

Toksijenik *Aspergillus flavus*'un Büyümesini Kontrol Etmek için *Thymus longicaulis*'in Değerlendirilmesi

Bilal Balkan^{1*}, Seda Balkan¹

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Kırklareli Üniversitesi, Kırklareli, Türkiye

Geliş: 14.06.2023, Kabul: 24.12.2023, Yayınlanma: 31.12.2023

ÖZ

Bu çalışmada Lamiaceae familyasına ait *Thymus longicaulis*'in sulu ekstraktlarının *Aspergillus flavus*'un büyümesi üzerine olan etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş *T. longicaulis*'in tozları *A. flavus*'un misel büyümesini %70.53 oranında inhibe etmiştir. *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının *A. flavus*'a karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri 1000 µg/mL idi. *T. longicaulis* sulu ekstraktları sıvı besiyerindeki 5 günlük saklanma sürelerinden sonra petri kaplarına aktarıldığında ayçiçeği, buğday, mısır ve pirinçte yapay olarak oluşturulan *A. flavus* çürümesini tamamen engelleyememiştir. Test edilen tüm konsantrasyonlarda 5 günlük inkübasyon süresi boyunca *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının sadece ayçiçeğinde etkin olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının hifal morfoloji üzerine lizis, çökertme, yassılaşıma ve kırışık hücre yüzeyli hücreler dejeneratif değişimlerini yaptığı SEM analizi ile tespit edilmiştir. Araştırmanın sonuçlarına göre *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının aflatoxin B1 üreticisi olan toksijenik *A. flavus*'un ayçiçeğinde oluşturduğu enfeksiyonları önleyebilmek için koruyucu olarak rol oynayabileceğini ifade edebiliriz.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus flavus*; *Thymus longicaulis*; Antifungal; Bitki ekstraktı; SEM

Assesment of *Thymus longicaulis* to Control The Growth of Toxigenic *Aspergillus flavus*

ABSTRACT

In this study, the effect of aqueous extracts of *Thymus longicaulis*, belonging to the Lamiaceae family, on the growth of *Aspergillus flavus* was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Dried powders of *T. longicaulis* inhibited mycelial growth of *A. flavus* by 70.53%. The minimum inhibitory concentration (MIC) value of *T. longicaulis* aqueous extracts against *A. flavus* was 1000 µg/mL. When *T. longicaulis* aqueous extracts were transferred to petri dishes after 5 days of storage in liquid medium, they could not completely prevent the artificially induced *A. flavus* decay in sunflower, wheat, corn and rice. *T. longicaulis* aqueous extracts were found to be effective only in sunflower at all tested concentrations during the 5-day incubation period ($p<0.05$). It was determined by SEM analysis that aqueous extracts of *T. longicaulis* made lysis, collapse, flattening and degenerative changes of cells with wrinkled cell surfaces on hyphal morphology. According to the results of the study, we can state that aqueous extracts of *T. longicaulis* can play a protective role in order to prevent infections caused by toxigenic *A. flavus*, a producer of aflatoxin B1, in sunflower.

Keywords: *Aspergillus flavus*; *Thymus longicaulis*; Antifungal; Plant extract; SEM

1. GİRİŞ

Gıdaların mikotoksinler ile kontaminasyonu, tahıllar ve diğer tarım ürünleri için önemli bir gıda güvenliği sorunudur. Mikotoksinlerle, özellikle de aflatoksinler ile kontamine gıdalar bazen ölümcül akut hastalıklara neden olabilmektedir. Her yıl dünyadaki tahıl mahsullerinin önemli bir yüzdesi aflatoksinler gibi tehlikeli mikotoksinler ile kontamine olmaktadır [1].

Filamentli küflerden Aspergillus cinsi, gıda kontaminasyonundan sorumlu başlıca küftür. Bu küfler uygun sıcaklık ve nem koşullarında, uygun olmayan şekilde depolanan mısır, pirinç, yer fıstığı, acı biber, sirke, pamuk tohumu, mısır, ağaç yemişleri, buğday ve baharat gibi gıda maddeleri üzerinde büyüyebilirler [2]. Bunun sonucunda gıdalarda bozulmalara, besin değerlerinde azalmaya, duyu kalitenin değişmesine neden olurlar. Bazı Aspergillus türleri ise mikotoksin ürettiğinden dolayı halk sağlığı sorunu haline gelmişlerdir [3]. *Aspergillus flavus* Link ex. Fries, tahılları ve diğer gıdaları kontamine eden, kanserojen ve oldukça toksik bir mikotoksin olan aflatoksin B1 üreten aerobik bir küf türüdür [4].

Büyük çaplı üretimlerde gıdanın korunması için sentetik katkı maddelerinin yaygın olarak kullanımı zorunlu olmuştur. Fakat bazı sentetik katkı maddelerinin günlük alımı, araştırmacılar ve devlet kurumları için bir endişe kaynağı olmuştur [5]. Tüketicilerde sentetik koruyucuların aşırı kullanımından endişe duymakta ve yeni doğal koruma yöntemlerini arzulamaktadır. Duyulan bu endişe 'yeşil' politikalar oluşturmak için gıda sektörünü harekete geçirmiştir.

Kimyasal koruyucu madde içermeyen gıdalara artan talep ile birlikte bu koruyucular ile ilgili sıkı denetim mevzuatı, gıda endüstrisinde “doğal olarak elde edilen” antimikrobiyallere yönelik araştırmaların artmasını teşvik etmiştir [5].

Bilimsel çalışmalar, potansiyel olarak bitkilerde, baharatlarda ve türevlerinde bulunan biyoaktif bileşiklerin, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktivitelerini göstermiştir [6, 7]. Kimyasal bileşikler yerine bitki bazlı aktif içeriklerin kullanımı genellikle daha güvenli, çevre dostu ve mantarların büyümesini kontrol etmede etkili olduğu ve farklı mekanizmalarla toksik bileşikleri ortadan kaldırdığı için genellikle tercih edilmektedir [8].

Antimikrobiyal ve antifungal etkinliği bilinen *Thymus longicaulis*'in [9] literatürde *A. flavus*' un büyümesi üzerine olan etkisinin ayrıntılı bir şekilde *in vitro* ve *in vivo* incelenmesine rastlanılmamıştır. Bu projede Lamiaceae familyasına ait *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının gıdalarda bozulmalara neden olan ve aflatoksin üretme yeteneğindeki *A. flavus*'un üzerine antifungal etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Mikroorganizma

Aspergillus flavus Trakya Üniversitesi Arda Meslek Yüksekokulu küf koleksiyonundan temin edildi. Saf kültür, canlılığı devam ettirilmek üzere yatık agarlı Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerlerinde +4°C'de muhafaza edilerek ayda bir pasajlandı.

2.2. *Thymus longicaulis* Ekstraktının Hazırlanması

Kırklareli, Merkez, Armağan köyü baraj civarından toplanan *Thymus longicaulis* Dr. Hüseyin ERSOY tarafından teşhis edildi. Direk güneş ışığı almayacak bir alanda gölgede kurutulan *T. longicaulis*, öğütülerek toz haline getirildi ve kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edildi. 10 gr bitki tozu kaynayan 100mL distile suda 10 dk. süre çalkalanarak demleme yolu ile ekstrakte edildi. Daha sonra filtre edilerek liyofilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraktların uygun ağırlığının distile suda çözülmesi bitki ekstraktlarının çeşitli sulu konsantrasyonları hazırlandı [10].

2.3. *Aspergillus flavus* 'un Misel Büyümesi Üzerine *Thymus longicaulis* 'in *in vitro* Etkisi

40°C'de eritilmiş 100 mL PDA'ya 10 gr bitki tozu eklendi. Oluşan süspansiyon 10 dk. karıştırılarak 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Daha sonra steril gazlı bezden süzülerek petri plaklarına döküldü [11]. Petri plakları PDA besiyerinde aktif olarak büyüyen bir haftalık kültürün aktif büyüme ucundan steril mantar delici ile alınan 7 mm çapındaki küf diskleri ile aşılandı. 25°C'de 5 gün inkübe edildi. Misel büyüme inhibisyonu (MBİ) = [(KBMÇ-BTBMÇ)/KMBÇ] x 100 formülünden hesaplandı (KBMÇ; kontrol besiyeri misel çapımı, BTBMÇ; bitki tozlu besiyerinin misel çapımı ifade etmektedir [12].

2.4. *Thymus longicaulis* 'in Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

A. flavus küfüne (10⁴ CFU/mL) karşı *T. longicaulis* ekstraktının antifungal aktivitesi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) prosedürüne göre test edildi [13]. MİK değerleri morfolinopropansülfonik (MOPS) ile pH 7.0'ye tamponlanmış RPMI-1640 besiyerinde 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirildi. Plaklar 5 gün süresince 25°C'de inkübe edildi. MİK değeri görsel olarak, inkübasyondan sonra fungal büyümenin olmadığı en düşük konsantrasyon şeklinde belirlendi.

2.5. Çeşitli Tahıllarda Yapay Olarak Oluşturulan *Aspergillus flavus* Çürümesine Karşı Sulu *Thymus longicaulis* Ekstraktının Etkisi

Çeşitli tahıl taneleri (ayçiçeği, buğday, mısır ve pirinç) 40°C de 48 saat kurutuldu ve Erlenmayerlere konularak 121°C de 15 dk. otoklavlandı. Otoklavlanmış tahıllar 10⁴ CFU/mL spor içeren tüplere transfer edilerek 1 dk.

bekletildi. Daha sonra 2, 4, 8, 16 ve 32 mg/mL konsantrasyonlar da sulu bitki ekstraktı içeren test tüplerine alındı. Kontroller test edilen tahıl taneleri, *A. flavus* sporları ve besiyerinden oluşmakta idi. Tüpler 25°C de 5 gün inkübe edildi. Sonrasında ise tahıl taneleri PDA içeren petri plaklarına aktarıldı [14]. Radyal misel büyümesi 5 gün boyunca kaydedildi.

2.6. Aspergillus flavus Hifal Morfoloji Üzerine Sulu Thymus longicaulis Ekstraktun Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu İle Belirlenmesi

7 günlük kültürden hazırlanan spor süspansiyonundan (10^4 spor/mL) PDA içeren petri plaklarının merkezine 10µL damlatıldı ve 2 gün 25°C'de inkübe edilerek misel büyümesi sağlandı. Daha sonra *T. longicaulis* sulu ekstraktı petri plaklarının üzerine tamamen kapatacak şekilde damlatıldı (4MİK). 3 gün 25°C'de inkübe edilen *A. flavus* kültürlerinden mantar delici ile yarıçapı 1 cm'lik misel diskler çıkarıldı. SEM analizi için bu misel diskler oda sıcaklığında 2 saat 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.2) içinde hazırlanmış %2.5'lik glüteraldehit ile fiske edildi. Fiksasyondan sonra örnekler 30 dk. etanol serilerinden (%70, 80, 90 ve 100) geçirilerek dehidrasyona uğrattıldı [12]. Örneklerin 5Kv voltajda SEM Quanta 400 kullanılarak dijital görüntüleri elde edildi.

2.7. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri için tanımlayıcı istatistik analizi yapıldı. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemlilik derecesi varyans analizi (ANOVA) ve Mann-Whitney U Testi ile belirlendi. Bu işlemler için "SPSS for Windows, v 15.0" istatistik paket programı kullanıldı ve $p < 0.05$ ten küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

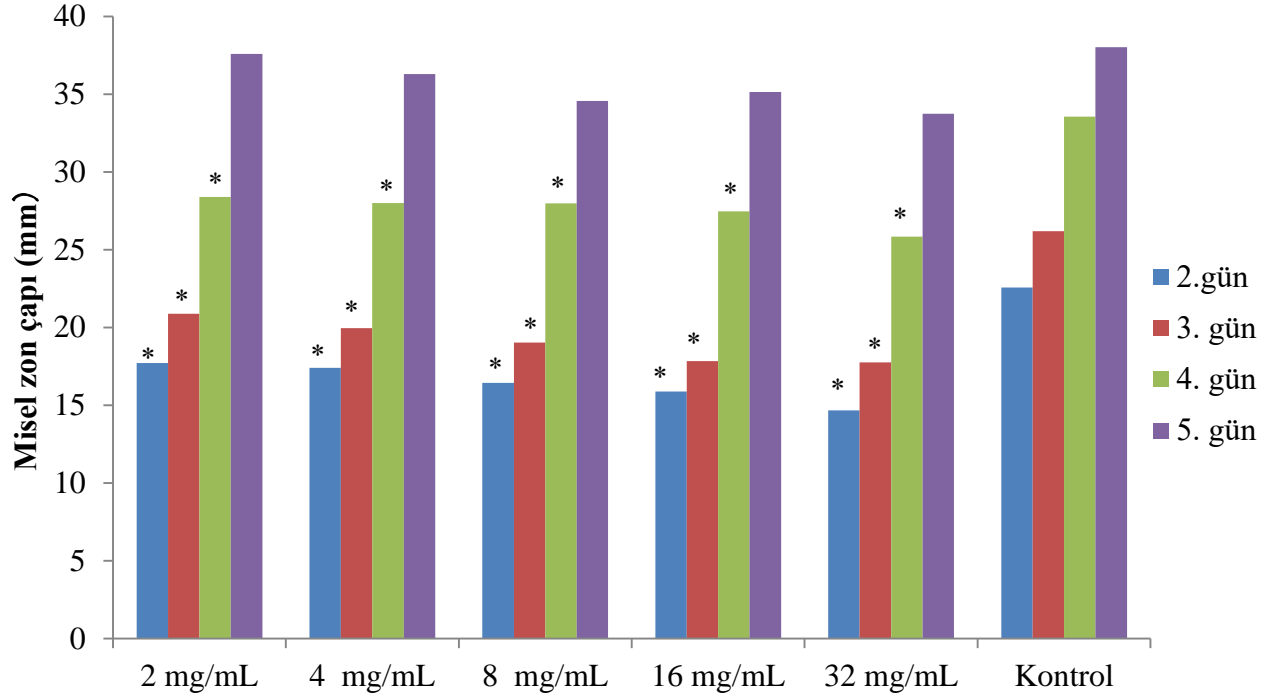
Thymus longicaulis tozları *A. flavus*'un misel büyümesi üzerine %70.53 oranında inhibitör etki göstermiştir. Fungal büyüme üzerine bitki ekstraktlarının etkisinin onların sekonder metabolitlerinden (fenolik, alkaloidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi) dolayı olabileceği rapor edilmiştir [15]. Patojenik ajanların gelişimini engellemede fenolik bileşiklerin pek çok etki tarzı olduğu önerilmiştir. Bu etkiler nedeni ile patojenik ajanın enerji üretimindeki enzimatik prosesleri bozulur, hücre membranının geçirgenlik bariyeri hasar görür ya da zayıflar, hücresinin fizikokimyasal yapısı değişir veya nükleik asit sentezi etkilenir [16]. Elde ettiğimiz sonuç ve aynı zamanda benzer çalışmalardaki sonuçlar dikkate alındığında [11, 10, 17] *T. longicaulis*'in potansiyel antifungal aktiviteye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

MİK küf gelişimini inhibe eden bitki ekstraktının en düşük konsantrasyonudur. Çalışmamızda *T. longicaulis* ekstraktının MİK değeri 1000 µg/mL olarak bulunmuştur. Almeida vd. tarafından [5] *A. flavus*'a karşı *Origanum vulgare* ve *Mentha arvensis* yağının MİK değeri sırası ile 4 ve 8 mg/mL olarak rapor edilmiştir.

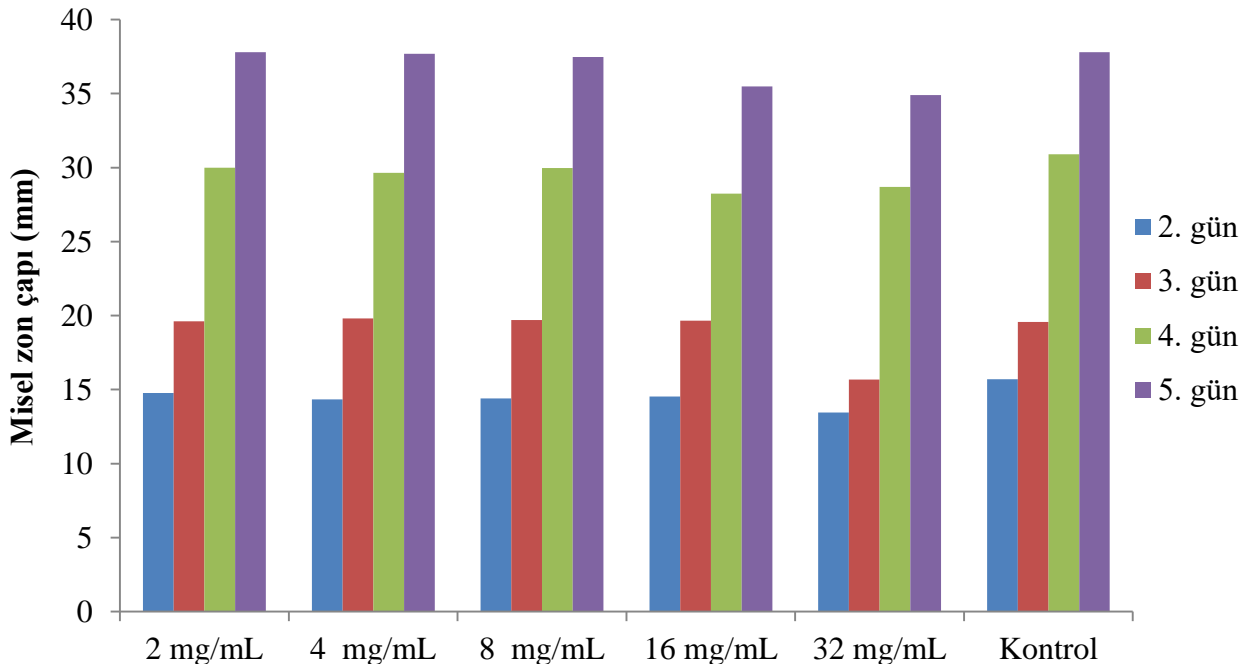
Solanum aculeastrum için *A. flavus*'a karşı MİK değeri 25 mg/mL olarak bildirilmiştir [18]. *Cymbopogon citratus*, *Moringa oleifera*, *Ocimum gratissimum* ve *Clerodendrum volubile* bitkilerinin etanol, soğuk ve sıcak su ekstraktlarının *A. flavus*'a karşı etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada en düşük MİK değerlerinin *Cymbopogon citratus* sıcak su ekstraktları (6.25 mg/mL), *Moringa oleifera* etanol ve sıcak su ekstraktları (12.5 mg/mL), *Ocimum gratissimum* etanol ve sıcak su ekstraktları (25 mg/mL) ve *Clerodendrum volubile* soğuk su ekstraktı (25 mg/mL) ile belirlendiği rapor edilmiştir [19]. Farklı bitkiler ile *A. flavus*'a karşı yapılan testlerin sonuçlarına göre *A. flavus*'un antifungal ajanlara duyarlılık derecesinde büyük farklılıklar gösterdiği görülmektedir.

T. longicaulis sulu ekstraktlarının sıvı besiyerindeki 5 günlük saklanma sürelerinden sonra petri kaplarına aktarıldığında *A. flavus*'un misel büyümesini tamamen engelleyemediği belirlendi. Petri kaplarında 5 günlük inkübasyon süresinin sonunda kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında *A. flavus*'un misel büyümesinde gerileme olduğu tespit edildi. Özellikle ayçiçeğinde test edilen tüm konsantrasyonlarda *T. longicaulis* sulu ekstraktı 5 günlük inkübasyon süresi boyunca etkindi (Şekil 1; $p < 0.05$). *T. longicaulis*'in test edilen ekstrakt konsantrasyonlarının pirinçte *A. flavus* misel büyümesi üzerine anlamlı bir etkinlik gösteremediği belirlendi (Şekil 2; $p < 0.05$). Buğdayda *A. flavus*'un misel büyümesi üzerine *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının 16 ve 32 mg/mL konsantrasyonlarda 4 günlük inkübasyon sonunda anlamlı bir etki gösterdiği gözlemlendi (Şekil 3; $p < 0.05$). Mısırdaki *A. flavus*'un misel büyümesi üzerine *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının 32 mg/mL konsantrasyonları inkübasyon süresi boyunca anlamlı bir etkinlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4; $p < 0.05$). Tahılların mineralleri, vitaminleri, pH'sı veya doğal fenolik bileşikleri gibi özellikleri değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle *T. longicaulis* sulu ekstraktları test edilen tahıllarda farklı koruyucu etkinlik göstermiş olabilir.

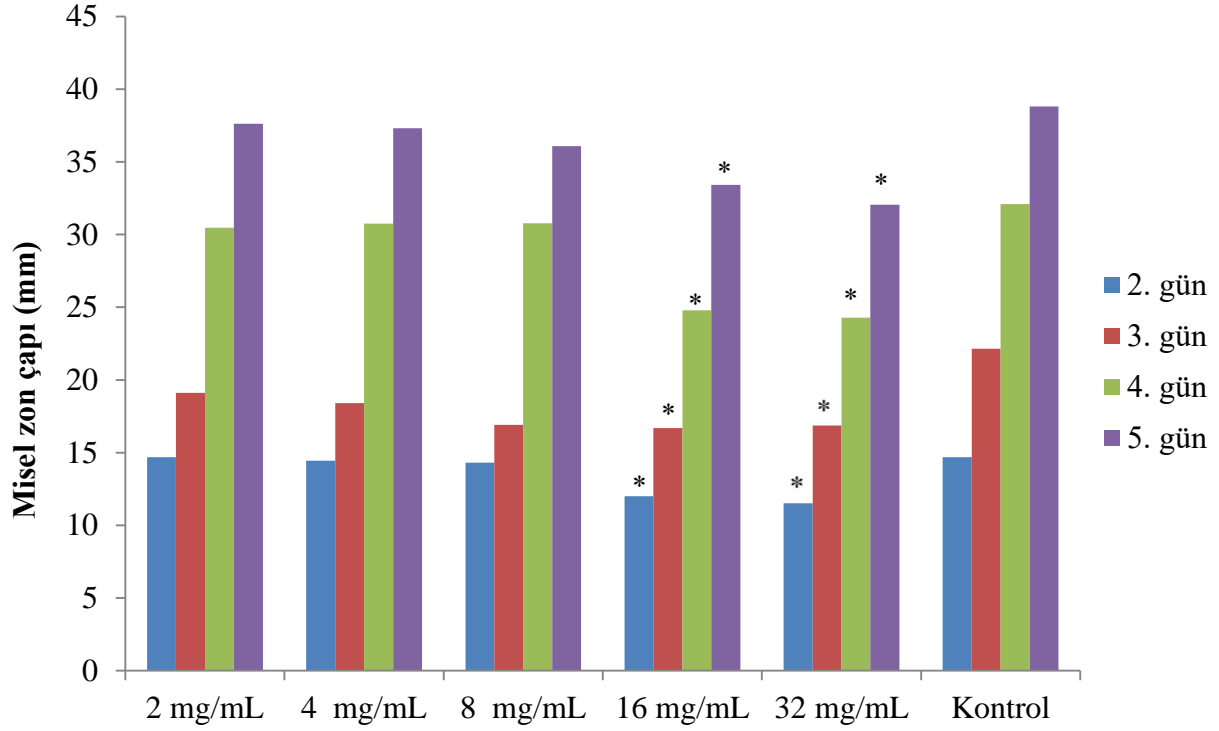
Lima vd. [14] tarafından yapılan çalışmada benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Mısır tanesi kontaminasyon modelinde, karvakrol ve timol içeren sıvı besiyerlerinde 7 günlük saklama periyodunun sonunda *A. flavus* büyümesinin görülmediği ancak mısır taneleri petri kaplarına aktarıldığında misel büyümesinin inkübasyonun 2. gününden itibaren görüldüğü belirtilmiştir. Koruyucu etkinin sadece tahıllar ile temas sırasında olduğu ifade edilmiştir.



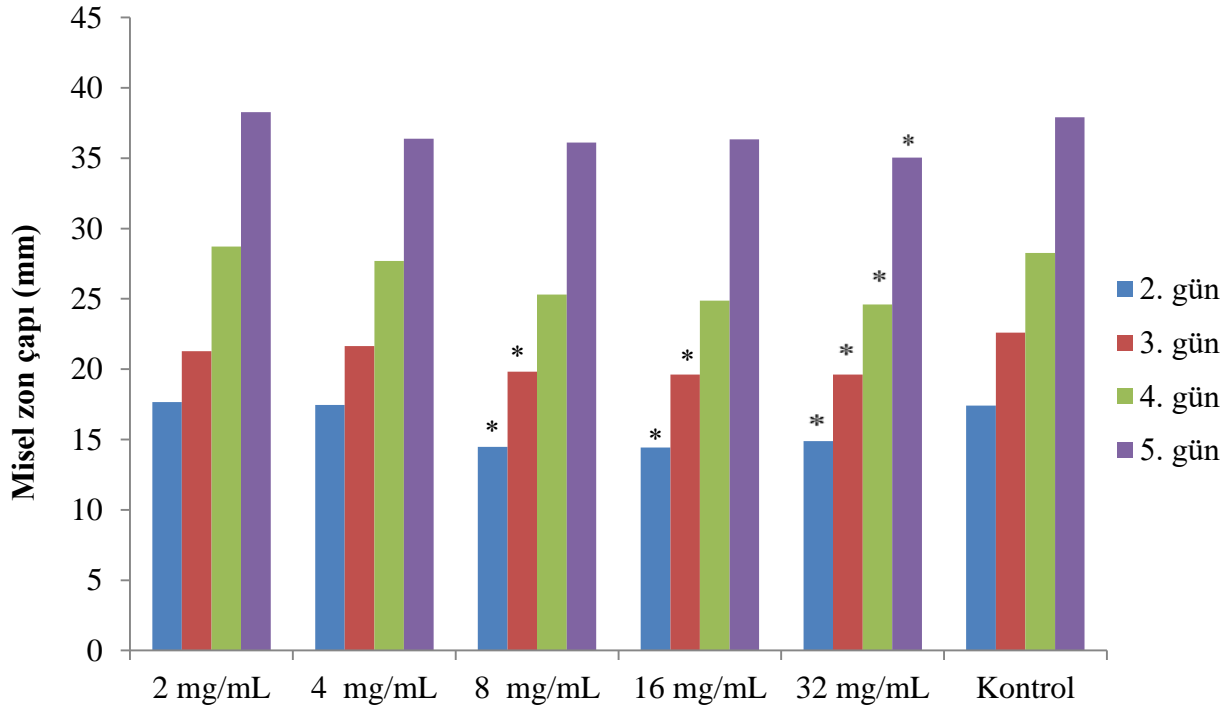
Şekil 1: Ayçiçeğinde *A. flavus*' un büyümesi üzerine *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının etkisi.* $p < 0.05$.



Şekil 2: Pirinçte *A. flavus*' un büyümesi üzerine *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının etkisi.* $p < 0.05$.



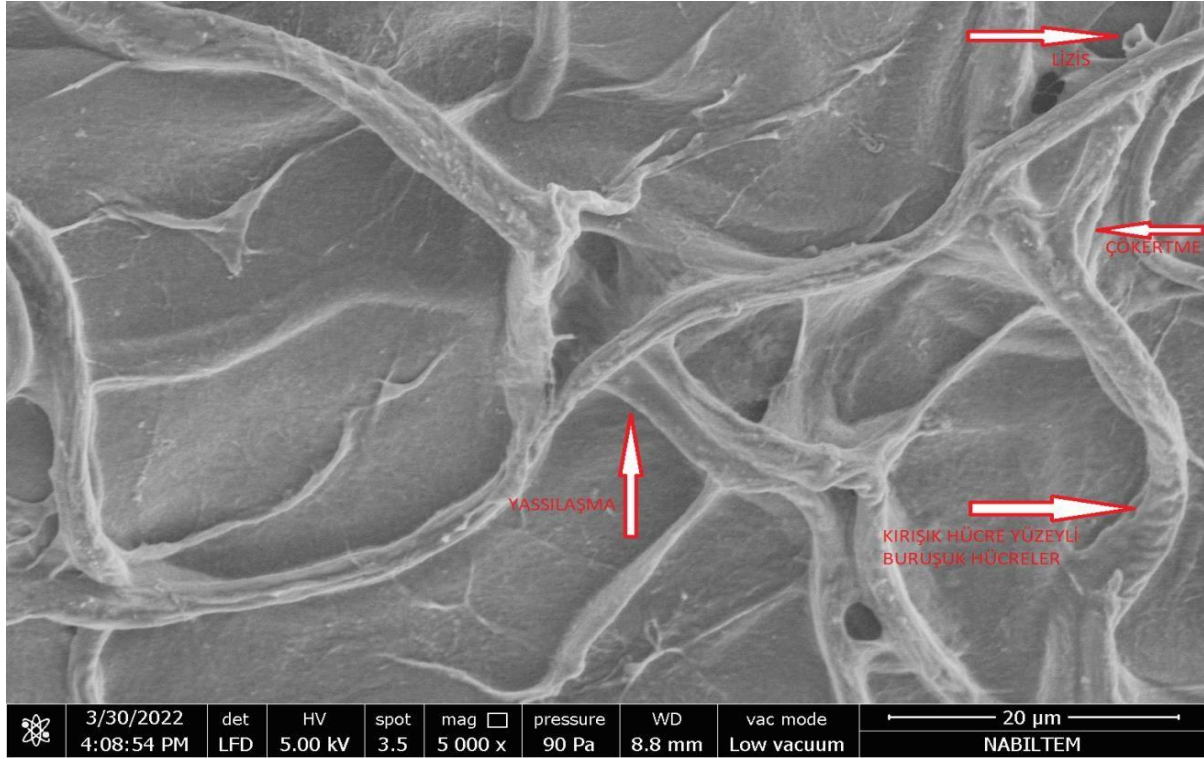
Şekil 3: Buğdayda *A. flavus*' un büyümesi üzerine *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının etkisi. *p<0.05.



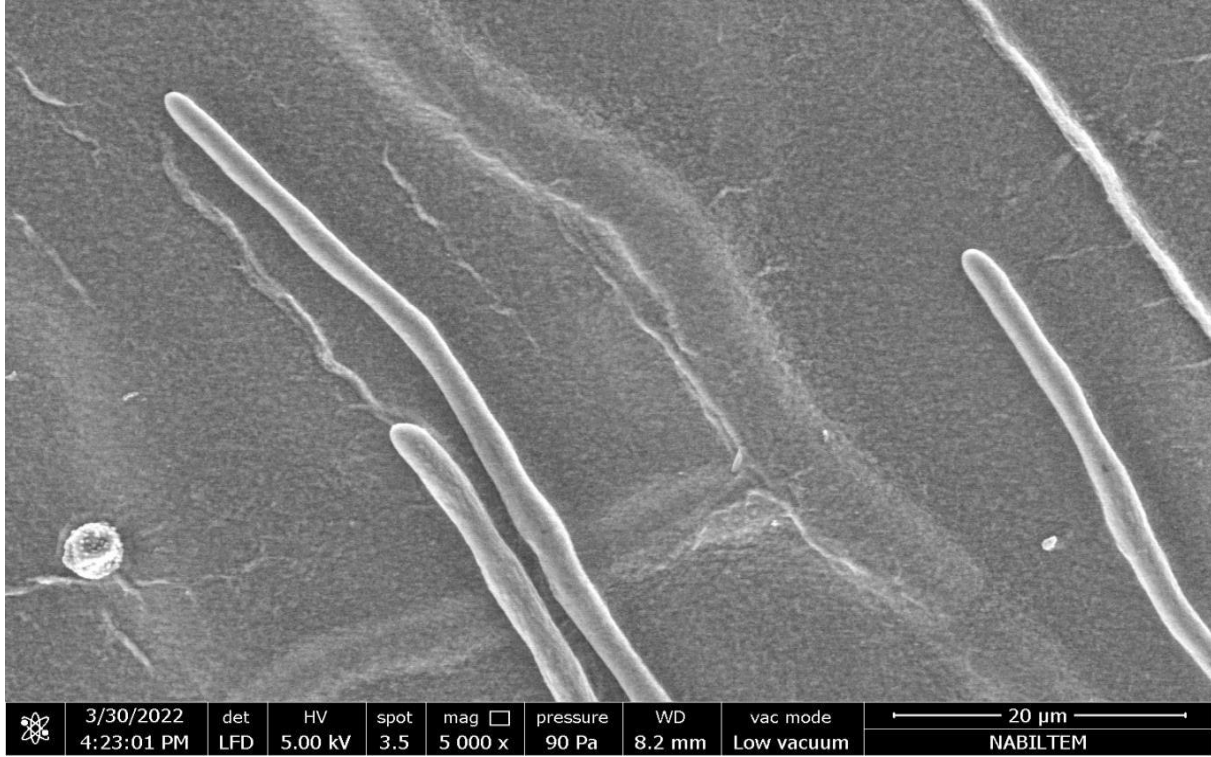
Şekil 4: Mısırdaki *A. flavus*' un büyümesi üzerine *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının etkisi. *p<0.05.

Dejeneratif değişimlere sahip ve sağlıklı hiflerin SEM görüntüleri Şekil 5 ve 6'da gösterilmiştir. *T.*

longicaulis'in 4MİK sulu ekstraktına maruz kalmış ve maruz kalmamış *A. flavus*'un hifal morfolojileri karşılaştırıldığında önemli morfolojik değişimler belirlendi. Sağlıklı *A. flavus*'un hifal yapısı doğrusal, düzenli ve homojen olarak gözlemlendi. *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının hif morfoloji üzerine yaptığı belirlenen dejeneratif değişimleri; lizis, çökertme, yassılaştırma ve kırışık hücre yüzeyli hücreler olarak sıralayabiliriz. Bu bulgular uygulanan sulu bitki ekstraktının *A. flavus*'un büyümesini inhibe eden fitotoksik özelliklere sahip antifungal bileşikler içerdiğini doğrulamaktadır.



Şekil 5: 4MİK *T. longicaulis* sulu ekstraktına maruz kalmış *A. flavus* hiflerinin SEM görüntüsü.



Şekil 6: Bitki ekstraktına maruz kalmamış *A. flavus* sağlıklı hifinin SEM görüntüsü.

4. SONUÇ

T. longicaulis, *A. flavus* ' un misel büyümesini %70.53 oranında inhibe etmiştir. *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının ayçiçeği, buğday, mısır ve pirinçte yapay olarak oluşturulan *A. flavus* çürümesini tamamen engelleyemediği sadece ayçiçeğinde etkin olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Hifal morfoloji üzerine dejeneratif değişimler yapmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının aflatoksin B1 üreticisi olan toksijenik *A. flavus* 'un ayçiçeğinde oluşturduğu enfeksiyonların önlenmesi için doğal koruyucu olarak değerlendirilebileceğini ifade edebiliriz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kırklareli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir, Proje No: KLÜBAP/228

YAZARLARIN KATKILARI

B.B.: Yöntem, analiz, araştırma, kaynaklar, yazı yazma - orijinal taslak hazırlama.

S.B.: Analiz, araştırma, kaynaklar, yazı yazma - gözden geçirme ve düzenleme.

KAYNAKLAR

- [1] Yazdani D., Ahmad Z.A.M., How T.Y., Jaganath I.B., Shahnazi S., Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by phenolic compounds extracted of Piper betle L., Iranian Journal of Microbiology, C 5 (4), S 428-433, 2013.
- [2] Hourieh A., Ocimum Basilicum : A Candidate Plant Against Aflatoxins Production with Antioxidant Activity, Journal of Materials and Environmental Science, C 5, S707-714, 2021.
- [3] Zulkifli, N. A. and Zakaria L., Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed, HAYATI J. Biosci. C 24, S 26-34, 2017.
- [4] Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Estrella, M., Pfaller, M. A., Rinaldi, M., Rodriguez-Tudela, J. L., & Verweij, P. E., International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole, Journal of Clinical Microbiology, C 43(8), S 3884-3889, 2005.
- [5] Almeida P., Blanco-Pascual N., Rosolen D., Cısılotto J., Creczynski-Pasa T., Laurindo J., Antioxidant and antifungal properties of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and mint (*Mentha arvensis*) against *Aspergillus flavus* and *Penicillium commune* for use in food preservation, Food Science and Technology, DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.64921>, 2022.
- [6] Kaefer, C. M., & Milner, J. A., The role of herbs and spices in cancer prevention, The Journal of Nutritional Biochemistry, C 19(6), S 347-361, 2008.
- [7] Yuan, G., Chen, X., & Li, D., Chitosan films and coatings containing essential oils: the antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems, Food Research International, C 89, S 117-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004>. PMID:28460897, 2016.
- [8] Nassim S., Ardakani M.M., Hemmati R., Parroni A., Beccaccioli M. and Reverberi M., The Potential of Plant-Based Bioactive Compounds on Inhibition of Aflatoxin B1 Biosynthesis and Down-regulation of aflR, aflM and aflP Genes, Antibiotics, C 9, S 728; doi:10.3390/antibiotics9110728, 2020.
- [9] Elkiran O., Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus longicaulis* C. Presl. subsp. longicaulis, International Journal of Secondary Metabolite, Vol. 9, No. 3, 248–257, 2022.
- [10] Talibi, I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A., Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot, Crop Protection, C 35, S 41-46, 2012.
- [11] Ameziane, N., Boubaker H., Boudyach H., Msanda F., Jilal A., Benaoumar A.A., Antifungal Activity of Moroccan Plants Against Citrus Fruit Pathogens, Agron. Sustain. Dev., C 27, S 273-277, 2007.
- [12] Soyulu, E.M., Kurt Ş., Soyulu S., *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*, International Journal of Food Microbiology, C 143, S 183-189, 2010.
- [13] CLSI, Clinical and Laboratory Standarts Institute, formerly NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standarts. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standart, 2nd edition, NCCLS document M27-A2, NCCLS, Wayne, PA. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standart, 1st edition, NCCLS document M 38 A, Wayne, PA., 2002.
- [14] Lima, J.C., Gomes S.M., Lima E.O., Pereira F.O., Lima I.O., Carvacrol and thymol as potential preservatives against *Aspergillus* in maize grains, Emirates Journal of Food and Agriculture, C 31(11), S 825-829, 2019.
- [15] Abdel-Monaim, M.F., Abo-Elyousr, K.A.M., Morsy, K.M., Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik), Crop Protection, C 30, S185-191, 2011.

- [16] Cutter, C. N., Antimicrobial effect of herb extracts against Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Salmonella typhimurium associated with beef, *Journal of Food Protection*, C 63, S 601–607, 2000.
- [17] Askarne, L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Serghini M.A., Ait Ben Aoumar A., In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold” *Crop Protection*, C 40, S 53-58, 2012.
- [18] Njoki L.M., Okoth S.A., and Peter M., Wachira Effects of Medicinal Plant Extracts and Photosensitization on Aflatoxin Producing *Aspergillus flavus* (Raper and Fennell), *International Journal of Microbiology*, Article ID 5273893, 9 pages <https://doi.org/10.1155/2017/5273893>, 2017.
- [19] Jeff-Agboola Y.A., Awe L.B., Antifungal and phytochemical screening of some Nigerian medicinal plant extracts against toxigenic *Aspergillus flavus*, *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1210556 <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2016.1210556>, 2016.