تأثير طلاء الكيتوسان في أنبات أبواغ الفطر *Penicillium fimorum* وقابليته في أنتاج سم الاوكراتوكسين A

منار محمود الاحمد[1] محمد عامر فياض[٢] لبيد عبد الله السعد[٣].
قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق؛[١،٢]
قسم الانظمة الطبية الذكية، كلية علوم الحاسوب وتكنولوجيا المعلومات، جامعة البصرة، [٣]

ISSN (Paper) 1994-697X
Online 2706 -722X
https://doi.org/10.54633/2333-022-047-006

المستخلص

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم وقاية النبات /كلية الزراعة/جامعة البصرة بهدف تقييم قابلية تركيز مختلفة من طلاء الكيتوسان في تثبيط أنبات ابواغ الفطر *P. fimorum*فضلاً عن قابليته في تثبيط أنتاج الفطر للسم أوكراتوكسين A. أظهرت النتائج أن استخدام الكيتوسان المايكروي والنانوي بهيئة طلاء لسطح الطبق خفض من أنبات أبواغ الفطر *P. fimorum* الا ان تأثير الكيتوسان اختلف باختلاف التراكيز المستخدمه حيث ثبط التركيز ٢٠٠٠ جزء بالمليون أنبات ابواغ الفطر *P. fimorum* بشكل تام مقارنة مع معاملتي السيطرة وحامض الخليك والتي بلغ عدد المستعمرات المتكونه (Cfu) $10^6 \times 41.66$ و$10^6 \times 24.33$ ، كما أظهرت نتائج التحليل الاحصائي للتداخل بين نوع الكيتوسان و التركيز تأثيراً معنويا في نسبة انبات ابواغ الفطر اذ سجل الكيتوسان المايكروي تثبطاً تاماً لانبات ابواغ الفطر عند استخدامه بتركيز ١٠٠ جزء بالمليون مقارنة مع $10^6 \times 3$ في معاملة الكيتوسان النانوي، كما ادى استخدام الكيتوسان بنوعيه بهيئة طلاء لسطح الطبق الى تثبيط انتاج الفطر للسم اوكراتوكسين A بنسبة ١٠٠%.

الكلمات الدالة: كيتوسان، Penicillium fimorum، اوكراتوكسين A.

The Effect of Chitosan Coating on the Spores Germination of Penicillium fimorum and its Ability to Inhibit Ochratoxin A Production

Manar Mahmood Al-Ahmed[1], Mohammed Amer Fayyadh[٢], and Labeed Abdullah Al-Saad[٣]
[١،٢] Department of Plant Protection, College of Agriculture, Basrah University, Iraq;
[٣] Department of Intelligent Medical Systems, College of Computer Science and Information Technology, University of Basrah, Iraq.
manar.m.abbas@gmail.com
https://orcid.ong/0000-0001-6999-8866

Abstract

This study was conducted in the Department of Plant Protection/College of Agriculture/University of Basrah. This study aimed to evaluating the ability of chitosan coating using different concentrations to inhibit the spores germination of *P. fimorum* as well as its ability to inhibit Ochratoxin A production. The results showed that using both of micro and nano-chitosan coating causes decreasing on the spores germination of *P. fimorum*, however the effect of chitosan varied with the difference of the used concentrations, as the concentration of 2000ppm completely inhibited the spores germination of *P. fimorum*, compared with control and acetic acid treatments, which achieved about 41.66×10^6 and 24.33×10^6 of the number of colony-forming units (Cfu), respectively. The results of the statistical analysis of the interaction between the chitosan types and the concentrations showed a significant effect on the spores germination rates, as micro-chitosan completely inhibited the spores germination of *P. fimorum* by using 100ppm concentration, compared with 3×10^6 in the nano-chitosan treatment. Moreover, the results showed that using both types of chitosan coating achieved 100% of inhibition rates for Ochratoxin A productions.

Keywords: Chitosan, Penicillium fimorum, Ochratoxin A.

المقدمة

تمتاز الفطريات على قدرتها في انتاج مركبات سامة تعرف بالسموم الفطرية Mycotoxins في البيئة التي تعيش فيها مسببة تلوث المواد الغذائية خاصة الثمار والفاكهة خلال فترة الخزن حيث تشكل نسبة المنتجات الزراعية الملوثة بالسموم الفطرية ٢٥% (Fernández-Cruz *et al.*, 2010; Salasib, 2020). تسبب السموم الفطرية مشاكل في صحة الانسان والحيوان من خلال استهلاك المواد الغذائية الملوثة بالسموم الفطرية (Omotayo *et al.*, 2019).

سم الاوكراتوكسين A هو احد نواتج الايض الثانوية الذي ينتج بشكل رئيسي من قبل العديد من الانواع التي تعود للفطر *Aspergillus* و *Penicillium* وهو عبارة عن جزيء dihydrocoumarin مرتبط برابطة اميدية مع phenylalanine (El Khoury and Atoui, 2010) اكتشف لاول مرة في افريقيا عام 1965 كاحد نواتج الايض الثانوية لاحد سلالات الفطر *A. ochraceus* (Li *et al.*, 2022). لهذا السم تأثيرات خطيرة في صحة الانسان منها السمية الكلوية والتي تمثل التأثير السام الرئيسي لسم الاوكراتوكسين A و تسمم الكبد و التسمم المناعي كما يعد احد مسببات الطفرات الوراثية (Kumar *et al.*, 2020). صنف سم الاوكراتوكسين A من قبل الوكالة الدولية لابحاث السرطان Agency for Research on Cancer (IARC) و منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) ضمن مجموعة 2B التي يحتمل ان تكون عامل مسبب للسرطان في الانسان (WHO and IARC, 1993). يتواجد سم الاوكراتوكسين A في العديد من المواد الغذائية المختلفة منها الحبوب و النبيذ والقهوة التي تمثل اهم المصادر الملوثة بسم الاوكراتوكسين A (Kumar *et al.*, 2020; Mine Kurtbay *et al.*, 2008) .

الكيتوسان عبارة عن سكر متعدد polyaminosaccharide مشتق من الكايتين chitin تم ازالة مجموعة الاسيتل منه ويعتبر الكيتوسان والكايتين ثاني اكثر المواد توفراً في الطبيعة من بعد السليلوز ، يتواجد الكايتين في القشريات منها سرطان البحر والروبيان وفي جدران خلايا الفطريات (Orzali *et al.*, 2017). استخدم الكيتوسان كمادة مضادة للفطريات مثل الفطر *Aspergillus flavus* و *Botrytis cinerea* و *P. expansum* و *Sclerotinia sclerotiorum* و *Alternaria alternata*

ISSN (Paper)-1994-697X (Online)-2706-722X

(Dias *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015). من صفات الكيتوسان قابليته على التحلل وهو مادة غير سامة ولا يسبب تلوث في البيئة (Aranaz *et al.*, 2021).

هدفت الدراسة الى تقييم كفاءة استخدام الكيتوساتن المايكروي والنانوي بهيئة طلاء في تثبيط انبات ابواغ الفطر *P. fimorum* وقابليته في انتاج السم اوكراتوكسين A كونها مادة لها القابلة على التحلل وامنة على البيئة.

المواد وطريقة العمل

العزلة المنتجة لسم الاوكراتوكسين A المستخدمة في الدراسة

استخدمت عزلة من الفطر *Penicillium fimorum* منتجة للسم اوكراتوكسين A ومشخصه جزيئيا ومسجلة في بنك الجينات تحت التسلسل تحت الرقم OQ568535.1 (Al-Ahmed *et al.*, 2023)

تحضير محلول الكيتوسان المايكروي والنانوي

تم تحضير محلول الكيتوسان القياسي بتركيز 2% باذابة ٢ غرام لكل من الكيتوسان النانوي من انتاج شركة Sangherb Company الصينية والمايكروي من انتاج شركة Cheng Du Micxy Chemical الصينية في ١٠٠ مل من محلول 1% من حامض الخليك Acetic acid، ثم نقل محلول الكيتوسان الى محرك مغناطيسي تحت درجات الغرفة الاعتيادية لمدة ساعتين بالنسبة للكيتوسان المايكروي ومدة عشر دقائق بالنسبة للكيتوسان النانوي، ثم حفظ كل من المحلول المايكروي والنانوي في الثلاجة على درجة حرارة 4 °م لحين الاستخدام (Thomas *et al.*, 2016).

تاثير الكيتوسان في انبات ابواغ الفطر *Penicillium fimorum* بطريقة طلاء الطبق

حضرت تراكيز مختلفة من الكيتوسان المايكروي والنانوي هي (100 و 200 و 1000 و 2000) جزء بالمليون) باستخدام المعادلة الاتية:-

$C_1V_1 = C_2V_2$

C_1= يمثل التركيز الاول

V_1= الحجم الاول

C_2= التركيز الثاني

V_2= الحجم الثاني

اضيف 1 مل من كل تركيز الى سطح الوسط الزرعي PDA المحضر مسبقاً ونشر داخل الطبق لحين يغطي سطح الوسط الزرعي بشكل كامل ثم تركت الاطباق لمدة يوم. اضيف ١ مل من معلق بوغي بتركيز 10^{-6} للفطر *P. fimorum* ونشر فوق سطح الطبق الحاوي على وسط PDA ثم حضنت جميع الاطباق لمدة 3 ايام. بعد مرور 3 ايام حسب عدد الوحدات المستعمرات النامية باستخدام برنامج تحليل الصور Image J وقدر عدد الوحدات اللقاحية حسب المعادلة الاتية: -

عدد الوحدات اللقاحية = عدد المستعمرات النامية × مقلوب التخفيف

www.misan-jas.com
ISSN (Paper)-1994-697X (Online)-2706-722X

استخلاص سم الاوكراتوكسين A من الطبق

تم استخلاص سم الاوكراتوكسين A من جميع مستعمرات الفطر المعاملة وغير المعاملة بالكيتوسان بعد ١٠ ايام عند درجة حرارة ٢٥ °م ايام وذلك باخذ أقراص من مستعمرة كل معاملة باستخدام الثاقب الفليني من مناطق عشوائية في الطبق بوزن 2 غرام لكل معاملة ثم هرست القطع ونقلت الى قناني صغيرة سعة 5 مل. اضيف 2.5 مل من خليط (Chloroform/ Formic acid) بنسبة (99/1) لكل عينة. تم مزج كل معاملة باستخدام vortex لمدة 30 دقيقة. بعدها تم سحب 2 مل من كل معاملة بحذر ونقلت الى قناني زجاجية. جففت جميع المعاملات باستخدام الحمام المائي على درجة 80 °م لحين تبخر محتوى كل القناني الزجاجية بشكل تام. ثم تم اضافة 2 مل من Methanol لكل معاملة ورشحت المعاملات من خلال مرشح بكتيري مساحة مسامته 0.22 مايكرومتر. ثم حفظت جميع المعاملات عند درجة حرارة ٤ °م (Muñoz *et al.*, 2011).

تحضير السم القياسي

تم الحصول على السم القياسي OTA من شركة Sigma–Aldrich بوزن 1 ملغم، حضر التركيز الاساسي ١ ملغم/مل باضافة 1 مل من المذيب Chloroform HPLC الى قنينة السم القياسي المجفف ورجت جيداً لمدة دقيقتين. ثم حضرت تراكيز متدرجة للسم القياسي وتم استخدام تركيز 100 مايكروغرام/ مل.

التقدير الكمي لسم الاوكراتوكسين A باستخدام HPLC

استخدم جهاز الـ HPLC من شركة SYKAM الالمانية للكشف عن سم الاوكراتوكسين A. يتكون الطور المتحرك المستخدم من Acetonitrile: Distilled Water: Formic acid بنسب (50: 47: 3) على التوالي، عند معدل جريان عند 1 مل/ دقيقة ، واستخدم عمود الفصل ODS – C18 بطول ٢٥ سم وقطر ٤.٦ ملي متر، وكان كاشف التألق المستخدم (Em = ٤٤٥ نانومتر و Ex = ٣٦٥ نانومتر)، وكانت كمية الحقن 100 مايكرولتر، اما زمن الاحتجاز فقد كان 4.15 في دقيقة (Skarkova *et al.*, 2013).

وتم تقدير الاوكراتوكسن A بالاعتماد على المعادلة الاتية: –

$$\text{تركيز السم} = \frac{\text{تركيز المادة القياسية} \times \text{مساحة النموذج}}{\text{مساحة المادة القياسية}} \times \frac{\text{التخفيف}}{\text{وزن النموذج}} \times ١٠٠$$

وحسبت نسبة التثبيط لسم الاوكراتوكسي A من المعادلة الاتية: –

$$\%\text{التثبيط} = \frac{\text{تركيز السم في السيطرة} - \text{تركيز السم في المعاملة}}{\text{تركيز السم في السيطرة}} \times ١٠٠$$

ISSN (Paper)-1994-697X (Online)-2706-722X

النتائج والمناقشة

تاثير الكيتوسان في انبات ابواغ الفطر بطريقة طلاء الطبق

اظهرت نتائج هذه التجربة ان استخدام الكيتوسان المايكروي او النانوي بهيئة طلاء خفض في انبات ابواغ الفطر *P. fimorum* في الطبق عند جميع التراكيز المستخدمة وخاصة عند تركيز ٢٠٠٠ جزء بالمليون الذي منع انبات ابواغ الفطر *P. fimorum* بشكل تام لكل من الكيتوسان المايكروي والنانوي شكل (١) مقارنة مع اعداد الابواغ النابتة في السيطرة وحامض الخليك ١% والتي بلغت 41.66×10^6 و 24.33×10^6 على التوالي كما مبين في جدول (١).

تتفق نتائج هذا الاختبار مع دراسات سابقة حيث اشار Li *et al.* (٢٠٢٠) الى ان تأثير الكيتوسان يزداد مع زيادة تركيز الكيتوسان المستخدم حيث ادى الى خفض في معدل انبات ابواغ الفطر *P. expansum* بنسبة بلغت ٩%. كما اشار Meng *et al.* (٢٠٢٠) الى قدرة الكيتوسان في تثبيط نمو ابواغ الفطر *A. ochraceus* المنتج لسم الاوكراتوكسين A حيث ادى الى خفض معدل الانبات الى ٣٦% و ١٩% عند كل من تركيز ٠.٠٥% و ٠.١% على التوالي. وفي دراسات سابقة اشير الى ان للكيتوسان تأثير مثبط لنمو فطريات مختلفة منها *Scerotina sclerotium* (Wang *et al.*, 2015) و *Colletotrichum gloeosporioides* و *C. oxysporum* و *P. steckii* (Xing *et al.*, 2021).

وضعت عدة تفسيرات حول الية الكيتوسان المضادة للفطريات يعتبر التفسير الاكثر قبولاً هو حدوث تفاعل كهروستاتسيكي ما بين المجاميع الامينية ذات الشحنة الموجبة HN_3^+ المتواجدة على سلسلة الكيتوسان و الشحنات السالبة المتواجدة على اسطح الخلايا الفطرية وهذا التفاعل يسبب حدوث خلل في نفاذية الغشاء البلازمي وبالتالي يؤدي الى موت الخلايا الحية (García–Rincón *et al.*, 2010; Olicón–Hernández *et al.*, 2015) ، وقد ينفذ الكيتوسان داخل غشاء الخلية ويسبب تحطيم للمكونات داخل الخلية الحية او يؤدي الى حدوث تعطيل في العمليات الفسيولوجية الطبيعية للفطر، او قد يرتبط الكيتوسان بشكل مباشر مع الـ DNA ويمنع استنساخه مسبباً تثبيطاً في عملية التعبير الجيني والتاثير في صناعة الانزيمات الضرورية لحياة الفطر (Palma–Guerrero *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2015).

جدول (١) تأثير طلاء الكيتوسان على انبات ابواغ الفطر في الطبق (الارقام × ١٠^٦)

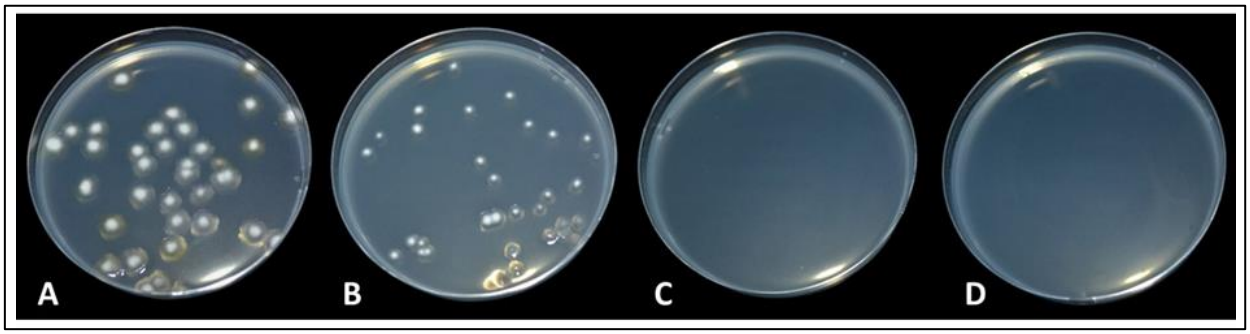
نوع الكيتوسان / تراكيز الكيتوسان	عدد الابواغ النابتة (مليون بوغ)		المعدل للتراكيز
	كيتوسان مايكروي	كيتوسان نانوي	
السيطرة	41.66	41.66	41.66^a
حامض الخليك ١%	24.33	24.33	24.33^a
١٠٠	0.00	3.00	1.50^b
٢٠٠	0.33	0.66	0.50^b
١٠٠٠	0.00	1.33	0.66^b
٢٠٠٠	0.00	0.00	0.00^b
المعدل للمعاملة	11.05	11.83	11.44

ISSN (Paper)-1994-697X (Online)-2706-722X

P للتراكيز = 0.000

P لنوع الكيتوسان = 0.797

P للتداخل = 0.468



شكل (١) تأثير طلاء الكيتوسان في انبات ابواغ الفطر *P. fimorum*، من اليسار الى اليمين الابواغ النباتية للفطر *P. fimorum*، (A) معاملة السيطرة و (B) حامض الخليك ١% و (C) معاملة الكيتوسان المايكروي و (D) معاملة الكيتوسان النانوي عند تركيز 2000 جزء بالمليون على التوالي.

تأثير طلاء الكيتوسان في تثبيط سم الاوكراتوكسين A

أظهرت النتائج هذه التجربة ان استخدام الكيتوسان بهيئة طلاء يغطي سطح الطبق بنوعيه المايكروي والنانوي خفض تركيز سم الاوكراتوكسين A المنتج من الفطر *P. fimorum* عند جميع التراكيز المستخدمة قياساً مع معاملة السيطرة التي بلغ فيها تركيز السم ١٢٩.٨ نانوغرام/غرام، تبين من النتائج ان تأثير الكيتوسان أزداد مع زيادة التركيز المستخدم حيث حققت النتائج اعلى نسبة تثبيط لانتاج السم بلغت 100% عند استخدام كل من تركيز ١٠٠٠ و٢٠٠٠ جزء بالمليون لكل من المادة المايكروية والنانوية جدول (٢) بينما حقق تركيز ١٠٠ جزء بالمليون ادنى نسبة تثبيط والتي بلغت ٦١.٢٠% من بين تراكيز الكيتوسان الاخرى. تتفق هذه النتائج مع دراسات اخرى اشارت الى قدرة الكيتوسان في تثبيط السموم الفطرية، فقد وجد Mine Kurtbay *et al.* (٢٠٠٨) ان استخدام الكيتوسان ادى الى تثبيط سم الاوكراتوكين A من النبيذ الاحمر بنسبة تراوحت من ٦٠-١٠٠%. وقد اشار Cota-Arriola *et al.* (٢٠١١) ان استخدام الكيتوسان سبب انخفاض لسم الافلاتوكسين B_1 المنتج من قبل الفطر *A. parasiticus*. و اشار Zachetti *et al.* (٢٠١٩) الى قدرة الكيتوسان في خفض السم deoxynivalenol (DON) المنتج من قبل الفطر *Fusarium graminearum* .

يمكن ان يكون سبب تأثير الكيتوسان في تثبيط سم الاوكراتوكسين A بسبب حدوث تفاعل بين شحنة السم السالبة مع مجاميع NH_2 الموجبة في الكيتوسان (Mine Kurtbay *et al.*, 2008).

وقد يعود سبب تثبيط سم الاوكراتوكسين A نتيجةً الى قدرة الكيتوسان على ادمصاص السموم الفطرية وذلك بسبب وجود المجاميع الامينية والكاربوكسلية في الكيتوسان فقد اشير في دراسات سابقة الى قدرة ادمصاص سموم فطرية منها الافلاتوكسين B_1 و الاوكراتوكسين A (Pirouz *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2015).

ISSN (Paper)-1994-697X (Online)-2706-722X

جدول (٢) تأثير طلاء الكيتوسان في تثبيط السم اوكراتوكسين A.

تراكيز الكيتوسان	% لتثبيط سم الاوكراتوكسين A		المعدل للتراكيز
	مايكروي	نانوي	
١٠٠	60.55^{d}	61.86^{c}	٦١.٢٠
٢٠٠	100^{a}	71.88^{b}	٨٥.٩٤
١٠٠٠	100^{a}	100^{a}	١٠٠
٢٠٠٠	100^{a}	100^{a}	١٠٠
المعدل للمعاملة	90.13	83.43	86.78

* الارقام التي متبوعة بحروف متشابهة لايوجد بينها فروق معنوية احصائياً حسب اختبار Kruskal–Wallis Test و Mann–Whitney Test.

الإستنتاج

تبين من النتائج قدرة الكيتوسان لكل من النوع المايكروي والنانوي في خفض اعداد الابواغ النابتة للفطر *P. fimorum* في الطبق، كما تبين ان معاملة الفطريات بطلاء الكيتوسان ادى الى تثبيط انتاج الفطر *P. fimorum* لسم الاوكراتوكسين A وقد تناسب زيادة نسبة تثبيط سم الاوكراتوكسين A طردياً مع زيادة تركيز الكيتوسان المستخدم.

المراجع

Al-Ahmed, M. M., Fayyadh, M. A., & Al-Saad, L. A. (2023). A qualitative and quantitative detection of Ochratoxin A and identification of its producing fungi in apple fruits. Kufa Journal For Agricultural Sciences. (inpublushed process).

Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 19). https://doi.org/10.3390/polym13193256

Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., López-Franco, Y. L., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Antifungal effect of chitosan on the growth of Aspergillus parasiticus and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, *60*(6), 937–944. https://doi.org/10.1002/pi.3054

Dias, A. M., dos Santos Cabrera, M. P., Lima, A. M. F., Taboga, S. R., Vilamaior, P. S. L., Tiera, M. J., & de Oliveira Tiera, V. A. (2018). Insights on the antifungal activity of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against Aspergillus flavus. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 196, pp. 433–444). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.032

El Khoury, A. E., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin a: General overview and actual molecular status. In *Toxins* (Vol. 2, Issue 4, pp. 461–493). https://doi.org/10.3390/toxins2040461

Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., & Tadeo, J. L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 1, Issue 2, pp. 113–122). https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.03.002

García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sanchez, M. G., Hernandez-Lauzardo, A. N., Peña-Díaz, A., & Velazquez-Del Valle, M. G. (2010). Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of Rhizopus stolonifer (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *97*(3), 275–278.

Kumar, P., Mahato, D. K., Sharma, B., Borah, R., Haque, S., Mahmud, M. M. C., Shah, A. K., Rawal, D., Bora, H., & Bui, S. (2020). Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon*, *187*, 151–162.

Li, M., CHEN, C., XIA, X., GARBA, B., SHANG, L., & WANG, Y. (2020). Proteomic analysis of the inhibitory effect of chitosan on Penicillium expansum. *Food Science and Technology*, *40*(1), 250–257. https://doi.org/10.1590/fst.40418

Li, X., Ma, W., Ma, Z., Zhang, Q., & Li, H. (2022). Recent progress in determination of ochratoxin a in foods by chromatographic and mass spectrometry methods. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 62, Issue 20, pp. 5444–5461). https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1885340

Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M., & Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against Aspergillus ochraceus and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, *158*, 1063–1070. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.213

Mine Kurtbay, H., Bekçi, Z., Merdivan, M., & Yurdakoç, K. (2008). Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(7), 2541–2545.

Mine Kurtbay, H., Bekçi, Z., Merdivan, M., & Yurdakoç, K. (2008b). Reduction of Ochratoxin A Levels in Red Wine by Bentonite, Modified Bentonites, and Chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(7), 2541–2545. https://doi.org/10.1021/jf073419i

Muñoz, K., Vega, M., Rios, G., Geisen, R., & Degen, G. H. (2011). Mycotoxin production by different ochratoxigenic Aspergillus and Penicillium species on coffee- and wheat-based media. *Mycotoxin Research*, *27*(4), 239–247. https://doi.org/10.1007/s12550-011-0100-0

Olicón-Hernández, D. R., Hernández-Lauzardo, A. N., Pardo, J. P., Peña, A., Velázquez-del Valle, M. G., & Guerra-Sánchez, G. (2015). Influence of chitosan and its derivatives on cell development and physiology of Ustilago maydis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *79*, 654–660.

Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M., & Babalola, O. O. (2019). Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. In *Toxicological Research* (Vol. 35, Issue 1, pp. 1–7). https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001

Orzali, L., Corsi, B., Forni, C., & Riccioni, L. (2017). Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease. In *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. InTech. https://doi.org/10.5772/66840

Palma-Guerrero, J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. V, & Read, N. D. (2009). Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of Neurospora crassa in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, *46*(8), 585–594.

Pirouz, A. A., Karjiban, R. A., Bakar, F. A., & Selamat, J. (2018). A novel adsorbent magnetic graphene oxide modified with Chitosan for the simultaneous reduction of mycotoxins. *Toxins*, *10*(9), 361. https://doi.org/10.3390/toxins10090361

Salasib, A. (2020). A Review of Ochratoxin A Occurrence, Condition for the Formation and Analytical Methods. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 180–185. https://doi.org/10.17352/2455-815X.000071

Skarkova, J., Ostry, V., Malir, F., & Roubal, T. (2013). Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*, *46*(10), 1495–1504.

https://doi.org/10.1080/00032719.2013.771266

Thomas, S., Soloman, P. A., & Rejini, V. O. (2016). Preparation of Chitosan- CMC Blends and Studies on Thermal Properties. *Procedia Technology*, *24*, 721–726. https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.201

Wang, Q., Zuo, J., Wang, Q., Na, Y., & Gao, L. (2015). Inhibitory effect of chitosan on growth of the fungal phytopathogen, Sclerotinia sclerotiorum, and sclerotinia rot of carrot. *Journal of Integrative Agriculture*, *14*(4), 691–697. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60800-5

World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, *56*.

Xing, K., Zhu, X., Peng, X., & Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 35, Issue 2, pp. 569–588). https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3

Xing, Y., Yi, R., Yang, H., Xu, Q., Huang, R., Tang, J., Li, X., Liu, X., Wu, L., Liao, X., Bi, X., & Yu, J. (2021). Antifungal Effect of Chitosan/Nano-TiO2 Composite Coatings against Colletotrichum gloeosporioides, Cladosporium oxysporum and Penicillium steckii. *Molecules*, *26*(15), 4401. https://doi.org/10.3390/molecules26154401

Zachetti, V. G. L., Cendoya, E., Nichea, M. J., Chulze, S. N., & Ramirez, M. L. (2019). Preliminary study on the use of chitosan as an eco-friendly alternative to control fusarium growth and mycotoxin production on maize and wheat. *Pathogens*, *8*(1), 29. https://doi.org/10.3390/pathogens8010029

Zhao, Z., Liu, N., Yang, L., Wang, J., Song, S., Nie, D., Yang, X., Hou, J., & Wu, A. (2015). Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. *Food Control*, *57*, 362–369. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.014