عزل وتشخيص بعض أنواع فطر Aspergillus من البقوليات في مدينة سوق الشيوخ واختبار قدرتها على أنتاج الأفلاتوكسين على أوساط مختلفة

م. م زينب حظي فرهود

أ.د.ياس خضير عباس

قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ذي قار

الناصرية ، العراق

amjednaser6@gmail.com

الملخص:

جمعت 50 عينة من بذور البقوليات وهي (العدس *Lens exculenta* والحمص *Cicer arietinum* والفاصولياء البيضاء *Phaseolus vulgaris* والماش *Vign anilotca* والفول (الباقلاء) *Vicia faba* وتعود جميعها الى العائلة البقولية Leguminosae) بواقع 10عينات لكل محصول. ووجد أن 70% من هذه العينات كانت ملوثة بأنواع جنس الفطر *Aspergillus* أذ تم عزل وتشخيص ستة أنواع تابعة لهذا الجنس هي:

Aspergillus flavus، *A.niger* ، *A .ochraceus*، *A .parasiticus*، *A .versicolor*، *A. ustus*. ولوحظ أن النوع *A .parasiticus* هو الأكثر ظهوراً وترددا من بقية الانواع، تلاه النوع *A.flavus*. وجد أن بذور الماش هي الأكثر إصابة بهذا الفطر مقارنة ببذور الحمص والفاصولياء . وكما تبين أن جميع الأنواع المعزولة لها القابلية على أنتاج سم الأفلاتوكسين.

Summary :

Collected 50 samples from the seeds of a legume (lentils, chickpeas and beans, white beans and mash (beans)) They are related to herbs family Leguminosae by 10 samples of each crop. It was found that 70% of these samples were contaminated with fungus *Aspergillus* species was isolated and diagnosis six types are relatedto this genus are:

Aspergillus flavus,, A.niger, A.ochraceus, A.parasiticus, A.versicolor, A. ustus. It was noted that the kind *A.parasiticus* is the most visible and the rest of the reluctance of fungi, followed by the type *A.flavus*. It was found that the seeds of mash are most affected by this fungus compared to seeds of chickpeas and beans. Appeared in this study that all the isolated species have the ability to produce aflatoxin.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus* , الأفلاتوكسين ، الفاصولياء البيضاء

المقدمة :

تتعرض كثير من الحبوب إلى التلوث بمختلف الكائنات الحية المجهرية ومنها الفطريات وسمومها , و السموم الفطرية تسبب ضرراً لصحة الإنسان عند استهلاكها وهي توجد بصورة طـــبيعية في الحبوب والأعلاف والبيئة بصورة عامة , لذا يجب تقليل نسبة بهذة السموم قدر المستطاع على الحبوب وذلك لحد من أثارها السلبية و الـسيطرة عليها فيما بعد (عبد الحميد ,1999) لذا وضع في كثير من الدول ما يعرف بالسيطرة النوعية لمنع النمو الفطري على المنتجات الغذائية وأن التلوث الفطري يعد خطرا على صحة الانسان وذلك بسبب قدرة العديد من الفطريات على إنتاج السموم لا سيما سموم الافلاتوكسين.وتعتبر سموم الافلاتوكسين منتجات ايضية ثانوية تنتج بشكل خاص من للفطرين *Aspergillus flavus*و*A .parasiticus* ولها مضار على صحة الإنسان كونها مسرطنة ومطفرة ومجهدة ومشوهة للأجنة أضافة لتأثيراتها على العديد من الفعاليات الحيوية (Groopman *etal*.,1990).

تم أكتشاف الافلاتوكسين لأول مرة عام 1961نتيجة لظهور مرض لم يكن معروفا أنذاك أطلق علية Turkey X diseaseوالذي ادى الى فقدان (100)الف من صغار الدجاج الرومي في انكلترا (Goldblatt,1969) و فحصت المادة الغذائية ووجد أن نسبة الجريش الفستق البرازيلي أحتوت على هايفات فطرية ولم تلاحظ في الفستق مواد سامة .تمكن (Sargent *etal*.,1961)) من الحصول على عزلة نقية لنوع *A. flavus* من الفطريات الموجودة في الفستق شديد السمية .كما امكن لاحقا أستخلاص مادة كيميائية من فطر *A. flavus* بواسطة الكلوروفوم.و عند اجراء التحليل والعزل بتقنية الكروموتوغرافي للمستخلص, وجد ان لهذة المادة Rf يقارب 0.7. وتبين أن لهذة المادة أعراض سمية للنبات مشابهة لمرض Turkey X disease.

وقد حددت منظمة الصحة العالمية الحدود المسموح بها من سموم الافلاتوكسين كـحد أعلى في أغذيةالكبار(20) جزءاً بالبليون ولا يسمح بها مطلقاً في أغذية الأطفال(WHO,1079; الحمداني 2006). أن أشهر السموم الفطرية وأكثرها خطورة هو سم الافلاتوكسين(Aflatoxin) إذ أن أكتشافه فسح المجال أمام سموم الفطريات من الأغذية. أن تسمية الأفلاتوكسين مأخوذة من الأحرف الأولى لجنس ونوع فطر *Aspergillus flavus* ، ومن أنواع الأفلاتوكسين هما B_1 ,B_2 واللذان يعطيان توهجاً أزرق تحت الموجات الطويلة للأشعة فوق البنفسجية ولهذا أشتق الحرف B من كلمة Blueو G_1 ,G_2 حيث يعطيان توهجاً أخضر لهذا أشتق الحرف G من كلمة(Green). كما عزل نوعان منه من حليب الأبقار المتغذية على عليقة حاوية على الأفلاتوكسين هما M_1، M_2 أشتق أسماهما من كلمة حليب Milk (الدليمي،1976). أن أشد أنواع الأفلاتوكسين خطورة هو النوع B_1 مقارنة بالأنواع الأخرى ، وهذا السم تنتجه معظم الأنواع التي تعود لجنس الـ *Aspergillus* وخاصة *A. flavus*والذي يلوث طبيعيا عددا من المواد الغذائية مثل بذور الذرة والفول السوداني (Diener& Davis 1969; Heathcote&Hibbert 1978) أن جميع أنواع الحبوب المحصودة هي أوساط ملائمة لنمو أنواع مختلفة من الفطريات عند توفر الظروف البيئية المناسبة للنمو من درجات الحرارة والرطوبة (غريب، 1986).و قد يعود هذا إلى ان بعض الفطريات تصيب المحصول اثناء تواجده في الحقل وتنـــتقل معه إلى المخزن وعند توفر الظروف الملائمة لنموها في المـخزن تنمو وتتـكاثر بشكل أكبر من بـقية الأجناس فتصبح الإصابة بها عالـــــية مقارنة بالأجناس الاخرى (Ahmad,1993) يتمكن جنس الفطر*Aspergillus*

من النمو في مستويات رطوبية منخفضة ومديات حرارية واسعة قد لا تلائم نمو فطريات الاخرى وهذا يتفق مع ما توصل إليه(Pitt *et al*.,1993; محمد ,2003). أن الهدف من هذة الدراسة هو عزل وتشخيص انواع *Aspergillus* التي تلوث البقوليات في محافظة ذي قار كونها تعد غذاء أساسي لسكان هذة المحافظة .

المواد وطرائق العمل: Materials and methods

عزل وتشخيص الفطريات:

جمعت (50) عينة من بذور البقوليات (العدس والحمص والفاصولياء البيضاء والماش والباقلاء)من الاسواق المحلية لقضاء سوق الشيوخ في محافظة ذي قار ، وبمعدل 10 عينات لكل نوع، وضعت البذور في أكياس نايلون وعلمت ووضعت في المختبر. غمرت هذه العينات في محلول هايبوكلوريدات البوتاسيوم KoH بتركيز 10% ولمدة 1- 2دقيقة لتعقيم السطح الخارجي (عبد الحسين وأخرون ,2011).ثم غسلت البذور بالماء المقطر المعقم لأزالة أثار المادة المعقمة ، بعدها وضعت على سطح الوسط الزرعي وبمعدل بذرتان لكل نوع وبخمس مكررات للعينة الواحدة. أستخدم الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar(PDA) حسب طريقة (Emmons *et al*, 1974) حضنت العينات بدرجة حرارة 1±25م.ثم فحصت الأطباق بعد 4 أيام من الحضن وذلك لعزل وتشخيص فطريات أنواع جنس *Aspergillus* وأستخدم المفتاح التصنيفي الموضح من (Raper & Fund, 1977) لتشخيص الأنواع المعزولة من هذا الجنس باتباع المراجع.

(Ellis,1994; Dehoog &Guarro,1995;Midgley *et al*.,1997). وأستخدم الوسط نفسه لعزل وتنقية وأدامة الانواع المعزولة .

وتم حساب نسبة التردد % Frequency (الموسوي ,1998) بالقانون الآتي:

$$\text{نسبة التردد} = \frac{\text{عدد مستعمرات النوع الواحد}}{\text{عدد المستعمرات الكلي لجميع الانواع الفطرية}} \times 100$$

وكذلك تم حساب نسبة الظهور أو الحدوث (% Occurrence)بالقانون الاتي :

$$\text{نسبة الظهور} = \frac{\text{عدد ظهور النوع الواحد}}{\text{عدد العينات الكلي}} \times 100$$

دراسة قابلية الأنواع على إفراز سموم الأفلاتوكسين:

درست قابلية الأنواع المعزولة في هذه الدراسة على إنتاج سموم الافلاتوكسين باستخدام الوسطين Potato Dextrose Agar (PDA) حسب طريقة (Emmons *et al*, 1974)والوسط الزرعي Sucrose Yeast Extract(YES) حسب طريقة (Davis *et, al*, 1966). وذلك من أجل معرفة تأثير نوع الوسط الزرعي على إنتاج الافلاتوكسين. إذ تم نقل جزء من المستعمرة الفطرية النقية إلى وسط اطباق بتري قطر 9سم الحاوية على أحد الوسطين (PDA) أو (YEA) حضنت الأطباق بدرجة حرارة 1±25م ولمدة 7 أيام لغرض الحصول على مستعمرة جيدة النمو ,وللكشف عن تواجد سم الأفلاتوكسين استخدم محلول الامونيا بتركيز (25 %) وذلك بإضافة 0.2 مل من هذا المحلول في منتصف غطاء الطبق الزجاجي ثم قلبت الأطباق وحضنت عند درجة حرارة 25±1 م , تمت مراقبة الأطباق بعد اليوم الثاني من الحضن لملاحظة تغير لون قواعد المستعمرات فإذا تغيرت قاعدة المستعمرة إلى اللون الأحمر الوردي أو الأصفر البرتقالي كان ذلك دليلا على أن الفطر قادر على إنتاج الافلاتوكسين وبعكسه فأن الفطر غير قادر على الإنتاج (Lin and Dianese 1976 ؛ Saito and Machida 1999).

تأثير الحرارة على ثبات سموم الافلاتوكسين

اجري الاختبار وفق الطريقة المثبتة من Leviوجماعتة(1974) اذ حضرت 10دوارق زجاجية سعة 100سم 3 ووضع في كل منها 25غم من دقيق الخبز ,ثم لوثت على انفراد بالسم القياسيB1 بنسبة (0,7) والمعد لهذا الغرض من فبل شركة Roth الالمانية بشكل مسحوق متبلور . بعدها مزجت بخلاط كهربائي لمدة 10دقائق ,ثم عجنت كل منها بكمية من الماء وفرشت على صفائح معدنية وعوملت بالفرن الكهربائي عند درجة 300م للمدة 10 دقائق.

النتائج: Results

أشارت نتائج هذه الدراسة إلى تلوث بذور البقوليات في محافظة ذي قار كانت بنسب عالية، فوجد أن هناك 30 عينة كانت مصابة بنوع واحد او أكثر من أنواع الفطر *Aspergillus*من بين 50 عينة جمعت من (الحمص والماش والعدس والباقلاء والفاصولياء البيضاء) بنسبة 70%. أظهرت النتائج أن بذور الماش كانت أكثر البذور إصابة بالفطريات مقارنة ببذور الحمص والفاصولياء حيث ظهرت الإصابة في 9عينات أي بنسبة 90%يليه محصول العدس إذ ظهرت الإصابة في 7عينات أي بنسبة 70%بينما كان محصول الفاصولياء

البيضاء هو الأقل إصابة إذ لوحظ أن 5 عينات كانت مصابة وبنسبة 50% (جدول 1). تم عزل وتشخيص 6 أنواع من جنس الـ *Aspergillus* كان النوع *A..parasiticus*أكثرها ظهوراً وترردامن الأنواع الأخرى حيث ظهر في 16 عينة (نسبة الظهور 32%) ويليه النوع *A.flavus*حيث ظهر في 14عينة أي بنسبة ظهور 28% وأظهرت أنواع *A. ochraceus* و *A. ustus* نسب ظهور متشابهة (6%) وكذلك نسب تردد متشابهة (**5.88**%)(جدول 1)

الأنواع الفطرية المعزولة	**نوع البقوليات**						
	العدس	**الحمص**	**الفاصول البيضاء**	**الفول الباقلاء**	**الماش**	**نسبة التردد Frequence%**	**نسبة الظهور** Occurrence%
A. flavus	***2**	**2**	**1**	**4**	**5**	**27.45**	**28**
A. Parasiticus	**3**	**2**	**2**	**3**	**6**	**31.37**	**32**
A. versicolor	**1**	**1**	**—**	**——**	**2**	**7.84**	**8**
A. ochraceus	**1**	**1**	**———**	**———**	**1**	**5.88**	**6**
A. ustus	**——**	**——**	**1**	**1**	**1**	**5.88**	**6**
A. niger	**3**	**2**	**1**	**2**	**3**	**21.56**	**22**
عدد العزلات الكلي	**10**	**8**	**5**	**10**	**18**		

جدول رقم (2) انواع جنس فطر *Aspergillus*المعزولة من بذور البقوليات والنسبة المئوية لترددها ونسبة ظهورها

— تمثل عدم ظهور العزلات

* تمثل عدد عزلات كل فطر جمعت من خمس مكررات

وعند الكشف عن قدرة هذه الأنواع على إفراز سموم الأفلاتوكسين تبين أن جميع الأنواع المعزولة لها قدرة على إنتاج هذة السموم عند نموها على الوسط الزرعي PDAوذلك من خلال تغير لون قواعد المستعمرات الفطرية إلى

اللون الأحمر الوردي أو الأصفر البرتقالي باستخدام محلول الأمونيا تركيز 25% كاشفاً (جدول 1). أما عند استخدام الوسط YES لوحظ أن أربعة أنواع فقط أظهرت قابلية على إفراز الأفلاتوكسين في حين النوعين *A. niger*، *A ustus* . لم يظهرا أي قدرة على إفراز الأفلاتوكسين على هذا الوسط. (جدول 2).

أظهرت النتائج معاملة عجينة مسحوق الخبز والمعامل مسبقا بالسم اتلف بالدرجات الحرارة العالية .ان للحرارة تأثيرا مخلخلا في تكسير وتحطيم هذة السموم ,أذ أتلف نتيجة المعاملة الحرارة 90% من كميو السم المضاف . وهذا ما أبدة وأشارة ألية ,Levi وجماعتة عام 1974حيث اعلن تلف السموم الفطرية بالدرجات الحرارة العالية .ان النتيجة تمنح امل بقلة المتاعب والمشاكل الصحية المترتبة نتيجة تراكم وتواجد هذة السموم في الاغذية التي تمر بدرجات حرارة عالية اثناء تحضيرها كوجبات غذائية للأنسان .في حين يجب الحذر الشديد من أستخدام اعلاف الحيوانات والتي يجب التأكد من خلوها من السموم أو التراكيز العالية منة قبل تقديمها للحيوانات كأعلاف كونها لا تعامل بالحرارة مسبقا .

جدول (2)الكشف عن كفاءة أنواع فطر *Aspergillus* على أنتاج وأفراز سموم الافلاتوكسين في الوسطين (PDA) و (YES) وعند درجة الحرارة 25م

الأنواع الفطرية	الأوساط الزرعية	
	PDA	YES
A. flavus	+	+
A. Parasiticus	+	+
A. versicolor	+	+
A. ochraceus	+	+
A. ustus	+	-
A. niger	+	-

المناقشة: Discussion

أظهرت الدراسة تلوث بذور البقوليات بالعديد من الأنواع الفطرية وخاصة أنواع جنس *Aspergillus* والذي تم دراسته في هذا البحث, وهذا يتفق مع ما أشارت إليه الدراسات إلى ملائمة الحبوب لنمو أنواع هذا الجنس، فضلاً عن الكثافة النسبية للسبورات التي تنتجها ((Eaton &Groopman, 1994 وامتلاك أنواع هذا الجنس القدرة على إفراز عدد كبير من الأنزيمات المحللة للمواد اغذائية والتي تستفاد منها في تحليل مكونات المواد الاساسية والاستفادة منها في النمو ومن ثم سعة انتشاره .فضلا عن قابلية بعض أنواع *Aspergillus* النمو بوجود محتوى منخفض من الرطوبة

. أشارت دراسات أخرى الى أن النوع *A.flavus* ينمو بغزارة في العديد من المحاصيل الزراعية ومنها الحبوب كالذرة وفستق الحقل والرز وغيرها (Pitt *et.al.*1993,1994, Eaton &Groopman,). وهذا ما يتفق مع نتائج الدراسة الحالية إذ ظهر هذا الفطر بنسبة عالية.وقد يعزى سبب النسبة العالية من الحبوب كانت مصابة بالفطريات، الى وجود عوامل مساعدة تزيد من نسبة الإصابة مثل الإصابة بالحشرات والعناكب ونوعية المحصول واختلاطها بمواد أخرى ملوثة أثناء الحصاد والخزن (عباس، 1983).أن مصادر تلوث الحبوب ومنتجاتها عديدة ومختلفة إذ يحدث هذا التلوث قبل وبعد الحصاد وكذلك أثناء التخزين والتسويق وان شدة التلوث تعتمد على عوامل كثيرة منها المحتوى الرطوبي ودالة الحموضة pHومدة الخزن وطبيعة البذور إضافة إلى مدى تعرضها للإصابة الحشرية والأحياء ألمجهريه وعوامل أخرى . ويحدث التلوث بالفطريات عن طريق الأبواغ التكاثرية الكثيرة العدد والواسعة الانتشار أو عن طريق تجزأ الغزل الفطري (محمد ,Samson *et al.*,1995;2003).بين الراوي(2000)أن المحتوى الرطوبي للحبوب المخزونة وكذلك درجة الحرارة ووجود الحشرات والقوارض أثناء التخزين والتسويق كلها تلعب دوراً كبيراً في تلوث الحبوب.ان وجود حشرات المخازن يعد من العوامل الحيوية المسؤولة عن زيادة الإصابة بفطريات المخازن حيث تلعب دوراً هاماً في نقل ونشر الفطريات من الحبوب المصابة إلى السليمة, وان تغذية الحشرات على الحبوب يسبب تحطيم غلافها البذري الذي هو الخط الدفاعي الأول ضد إصابة الحبوب بالفطريات كما ان مواقع تغذية الحشرات يعد عاملاً مساعداً لدخول الفطريات وانتشارها(العراقي ,2004). لاحظ داغر وأخرون (2009) أن النوع *A.flavus* هو الأكثر ظهوراً من بقية الفطريات على بذور الذرة الصفراء والرز والحنطة المزروعة في محافظة ميسان ، تلاه النوع *A.parasiticus*. ووجد أن بذور الذرة الصفراء هي الأكثر إصابة بهذا الفطر مقارنة ببذور الحنطة والرز. وظهر في هذه الدراسة أن جميع الأنواع المعزولة لها القابلية على أنتاج سم الأفلاتوكسين.أشارت المعلومات أن انتاج الوحدات التكاثرية وتتحررها بعد أنفصلها عن حواملها عندما يستكمل تكوينها وتنضج وتحملها الرياح والمياه أو الحشرات إلى أماكن أخرى وتعمل هذه العوامل على زيادة انتشار الوحدات الفطرية بعيداً عن منشأ المستعمرة الفطرية .

المصادر: References

أولا: المصادر العربية

1. الحمداني , سفانه غائب حمدون . 2006. دراسة التأثيرالتثبيطي لمزيج بعض المستخلصات النباتية الطبية على الفطريات المنتجة لسموم الأفلاتوكسين الملوثة لبعض الأغذية . رسالة ماجستير . كلية العلوم , جامعةالموصل.ص 1-16.
2. داغر ،غسان مهدي ،علي عبد الواحد قاسم ، طلال حسين صالح ، 2009. تشخيص أنواع الأسبرجلس في بذور الذرة والرز والحنطة في ميسان وأختبار قدرتها على أفراز الافلاتوكسين على أوساط مختلفة .مجلة ميسان للدراسات الاكاديمية .المجلد الثامن .العددالخامس عشر .ص200.
3. -الدليمي، خلف صوفي (1976).التسمم الغذائي - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد - كلية الزراعة ص 117.
4. الراوي , علي عبد علي حسن . 2000. مسح ودراسة الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين في حبوب الذرة المحزونة وتداخلها مع خنفساء الحبوب الشعرية (خنفساء الخابرا) .رسالة ماجستير , كلية العلوم . جامعة الموصل .ص 10.
4. عبد الحميد,زيدان هندي .1999.التسمم الغذائي والملوثات الكيمياوية .الطبعة الاولى ,الدار العربية للنشر والتوزيع ,القاهرة ,ج. م. ع
5. العراقي , رياض أحمد . 2004. التقييم المختبري لمساحيق أربعة نباتات على عدد من حشرات المواد المخزونة . مجله علوم الرافدين التي تصدرها كلية العلوم . جامعة الموصل . المجلد ,1 العدد (2) .
6. عباس، ياس خضير، 1983. المحتوى الفطري والتلوث بالأكراتوكسين (A) لبعض الحبوب العراقية، أطروحة ماجستير، جامعة بغداد – كلية العلوم.
7. عبدالحسين ,محمد محسن ,عبد الرضا سرحان ,عدنان حمد عبيد الحمداني . 2011.الكشف عن قابلية بعض الفطريات الأنتهازية المسببة لالتهابات الاذن الوسطى على أنتاج الافلاتوكسين .مجلة كلية المأمون الجامعة .العدد السابع عشر .ص 159.
7. غريب، فاروق حبيب(1986).فسلجة الهضم وتغذية المجترات -الجزء الثاني-القسم الثالث جامعة البصرة - كلية الزراعة - ص(1173) (كتاب مترجم.تأليف:دي.سي- جارج).
8. محمد ,سالم حسين. 2003. دراسة تلوث بعض الحبوب ومنتجاتها بالفطريات المنتجة للسموم الفطرية في مدينة البصرة . أطروحة دكتوراه , كلية الزراعة . جامعة البصرة .ص .142.
9. الموسوي , ليلى عبد اللطيف عبد علي . 1998. دراسة الفطريات الرمية والفطريات الممرضة لبادرات الباميا المتواجدة في ترب بعض مناطق البصرة ,رسالة الماجستير ,جامعة البصرة ـــــ كلية العلوم . ص21- 22.

ثانيا: المصادر الأجنبية

1.Ahmed ,S.K. 1993.Mycoflora changes and aflatoxin production stored blackgrom seed.Journal of Stored Production Reasearch .24(1) :33- 36.

2.Davis, N. D., Diener, U. L. and Eldridge, D.W. (1966). Production of aflatoxin B_1 and G_1 by *Aspergillus flavus* in asemi syntnetic medium. *Appl*. *Microbiol*. **14**: 378- 380.

3.Dehoogde ,G.S.and J.Guarro.1995.Atlas of clinical fungi Center albureauroor shimmel culture Universital Rovirai virgill,.Espan.pp720.

4.Diener,U.L. and Davis, N.D. (1969). Aflatoxin formation by*Aspergillus flavus* in: Aflatoxin (ed. By Golodblatt, L. A.)Academic press.New york PP.13 – 54.

5.Ellis,D.H.1994.clinical mycology .The human opport.unistic mycoses. Gillinghom. printerspty. Ltd,Australis.PP166.

6.Emmons,C.W., Binford,C.H.andutzx, J.P. (1974). Medical Mycology. 2nd ed. lea and febiger. philadelphia. pp. 508.

7.Eaton, D.L. and Groopman, J.D. 1994. The toxicology of Aflatoxins human health, veterinary, and agricultural significance. San ieg Diego: Academic press.

8.Essa, R.A (1996). Fungal flora in herbal drugs from Irag with aparticular reference to science sterigmatocystin producibility. Mscthesis.college of universty of Basrah. pp.

9.Goldblatt,L.A.1969.Aflatoxin Scientific back ground .Control ,and Implication Acadamic press NewYork and Londan ,pp.166.– 458.

10.Groopman,J.P.;Zarba,A.;Sheabar,F.;Wagon,G.N.;Montesano,R.and Wild,C.P.1990.Molecular Chemistry of aflatoxin B1 exposures in human population with high hepatitis Bvirus infection proc.Am.Cancer.Res.31:230-237.

11. Heathcote, J.G. and Hibbert, J.R. (1978) production of Aflatoxin.in:Aflatoxins: chemical and biological aspects, led.by Heathcote , J.G. and Hibbert, J.R.J. pp.16 –29.

12. Levei.C.P.Trenk,H.L.and Mohr,H.K.1974.study of the occurrence of Mycotoxine in green coffee bean .J.A .ssveAnnal .Chem .57;866-–870.

13 . lin,M.T. and Dianese, J.G.,(1976). Acoconut – Agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phyto -pathology.**66**: 1466-1499.

14 . Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bkudhasmai, Miscamble, B.F., Wheeler, K. A. and Tanboon,EK.P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. I. Nuts and oil seeds. Int. J. food Microbiol. 20:211- 226.

15 . Raper, K. B.and Fund, D.I. (1977). The genus *Aspergillus*.Ropert, E. Kriger publ. Co., Huntington, Newyork. p p.686.

16 . Saito, M., and machida, S. (1999). A .rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor.*mycoscience*. **40**: 205-208.

17.Sargent,K.A.Seheridan ,J.O.Kelly,andR.B.Caranghan .1961.Toxicity associated with certa in of ground nuts .Nature.192;1069———1097.

18 . Samsom, R.A., Hoekstra,E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. 1995. Introduduction to food borne fungi. CBS. The Netherlands

19 . Midgley,G.;Y.M.clayton ,and R.J.Hay.1997.Diagnosis in color med.