخته شده ناشی از مصرف محصولات آلوده با سموم قارچی در انسان و حیوانات، همواره روش های مختلف شیمیایی و بیولوژیکی برای کنترل این قارچ ها در مواد غذایی مطرح بوده است (Park، ۱۹۹۳). اسید پروپیونیک و اسید سیتریک دو ماده شیمیایی هستند که به طور بالقوه می توانند از رشد کپک ها جلوگیری کنند و حتی اثر ضد مایکوتوکسینی این مواد هم به اثبات رسیده است (Monila و Giannuzzi، ۱۹۹۹). Rusul و همکاران (۱۹۸۷) و Gowda و همکاران (۲۰۰۴) به ترتیب غلظت های ۱-۰/۲۵ درصد و ۰/۵-۰/۱ درصد از اسید پروپیونیک و اسید سیتریک را در کاهش رشد *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* بررسی کردند. همچنین میکرواورگانیسم های مفیدی مانند باکتری های آنتاگونیست قادرند مکان های غذایی و فضاهای طبیعی این استرین های توکسین زا را اشغال کرده و با تولید برخی از ترکیبات بیولوژیکی، باعث غیر فعال سازی و تخریب آفلاتوکسین شده و در سم زدایی محصولات آلوده به آفلاتوکسین مؤثر باشند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸). برای مثال اثرات ضد قارچی سویه هایی از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بر روی ذرت و پسته به اثبات رسیده است (Sedeghat -Telgerd، ۲۰۰۹). در این پژوهش اثر غلظت های مختلف اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بر تولید سم آفلاتوکسین ب ۱ ناشی از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این پژوهش به ازاء هر کدام از ترکیبات شیمیایی اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* *Bacillus sp*. پنج تیمار غلظتی (صفر، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵) در چهار تکرار در نظر گرفته شد. همچنین غلظت های صفر، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ درصد پودر اسید سیتریک و اسید پروپیونیک تهیه شد. در مورد جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* ابتدا کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط مایع Nutrient Broth (NB) تهیه شد، سپس تیمارهای غلظتی مشخص شده بر حسب میلی لیتر از محیط کشت باکتری برداشت گردید. بدین طریق که میزان ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی لیتر از سویه باکتری مورد مطالعه به پلیت های هشت سانتی متری حاوی محیط کشت PDA (قبل از اینکه پلیت سرد شده و ببندد) اضافه شد. تیمارهای غلظتی مورد نظر در مورد اسید سیتریک و اسید پروپیونیک بر حسب درصد به محیط های کشت PDA اضافه گردید. هر کدام از محیط های کشت با یک پلاک آگار از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تلقیح شده و در نهایت تشتک های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۱ روز انکوبه گردیدند. در این پژوهش جهت تولید سم آفلاتوکسین ب ۱ از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس سویه* (PTCC NO : (5004 IR111 ، (تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) استفاده شد، جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* از کلکسیون قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند تهیه گردید. روند کشت قارچ بر روی فلاسک های حاوی برنج (۲۰ عدد فلاسک به ازاء هر ترکیب)، بدین صورت بود که در هر فلاسک ارلن مایر ۲۵ گرم برنج وزن و حدود ۱۳ میلی لیتر آب به برنج های موجود در هر فلاسک اضافه شد و یک ساعت به برنج های داخل هر ارلن استراحت داده شد تا آب بداخل بافت برنج نفوذ کند. سپس فلاسک ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار $15\ lb/In^2$ به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. پس از خنک شدن فلاسک ها ۵ میلی لیتر از محلول ۱ درصد (Triton (X-100 به هر کدام از پتری دیش های حاوی ترکیبات مورد نظر در مرحله قبل اضافه گردید. سپس به آرامی توسط آنس قارچ را از محیط کشت جدا کرده و یک سوسپانسیون از قارچ تهیه شد. سوسپانسیون آماده شده مربوط به هرکدام از قارچ های اولیه را به میزان ۰/۵ میلی لیتر به فلاسک های محتوی برنج افزوده و فلاسک ها را به دستگاه انکوباتور یخچال دار در دمای $۲۴\ ^{oC}$ به مدت ۷ روز انکوباسیون شدند. در نهایت محتویات ارلن های متعلق به هر کدام از ترکیبات مورد نظر را با هم مخلوط کرده (۴ عدد ارلن به ازاء هر ترکیب) و میزان سم تولید شده مربوط به هر یک از گروه های اشاره شده به ازاء هر ۲۵ گرم نمونه، توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography) TLC

اندازه گیری شد (Shotwell و همکاران، ۱۹۹۶). داده های حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SAS (9.1) و با رویه مدل عمومی خطی GLM در غالب طرح کاملاً تصادفی، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال (P <۰/۰۵) انجام پذیرفت.

نتایج

یافته های حاصل از بررسی میزان آفلاتوکسین تولید شده در تعامل های باکتری قارچ در سطح یک درصد نشان داد که حضور باکتری BsP4 باعث کاهش شدیدی در میزان تولید سم آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار بدون باکتری (۶۰/۸ ppm) شده بود. به طور خلاصه بین میزان کاهش بیومس قارچ با مقدار آفلاتوکسین تولید شده همبستگی منفی مشاهده شد (تصویر ۱). همچنین طی این پژوهش مشخص گردید که به ترتیب با افزایش غلظت اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس*، میزان تولید سم آفلاتوکسین به کمترین میزان ممکن می رسد (جدول ۱). به طوری که مشاهده کیفی میزان سم آفلاتوکسین در سطح یک درصد بر روی صفحه سیلیکاژل زیر نور ماوراء بنفش گواه این ادعا است (تصویر ۱). در این پژوهش کمترین بازده تولید سم آفلاتوکسین (۱/۲ ppm) متعلق به غلظت ۱/۲۵ میلی لیتر از جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بود (P <۰/۰۵) ، همچنین بیشترین بازده تولید سم در تیمار پایه مشاهده گردید (۶۰/۸ ppm) .

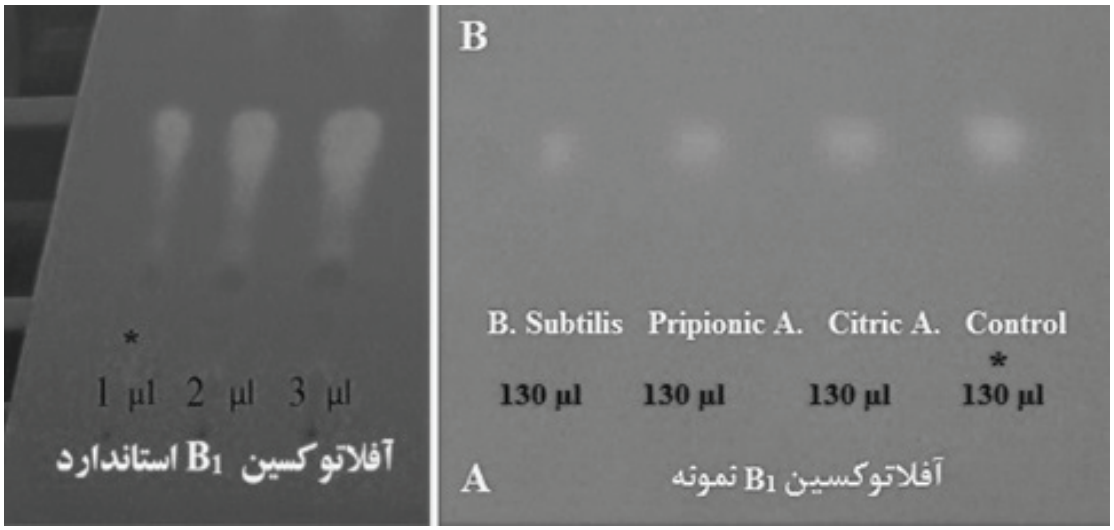
بحث

بیشترین و کمترین اثر بازدارنده های قارچی مورد نظر به ترتیب متعلق به غلظت ۱/۲۵ میلی لیتر(۱/۲ ppm) از جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* و غلظت ۰/۵ درصد از اسید سیتریک (۳۷/۸ ppm) بود (P <۰/۰۵). اثر بازدارندگی اسید پروپیونیک و اسید سیتریک متعلق به سایر تیمارهای آزمایشی معنی دار بود (P <۰/۰۵). میزان سم آفلاتوکسین موجود در سطوح ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی لیتر از جدایه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۱). در حالی که غلظت های ۱ و ۱/۲۵ میلی لیتر از جدایه BsP4 اگرچه در مقایسه با تیمار پایه توانستند تولید سم آفلاتوکسین را به طور چشم گیری کاهش دهند، ولی با یکدیگر اختلاف چندانی نداشتند. نتایج نشان داد که جدایه باکتری مورد مطالعه، بیشترین اثر را در جلوگیری کامل بیومس قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط کشت مورد نظر را دارد. به عبارتی همبستگی منفی معنی داری بین غلظت های مختلف باکتری و میزان کاهش بیومس قارچ *آسپرژیلوس* با مقدار آفلاتوکسین تولید شده مشاهده گردید. همچنین جدایه های امید بخش *B. Subtilis* عمدتاً با دو مکانیسم آنتی بیوز و تجزیه در کنترل آفلاتوکسین محصولات کشاورزی مؤثر هستند. خواص ضد قارچی اسید سیتریک برای جلوگیری از رشد گونه *آسپرژیلوس فلاووس* در مقایسه با دیگر بازدارنده های مورد مطالعه متوسط بود. Gosh و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که غلظت ۰/۵ درصد اسید پروپیونیک از رشد قارچ و بیوسنتز آفلاتوکسین توسط سویه *آسپرژیلوس فلاووس* جلوگیری می کند. همچنین Rusul و همکاران (۱۹۸۷)، طی انجام تحقیقاتی در این زمینه گزارش کردند، غلظت (۱-۰/۲۵ درصد) از اسید پروپیونیک رشد قارچ و تولید سم آفلاتوکسین را کاهش می دهد. نتایج حاصل از این مطالعه همچنین با نتایج Gowda و همکاران (۲۰۰۴)، که اعلام کردند اسید پروپیونیک در غلظت های ۰/۵-۰/۱ درصد به طور کامل از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید سم آفلاتوکسین جلوگیری می کند مغایرت دارد، احتمالاً اختلاف مورد نظردر نتایج حاصل از پژوهش این محققان با مطالعه حاضر بدلیل شرایط مختلف آزمایشگاهی و متفاوت بودن سویه قارچ و محیط کشت مورد نظر می باشد. در نان های تیمار شده با اسید سیتریک کاهش رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و مهار تولید آفلاتوکسین B۱ و G۱ توسط این قارچ گزارش شد (Reiss، ۱۹۹۷). Reddy و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که ترشحات مایع خارج سلولی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* به طور مؤثری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین ممانعت می کند. همچنین گزارش شده است که عصاره خارج سلولی باکتری *Bacillus* sp. در تجزیه کومارین (اساس ساختار ملکولی تمام آفلاتوکسین ها) و آفلاتوکسین نقش مهمی دارد. از این رو میکروارگانیسم هایی که می توانند از کومارین به عنوان منبع کربن استفاده کنند قادر به استفاده از آفلاتوکسین ها و تجزیه آنها می باشند (Guan و همکاران، ۲۰۰۸). باکتری های آنتاگونیست قادرند مکان های غذایی و فضاهای طبیعی این استرین های توکسین زا را اشغال کنند و با تولید برخی از ترکیبات بیولوژیکی، باعث غیرفعال سازی و تخریب آفلاتوکسین شده و در سم زدایی محصولات آلوده با آفلاتوکسین مؤثر باشند (Abbas، ۲۰۰۵). پاک سازی میکروبی شناخته شده توسط *B. Subtilis* شامل تجزیه، هضم و جذب سطحی است (Laciakova و همکاران، ۲۰۰۸). فهم این أمر می تواند سم زدایی آفلاتوکسین در زنجیره غذایی انسان و احشام را آسان نماید. استفاده از روش های شیمیایی (استفاده از اسید) و زیستی (باکتری) یکی از مهمترین روش های بازدارنده رشد قارچ محسوب می شوند. جذب کننده های زیستی از قبیل باکتری *B. Subtilis*

تیمارهای آزمایشی	سویه BsP4 باکتری	اسید پروپیونیک	اسید سیتریک
پایه	۶۰/۸±۴/۲۱[a]	۶۰/۸±۴/۲۱[a]	۶۰/۸±۴/۲۱[a]
۰/۵ درصد	۳/۱±۰/۶۸[b]	۲۵/۵±۲/۴۵[b]	۳۷/۸±۳/۲۷[b]
۰/۷۵ درصد	۲/۵±۰/۳۹[b]	۲۳/۱±۲/۳۴[c]	۳۰/۱±۲/۹۶[c]
۱ درصد	۲/۱±۰/۳۵[bc]	۱۱/۹±۲/۶۴[d]	۲۶/۲±۲/۶۵[d]
۱/۲۵ درصد	۱/۲±۰/۳۴[c]	۶/۳±۱/۹۳[e]	۲۰/۶±۲/۳۸[e]

جدول ۱. مقایسه میزان سم آفلاتوکسین ب ۱ تولید شده در حضور بازدارنده های اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و سویه BsP4 باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بر حسب (ppm)

(a–e) ارزش گذاری میانگین ها، بیانگر اختلافات معنی دار ستون ها در سطح (P <۰/۰۵) طبق آزمون معنی داری دانکن است.



تصویر ۱. مشاهده کیفی آفلاتوکسین در سطح یک درصد ترکیبات باکتری سویه BsP4 *باسیلوس سابتیلیس*، اسید پروپیونیک و اسید استیک به همراه استاندارد آفلاتوکسین (AFB1) روی صفحه سیلیکاژل و تحت نور ماورای بنفش (با طول موج ۳۶۵ نانومتر). A، محل قرار گرفتن ترکیب های حاوی سم آفلاتوکسین بر روی صفحه سیلیکاژل. B، محل قرار گرفتن آفلاتوکسین روی صفحه سیلیکاژل با استفاده از حلال جدا کننده کلروفرم – استون (۹ به ۱) و (– غلظت آفلاتوکسین ب ۱ استاندارد = 10 µl/ml).

به مقادیر بسیار وسیع تری قادر به جذب سم آفلاتوکسین در مقایسه با جاذب های شیمیایی نظیر (اسید سیتریک و اسید استیک) بوده و اثرات مخرب زیست محیطی کمتری را بر روی محصولات غذایی اعمال می کنند. در نتیجه مشخص شد که به ترتیب با افزایش غلظت بازدارنده های اسیدی– باکتریایی مورد نظر میزان سم آفلاتوکسین کاهش می یابد. بر اساس مطالعات انجام شده در این پژوهش به نظر می رسد کاهش میزان آفلاتوکسین به وسیله ترکیبات اسیدی– باکتریایی تنها به علت باند شدن سلولی نبوده و مکانیسم های آنتی بیوز علیه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و همراه با متابولیسم و تجزیه آفلاتوکسین دلیلی بر این ادعا است. در پایان باید خاطر نشان کرد که شناسایی مکانیسم های عمل کنترل آفلاتوکسین گامی کلیدی در جهت طراحی استراتژی کنترل آفلاتوکسین بر اساس کاربرد منفرد یا مخلوط استرین ها و یا اجزای آن ها در مراحل مختلف باغ، انبار و حمل و نقل بوده و امکان طراحی آسان، کارآمد و مقرون به صرفه سم زدایی آفلاتوکسین موجود در محیط های مختلف را فراهم می سازد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه بیرجند به منظور حمایت مالی از این طرح تشکر می شود.

Journal of Veterinary Laboratory Research 4 (2012) 325-330

The effect of different levels of Citric acid, Propionic acid and *Bacillus subtilis* on the production of Aflatoxin from *Aspergillus flavus*

Fani Makki, O.*[1], Afzali, N. [1], Omidi, A.[1,2], Frouzanmehr, M.[1], Mohammadi, H.R.[3].

Received: 16.11.2012 Accepted: 28.12.2012

Abstract

Aflatoxin is considered as one of the most dangerous fungal toxins for human and animals. Crops contaminated with aflatoxin, causing economic losses in agriculture, food and livestock industries. In the present study, the effect of different concentrations of citric acid, propionic acid, and BsP4 strain of *Bacillus subtilis* on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* was evaluated. Five treatment concentrations (0, 0.5, 0.75, 1 and 1.25 percent of compounds), in four replications were used to compare the production of aflatoxin. Appropriate concentration of the compounds were prepared and added to the PDA culture medium (Potato dextrose agar). After 21 days, the produced fungi on the PDA environment culture media were transmitted to rice containing flasks. Four flasks allocated to each studied concentration (20 flasks per each compound). The amount of aflatoxin B1 produced by each of the mentioned groups was measured by thin layer chromatography (TLC). The lowest yield of aflatoxin production (1.2 ppm) was extracted from strain BsP4 of *Bacillus subtilis* in 1.25 percent concentration. The highest toxin production was observed in the basal treatment (60.8 ppm). The study found that along with increasing in the concentration of citric acid, propionic acid, and BsP4 strain of *Bacillus subtilis*, the production rate of aflatoxin is diminished to lowest possible rate.

Keywords: Aflatoxin B1, *Aspergillus flavus*, Citric acid, Propionic acid, *Bacillus subtilis*.

1.Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Birjand University, Birjand, Iran.

2.Department of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3.Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: **ofanimakki@birjand.ac.ir**

منابع

صداقت، ن. ۱۳۸۸. کنترل بیولوژیکی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در پسته بوسیله باکتری *باسیلوس سابتیلیس*. پایان نامه کارشناسی ارشد گیاهپزشکی. دانشگاه تهران. تهران. ایران.

Abbas, H.K. 2005. Aflatoxin and food safety. CRC Press. New York, USA, 565 pp.

Galvano, F., Ritieni, A., Piva, G., Pietri, A. 2005. Mycotoxins in the human food chain. In The Mycotoxin Nottingham University. 187–224.

Gosh, M.K., Chhabra, A., Atreya, P.P., Choppra, R.C. 1996. Effect of treating with propionic acid, sodium bisulfate and sodium hydroxide on the biosynthesis of aflatoxin on groundnut cake. Animal Feed Science and Technology, **60**, 43-49.

Gowda, N.K.S., Malathi, V., Suganthi, R.U. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Animal Feed Science and Technology, **116**, 281-291.

Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., Niu, T. 2008. Aflatoxin B1 Degradation by Stenotrophomonas Maltophilia and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. International Journal of Molecular Sciences, **9**, 1489-1503.

Kumar, V., Basu, M.S., Rajendron, T.P. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commertially important agricultural commodities. Crop Protection, **27**, 891-905.

Laciakova, A., Cicooova, P., Mate, D., Laciak, V. 2008. Aflatoxins and possibilities for their biological detoxification. Medycyna Weterynaryjna, **64(3)**, 276-279.

Monila, M., Giannuzzi, L. 1999. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. Food Research International, **32**, 677-682.

Park, D.L. 1993. Controlling aflatoxin in food and feeds. Food Technology, **47**, 92-96.

Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Muralidharan, K. 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin productionby *Aspergillus flavus* infecting rice grains. Food Control, **20**, 173-178.

Reiss, J. 1997. Prevention of the formation of mycotoxins in whole wheat bread by citric acid and lactic acid. Experientia, **32**, 168-169.

Rusul, G., El-Gazzar, F.E., Marth, E.H. 1978. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of acetic or propionic acid and at differential PH values. Journal of Food Protection, **50**, 909-914.

Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Stubblefield, R.D., Sorenson, W.G. 1996. Production of aflatoxin on rice. American Society of Microbiology, **14(3)**, 312-317.

Yunus, A.W., Ghareeb, K., Abd-El-Fattah, A.A.M., Twaruzek, M., Böhm, B. 2011. Gross intestinal adaptations in relation to broiler performance during a chronic aflatoxin exposure. Poultry Science Journal, **90**, 566-569.