Investgation of Fungi Companied With Some Foodstuff and Efficiency of *Aspergillus flavus* Fungus in Production of Aflatoxin B_1 and B_2

التحري عن الفطريات المصاحبة لبعض المواد الغذائية وكفاءة الفطر *Aspergillus flavus* في إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 *

عقيل عبد نعمة بان طه محمد

جامعة كربلاء

* مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

المستخلص

أجريت تجارب مختبريه في مختبر الدراسات العليا بكلية التربية – قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء لتحديد مدى تلوث بعض المواد الغذائية كالحنطة *Triticum aestivum* والذرة *Zea mays* وفستق الحقل *Arachis hypogaea* وفستق الحلبي *Pistacia vera* وحب القرع العسلي *Cucurbita moschata* وحب عباد الشمس *Helianthus annus* بالفطريات لاسيما الفطر *Aspergillus flavus* والتي تم الحصول عليها عشوائياً من الشركة العامة لتجارة الحبوب / فرع كربلاء وسوق الدهان وسوق الجملة والأسواق المحلية . كما تم تحديد قابلية عزلات الفطر *A. flavus* المستحصل عليها من هذه الدراسة في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 .

بينت النتائج إن هنالك 547 عزلة فطرية تمثلت بـ (*Alternaria alternata* و *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و *Aspergillus terreus* و*Cladosporium cladosporsis* و *Fusarium oxyporium* و*Penicillium digitatum* و *Penicillium spinulosum* و *Penicillium* spp و *Rhizopus* spp) وان أكثر المواقع تلوثا بالفطريات هو سوق الدهان والذي سجل 216 عزلة ، إما سوق الجملة سجل ثاني أعلى موقع في التلوث الفطري إذ وصلت إعداد الفطريات إلى 155 عزلة ، في حين الأسواق المحلية سجلت 122عزلة ، وجاءت مخازن الحبوب في المركز الأخير من بين مواقع الجمع فسجلت اقل نسبة بالتلوث الفطري والتي بلغت 54 عزلة . ولم يختلف محتوى المواد الغذائية نسبياً من حيث الأنواع والأجناس المعزولة ، لكنها تختلف كماً فعينات الذرة الصفراء بلغت أعلى تلوث بالفطريات إذ كان العدد الكلي مساوياً إلى 123 عزلة , أما عينات الحنطة سجلت اقل نسبة فقد وصل العدد الكلي إلى 54 عزلة , في حين عينات حب القرع العسلي سجلت ثاني اكبر نسبة فقد وصلت إلى 110عزلة , تلتها عينات فستق الحقل وحب عباد الشمس وفستق الحلبي إذ سجلت (96 و90 و74) عزلة وعلى التوالي ، إذ كان أكثر الفطريات سيادة لجميع عينات الدراسة فطر *A. flavus* والذي سجل 99 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 18.1 % ، في حين الفطريات الأخرى سجلت نسبا اقل من ذلك .

أظهرت نتيجة الفحص هذا لـ 18 عزلة للفطر *A. flavus* قابلية 11 عزلة فقط لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 أي بنسبة 61.2 % , في حين 7 عزلات وبنسبة 38.8 % كانت غير منتجة لسم الافلا B_1 وB_2 .

Abstract

Laboratory experiments were carried out in the postgraduate laboratories, Biology Department – College of Education / Kerbala University . The study aimed to determine contamination extent of some foodstuff like wheat *Triticum aestivum* , corn *Zea mays* , groundnut *Arachis hypogaea* , pistachio *Pistacia vera* , honey pumpkin grain *Cucurbita moschata* and sunflower grain *Helianthus annus* with fungi, particularly *Aspergillus flavus* and the collections of the General Company for Grain Trade / Branch of Karbala, Al-Dehan market , the wholesale and local markets . Also determination of isolates fungus *A. flavus* has been done which obtained from this study in the production of aflatoxin B_1 and B_2.

The results showed that 547 fungal isolates were found included (*Alternaria alternata* , *Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* , *Cladosporium cladosporsis* ,*Fusarium oxyporium* ,*Penicillium digitatum* , *Penicillium spinulosum* , *Penicillium* spp and *Rhizopus* spp) More contaminated sites with fungal were Al-Dehan market with 216 isolates , and the wholesale market has the second highest location in contamination with 155 isolates, while the local market recorded 122 isolates, grain stores came in the last level among the sites with 54 isolate. These crops were not different in their content from genera and species , but they

differed in quantity, where the corn reached the highest contamination of fungi with 123 isolates , the wheat had the lowest percentage of the wholesale number 54 isolates , while honey pumpkin grain recorded the second largest proportion reached to 110 isolates , followed by groundnut, sunflower grain and pistachio which recorded(96, 90 and 74) isolates , respectively. The first fungus *A. flavus* that recorded 99 isolates at a percentage of 18.1% , while other fungi recorded lower rates.

Eighteen isolates of the fungus *A. flavus* only 11 isolates can produce aflatoxin B_1 and B_2 at a rate of 61.2%, while 7 with 38.8%were non-produced aflatoxin B_1 and B_2.

المقدمة Introduction

تتلوث المواد الغذائية بأبواغ الفطريات وأجزاء الغزل الفطري بواسطة الحشرات الحاملة لها أوعن طريق تلامس الأجزاء المصابة من النبات مع الأجزاء السليمة وتلعب الظروف البيئية من درجة حرارة ورطوبة ملائمة دوراً هاماً في زيادة هذا النوع من التلوث **[1]** , إذ تتلف كميات كبيرة من المواد , النباتية كل سنة بسبب تلوثها بالنواتج الايضية الفطرية المفرزه بفعل الفطريات السامة وهذا ما يكون ملحوظ بصورة واضحة في البلدان ذات المناخ الحار **[2]** , وبذلك يقدر 25% من هذه المحاصيل تصاب بالسموم الفطرية في جميع أنحاء العالم **[3]** .

ويعد الفطر *A. flavus* احد الأنواع الفطرية الواسعة الانتشار في المناطق المدارية وشبة المدارية والذي يسبب تلف المحاصيل ذات الخزن السيئ بفعل إفراز سم الافلا عليها ومن المحاصيل التي تتعرض إلى التلوث بهذا السم هي الفول السوداني والقطن والحبوب مثل الحنطة والشعير والذرة والرز بالإضافة إلى المكسرات مثل اللوز والجوز والفستق والبندق وحب الشمس **[4]** , وأن إفراز سم الافلا يعتمد بدوره على عدد من العوامل والتي تضم : المناخ والطراز الوراثي للنبات ونوع التربة وفعالية الحشرات وسقوط الأمطار غير الموسمية عند فترة الحصاد والخزن السيئ **[5]** , فقد أجريت دراسة مسحية لمنتجات الفسق في جنوب أمريكا إذ وجد 19 % من 1416 عينة ملوثة بسم الافلا ومستوى متوسط السم فقد بلغ 1ملغم/ كيلو, وفي تايلاند وجد 49 % من 216 عينة ملوثة بسم الافلا B_1 عند مستوى متوسط 424 مايكرو غرام / كيلو, وأكثر من 260 مايكرو غرام من سم الافلا لكل كيلو من الشوفان في السويد **[6]** , وفي السعودية وجد 22.75 % من 1600 عينة من منتجات الفستق ملوثة بسم الافلا وكان مستوى متوسط السم 16.25 مايكرو غرام /كيلو **[7]** , وفي العراق فقد وجد 0.11 **[8]** ملغم من سم الافلا B_1 لكل كيلو من الحنطة المستخدمة لتصنيع الحبية والبرغل والجريش .

ونظرا لخطورة تلوث الأغذية والأعلاف بهذه المركبات السامة فقد وضعت المنظمات العالمية ومنها المنظمة الأمريكية FDA حدودا للنسب المسموح وجودها من سموم الافلا في أغذية الإنسان والحيوان , فقد سمحت بالحد 20 مايكرو غرام /كيلو في أغذية البشرية، إما في أعلاف الأبقار فقد سمحت بالحد 300 مايكرو غرام / كغم , وفي الحليب يكون مستوى سم الافلا المسموح به 0.5 مايكرو غرام /كيلو **[9]** .

وبصوره عامة فقد قسمت الفطريات التي تصيب المحاصيل النباتية الى قسمين : (1) فطريات الحقل Field fungi : وتتمثل بالفطريات التي تصيب الحاصل في الحقل وتشمل بعض انواع *Fusarium* و*Alternaria* و*Cladosporium* , ونادراً ما تصيب المحاصيل في الخزن ، (2) فطريات الخزن Storage Fungi : والتي تنمو بسرعة على المحاصيل بعد الحصاد أي في مرحلة الخزن والتي بدورها تعتمد على درجة الحرارة والرطوبة , لكنها تتواجد بقلة قبل الحصاد وتشمل بعض انواع *Aspergillus* و *Penicillium* **[10]**. ومن جانب أخر لا يخفى على إن بعض الأنواع الفطرية تدخل في صناعة الأطعمة مثل الجبن والخبز وبعض المشروبات الكحولية بالإضافة إلى أنتاج بعض المضادات الحيوية Antibiotics **[11]** .

ونظراً للأهمية الاقتصادية للمواد الغذائية ، وتماسها المباشر بحياة الإنسان كونها تشكل الغذاء الرئيس له ، وإمكانية إحداثها تأثيرات ضارة بالصحة ناتجة عن تلوثها ببعض الأنواع الفطرية لذا هدفت الدراسة إلى عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبعض المواد الغذائية كالحنطة *Triticum aestivum* والذرة *Zea mays* وفستق الحقل *Arachis hypogaea* وفستق الحلبي *Pistacia vera* وحب القرع العسلي *Cucurbita moschata* وحب عباد الشمس *Helianthus annus* والتي جمعت من أربعة مناطق في محافظة كربلاء . والتحري عن عزلات الفطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسم الافلا B_1 و B_2 .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

جمع العينات

جمعت عينات الدراسة في شهر تشرين الأول خلال سنة (2010) من أربعة مواقع مختلفة لمحافظة كربلاء . إذ تم جمع 18 عينة والمتمثلة بثلاث أصناف من الحنطة *Triticum aestivum* والمتمثلة بالصنف المحلي والروسي والأمريكي من الشركة العامة لتجارة الحبوب / فرع كربلاء المقدسة وبواقع 100 غم لكل صنف ، إما الذرة *Zea mays* وفستق الحقل *Arachis hypogaea* وفستق الحلبي *Pistacia vera* وحب القرع العسلي *Cucurbita moschata* وحب عباد الشمس *Helianthus annus* فقد جمعت من ثلاث مناطق مختلفة شملت سوق الدهان وأسوق الجملة والأسواق المركزية وهي معرضة للاستهلاك البشري وبواقع 100 غم لكل عينة للمناطق المأخوذ منها وبصورة عشوائية وضعت العينات في أكياس نايلون وغلقت بأحكام وبعد ذلك نقلت العينات للمختبر وحفظت بدرجة حرارة المختبر نفسه لحين التحري عن العزلات الفطرية خلال مدة لم تتجاوز 3 أيام .

التحري عن العزلات الفطرية وتنقيتها

جرى التحري عن العزلات الفطرية في العينات المنتخبة . إذ عقمت البذرة سطحياً كل على حده بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (المستحضر التجاري فاست) بتركيز 1 % ولمدة 3 دقائق . غسلت البذور ثلاث مرات بالماء المقطرالمعقم بعد إن برد ثم جففت بورق ترشيح وزرعت على أطباق حاوية على وسط آكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم والمضاف له المضاد الحيوي كلورمفنيكول Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم/ لتر وبواقع خمس مكررات وخمسة بذور من كل نوع نباتي لكل منطقة , بعدها حضنت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 25 ±2°م لمدة 7 أيام**[12]** . نقيت العزلات الفطرية ، بأتباع طريقة النقل المتتالي للمستعمرات الفطرية على الوسط ألزرعي نفسه . شخصت الأنواع الفطرية بحسب أشكالها المورفولوجية وألوان المستعمرات على وسط PDA إضافة إلى الصفات التشخيصية لكل فطر **[13]** و **[14]** .

وتم حساب ما يلي :

1. **عدد العزلات الكلية**

تم حساب العدد الكلي للعزلات والأنواع الفطرية المعزولة لكل موقع من المواقع الدراسة .

2. **النسبة المئوية للظهور Occurrence %**

حسبت النسبة المئوية لظهور الأنواع الفطرية المعزولة للعينات المأخوذة من مواقع الدراسة باستخدام المعادلة التالية **[15]** :

النسبة المئوية للظهور = عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع/ عدد العينات خلال الدراسة x 100

3. **النسبة المئوية للتردد Frequency%**

تم حساب النسبة المئوية لتردد كل نوع من الأنواع الفطرية المعزولة للعينات المأخوذة من مواقع الدراسة باستخدام المعادلـة التالية **[16]** :

النسبة المئوية للتـردد = عدد عزلات النوع الواحد/ العدد الكلي للعزلات الفطرية x 100

اختبار قابلية عزلات الفطر *A. flavus* على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2

1 . إنتاج سم الافلاB1 و B2 على وسط PDA

اختبرت قابلية عزلات الفطر *A.flavus* على إنتاج سم الافلا B1 و B2 بتنميتها على وسط آكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) لمدة 15 يوم عند درجة حرارة 25 ± 2 وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة من الفطر .

2. استخلاص سم الافلا B_1 و B_2

استخلص سم الافلا B_1 وB_2 من مزارع العزلات بأتباع طريقة **[17]** أخذت عزلات الفطر *A. flavus* وقشطت خيوط الفطر من الوسط بواسطة سكينة نظيفة ومعقمة ثم سحقت بهاون خزفي ، وخلط الاخير بصورة جيدة مع وسط الفطر نفسه ، وضع المزيج الكلي في دورق مخروطي سعة 250 مل وأضيف إلية 50 مل من الكلوروفورم مع الأخذ بنظر الاعتبار شطف الهاون الخزفي بكمية قليلة من كلوروفورم وأضيف إلى الدورق ، بعدها وضع الأخير على المحرك المغناطيسي لمدة 20 دقيقة ومن ثم رشح باستعمال ورقة ترشيح من نوع (Whatman No-1) ، أضيف مرةً أخرى 50 مل من كلوروفورم إلى المزيج المتبقي في الدورق ووضع على المحرك المغناطيسي لمدة 15 دقيقة ورشح أيضاً باستعمال ورقة ترشيح من نوع (Whatman No-1) ، خلط الراشح الأول مع الثاني ووضع في الحمام المائي إلى حد الجفاف ، ومن ثم نقل إلى أنابيب محكمة الغلق ومغلفة بطبقة من الألمنيوم لتجنب تحلل السم بفعل الضوء ، وفي الأخير وضعت في الثلاجة لحين الكشف عن سم الافلا .

3. الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2على صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة

تم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 في مستخلصات مزارع عزلات الفطر *A. flavus* باستعمال صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة Thin Layers Chromatography (TLC) نوع Glass sheets silica gel قياس 20×20 سم مجهزة من شركة (Switzerland-Fluka) وسم الافلا القياسي Stander aflatoxin B_1, B_2 مجهز من قبل الشركة (U. S. A. - Promega). وبإتباع الطريقة المذكورة من قبل **[4]** ووفق الخطوات التالية :

a. أذيب المستخلص الجاف لكل عزلة في 1 مل من الكلوروفورم ورج بشكل جيد لضمان الإذابة الكاملة .
b. اخذ 10 مايكروليتر من كل عينة باستعمال أنبوبة شعرية Capillary tube ووضع بشكل بقع spots على الواح الكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وبمسافة 1.5 سم بين بقعة وأخرى وبمسافة 1.5 سم من الحافة السفلى للوح الفصل وتركت لتجف.
c. وضعت بقعة من سم افلا B_1 وB_2 القياسي المخضر بإذابة 1 ملغم من السم في 1 مل من الكلورفورم بالطريقة نفسها عند طرف لوحة TLC وتركت لحين الجفاف .
d. وضعت لوحة TLC في حوض الفصل المحتوي على نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (3:97) بحيث يكون مستوى المحلول تحت مستوى البقع و بعد وصول محلول الفصل إلى 2 سم من الحافة العلوية للوح أخرجت الصفائح وجففت بالهواء ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet (UV) لملاحظة التألق .
e. قورن تألق البقع الناتجة من مستخلصات العزلات ومن حيث مطابقة مسافة الترحيل واللون بتلك الناتجة من المادة القياسية ، واختيرت العزلة الأعلى إنتاجاً لسم الافلاB_1 وB_2 من خلال شدة التألق .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

التحري عن العزلات الفطرية في العينات

تم عزل (547) عزلة فطرية تمثلت بـ 10 أنواع من الفطريات تعود إلى 6 أجناس .

ويبين الجدول (1) إن أكثر المواقع تلوثا بالفطريات هو سوق الدهان والذي سجل 216 عزلة وبنسبة مئوية للتردد 39.4 % واحتل الفطر *A. flavus* اكبر عدد من بين الفطريات في هذا الموقع وصلت إلى 94 عزلة , إما الفطر *C. cladosporsis* فلم يظهر في هذا الموقع , وجاء الفطر *A. niger* في المرتبة الثانية إذ وصلت عدد العزلات إلى 54 عزلة ,في حين تراوحت إعداد الفطريات الأخرى بين (3 – 16) عزلة . إما سوق الجملة سجل ثاني أعلى موقع في التلوث الفطري إذ وصلت إعداد الفطريات إلى 155 عزلة وبنسبة مئوية للتردد 28.3 % و سجل الفطر *C. cladosporsis* أعلى عدد في هذا الموقع وصل إلى 36 عزلة , يليه *P. spinulosum* والذي سجل 31 عزلة , إما الفطر *A. flavus* لم يظهر في هذا الموقع , والفطريين *P.digitatum* و*Penicillium* spp فقد احتلا نسبة معتدلة وصلت إلى(27 و23) عزلة وعلى التوالي , إما الفطريات الأخرى لا تتجاوز إعدادها بين (1 – 16) عزلة . إما الأسواق المحلية فسجلت 122عزلة وبنسبة مئوية للتردد 22.5% إذ ظهر كل من الفطر *Penicillium* spp و *C. cladosporsis* و *Rhizopus spp* بعدد 25 عزلة , إما الفطر *A. niger* و *A. flavus* و *A.terreus* و *A. alternata* لم يظهروا في هذا الموقع في حين سجل الفطر *P. spinulosum* 21 عزلة , والفطران *P.digitatum* و *F . oxyporium* فقد احتلا نسبة مقاربه وصلت إلى 14 و12 عزلة على التوالي . وجاءت الشركة ألعامه لتجارة الحبوب / كربلاء في المركز الأخير من بين مواقع الجمع فسجلت اقل نسبة بالتلوث الفطري والتي بلغت 54 عزلة وبنسبة مئوية للتردد 9.8% وظهر فيها أكثر الفطريات سيادة *A. niger* وصل إلى 10 عزلة , إما *A.terreus* و *P. spinulosum* سجلا 9 عزلة , و *Rhizopus spp* سجل 8 عزلة , والفطران *A. flavus* و *C. cladosporsis* قد ظهر في 5 عزلة لكل منها , والفطريات الأخرى تراوح عددها بين (1 – 4) عزلة . ومن هذا فقد يتبين إن هناك اختلاف في تواجد الفطريات كماً لمواقع جمع العينات قيد الدراسة (سوق الدهان ، سوق الجملة ، الأسواق المحلية ، مخازن الحبوب) إذ احتوى سوق الدهان زيادة في إعداد الفطريات مقارنة بباقي المواقع ، و يعود ذلك إلى اختلاف ظروف الخزن لكل موقع من مواقع الجمع **[18]** .

الجدول (1) العدد الكلي للفطريات المعزولة من كل موقع من مواقع الدراسة .

ت	الفطر	سوق الدهان	سوق الجملة	الأسواق المحلية	مخازن الحبوب	المجموع
1	*A . alternata*	16	5	-	2	23
2	*A.flavus*	94	-	-	5	99
3	*A . niger*	54	6	-	10	70
4	*A . terreus*	12	1	-	9	22
5	*C.cladosporsis*	-	36	25	5	66
6	*F . oxyporium*	7	11	12	4	34
7	*P.digitatum*	11	27	14	1	53
8	*P.spinulosum*	5	31	21	9	66
9	*Penicillium* spp	3	23	25	1	52
10	*Rhizopus*	14	15	25	8	62
المجموع		216	155	122	54	547
النسبة المئوية لتردد الفطريات لكل موقع دراسة		%39.4	%28.3	%22.5	%9.8	%100

يوضح الجدولان (2) و(3) سيادة الفطر *A. flavus* على بقية الأنواع والأجناس في اغلب العينات , إذ ظهر بعدد 24 عزلة وبنسبة تردد 25.0% في عينات فستق الحقل , و 20 عزلة ونسبة تردد 18.2% في عينات حب القرع العسلي , و19 عزلة ونسبة تردد 21.1 % في حب عباد الشمس , وفي عينات الذرة الصفراء وصل إلى 17 عزلة وبنسبة تردد 14 % , إما عينات فستق الحلبي فوصلت عدد العزلات فيها إلى 14 عزلة وبنسبة تردد 19% , وعينات الحنطة سجلت اقل نسبة بعدد عزلات الفطر فوصلت إلى 5 عزلات وبنسبة تردد 9.3 %. تلاه النوع *A. niger* والذي ظهر بعدد 20 عزلة وبنسبة تردد 18.2 % في عينات حب القرع العسلي , و14 عزلة لكل من عينات الذرة الصفراء وفستق الحقل وبنسبة تردد 11.5 % و 14.6 % على التوالي , ووصل العدد إلى 10 عزلة ونسبة تردد 18.5 % في الحنطة , و7 عزلة ونسبة تردد 9.5 % في فستق الحلبي , أما حب عباد الشمس فقد سجل اقل عدد إذ وصل العدد إلى 5 عزلة ونسبة تردد 5.6 %. وجاء الفطر *A. terreus* في المرتبة الأخيرة إذ سجل أعلى نسبة له في عينات الحنطة والذي وصل العدد إلى 9 عزلة ونسبة تردد 16.7 % , إما عينات الذرة الصفراء وفستق الحقل لم تسجل أي نسبة لهذا الفطر , و6 عزلة ونسبة تردد 6.7 % في حب عباد الشمس , إما عينات فستق الحلبي وحب القرع العسلي فقد سجلا عدد متقارب لهذا الفطر والذي وصل إلى 4 و 3 عزلة ونسبة تردد 5.5 % و 2.7 % وعلى التوالي . وكذلك أظهرت النتائج

إن الفطر *A. alternata* سجل نسبة مقاربة للفطر السابق إذ بلغت أعلى نسبة له في عينات الذرة الصفراء فوصل إلى 7 عزلة وبنسبة تردد 5.7 % , في حين عينات فستق الحقل سجلت اقل نسبة وصلت إلى 1 عزلة ونسبة تردد 1.1 % , ووصل العدد إلى 5 عزلة لكل من عينات فستق الحلبي وحب القرع العسلي وبنسبة تردد 6.7 % و 4.6 % على التوالي , ووصل العدد إلى 2 عزلة ونسبة تردد 3.7 % في الحنطة , أما حب عباد الشمس فقد سجل 3 عزلة ونسبة تردد 3.3 % . وبينت النتائج إن الفطر *Penicillium* spp سجل أعلى نسبة له في عينات فستق الحقل والتي وصلت إلى 20 عزلة وبنسبة تردد 20.8 % , وبالمقابل فقد سجل اقل نسبة في عينات الحنطة وصلت إلى 1 عزلة ونسبة تردد 1.8 % , أما عينات فستق الحلبي وحب عباد الشمس وحب القرع العسلي والذرة الصفراء سجلت نسب متدرجة إذ بلغت(10 و9 و8 و4) عزلة ونسبة تردد 13.5% و 10.0 % و7.3 % و3.2 %. وسجل الفطر *P. digitatum* أعلى نسبة له في عينات حب عباد الشمس والتي وصلت إلى 15 عزلة وبنسبة تردد 16.6 % , لكن عينات الحنطة سجلت اقل نسبة والتي وصلت إلى 1 عزلة ونسبة تردد 1.8 % , في حين سجلت عينات فستق الحلبي ثاني أعلى نسبة للفطر وصلت إلى 14 عزلة ونسبة تردد 19.0 % , إما عينات حب القرع العسلي وفستق الحقل فقد احتلت نفس النسبة وصلت إلى 8 عزلة و نسبة تردد 7.3 % و 8.2 % على التوالي , و7 عزلة ونسبة تردد 5.7 % في عينات الذرة الصفراء . وأظهرت النتائج كذلك إن الفطر *P. spinulosum* فسجل أعلى نسبة له في عينات حب القرع العسلي وصلت إلى 16 عزلة وبنسبة تردد 14.5 % , لكن عينات فستق الحلبي سجلت اقل نسبة والتي وصلت إلى 6 عزلة ونسبة تردد 8.0 % , في حين سجلت عينات فستق الحقل ثاني أعلى نسبة للفطر وصلت إلى 12 عزلة ونسبة تردد 12.5 % , إما عينات الذرة الصفراء وحب عباد الشمس والحنطة فقد احتلت نسبة متدرجة وصلت إلى 13 و10 و9 عزلة و نسبة تردد 10.5 % و 11.1 % و16.7 % على التوالي . والفطر *C.cladosporsis* سجل أعلى نسبة له في عينات حب القرع العسلي وحب عباد الشمس بلغت 16 و 15 عزلة ونسبة تردد 14.5 % و 16.7 % على التوالي , وسجلت عينات فستق الحقل والذرة الصفراء 11 و14 عزلة ونسبة تردد 11.5 % و 11.4 % على التوالي , إما عينات الحنطة وفستق الحلبي فقد حظيت بنفس عدد العزلات والتي وصلت إلى 5 عزلة وبنسبة تردد 9.3 % و6.7 % على التوالي . والفطر*F. oxysporium* سجل أعلى نسبة له في عينات الذرة الصفراء وصلت إلى 22 عزلة ونسبة تردد 17.9 % , إما عينات الدراسة الأخرى فظهرت فارق كبير بينها وبين عينات الذرة الصفراء إذ لم يظهر الفطر في عينات حب القرع العسلي وكذلك ظهر الفطر بنسبة قليلة في عينات فستق الحلبي وحب عباد الشمس فوصلت إلى 1 و 2 عزلة ونسبة 1.3 % و 2.2 % على التوالي , في حين عينات فستق الحقل و الحنطة سجلت نسبة معتدلة وصلت إلى 5 و4 عزلة وبنسبة تردد 5.2 % و 7.4 % وعلى التوالي . وان للفطر *Rhizopus sp* أعلى نسبة له في عينات الذرة الصفراء إذ بلغت 25 عزلة وبنسبة تردد 20.3 % , في حين سجل الفطر في عينات فستق الحقل اقل نسبة وصلت إلى 1 عزلة وبنسبة تردد 1.1 %, تليها عينات حب عباد الشمس فكان عدد العزلات 6 عزلة وبنسبة تردد 6.7 % , إما عينات الحنطة وفستق الحلبي سجلت 8 عزلة ونسبة تردد 14.8 % و 10.8 % وعلى التوالي , وعينات حب القرع العسلي حظيت بنسبة 14 عزلة و نسبة تردد 12.7 % . ولم تختلف المحاصيل الستة نسبياً فيما بينها من حيث أنواع وأجناس الفطريات المعزولة إذ احتوت هذه المحاصيل على الأنواع والأجناس التي تتواجد عادة وتلوث المحاصيل في الحقل Field fungi مثل الفطر *Cladosporium* و *Fusarium* و *Alternaria* **[10]** ، و كذلك شملت فلورا هذه المحاصيل فطريات الخزن Fungi Storage وهي أنواع جنس *Aspergillus* و*Penicillium* **[16]** و**[19]** ، وهذه النتيجة تتشابهة مع ما عزلهُ **[20]** إذ تمكن من عزل *Fusarium* spp و *A.flavus* من الفول السوداني ، وكذلك عزل الباحث **[21]** أنواع من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* من الذرة الصفراء والبيضاء ومنتجاتهما ، في حين**[12]** عزل من الفستق والفول السوداني أنواع من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Alternaria* و *Cladosporium* .

من نفس الجدولين (2) و(3) يتبين إن الفطر *A. flavus* أكثر الفطريات سيادة لجميع عينات الدراسة والذي سجل 99 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 18.1 % , في حين الفطران *A. terreus* و *A. alternata* سجلا اقل نسبة من بين جميع الفطريات والتي بلغت 22 و23 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 4.2 % و4.3 % وعلى التوالي , والفطر *A. niger* سجل ثاني اكبر نسبة من بين جميع الفطريات والتي وصلت إلى 70 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 12.8 % , يليه الفطران *P. spinulosum* و *C. cladosporsis* اللذين سجلا 66 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 12.0 % , في حين اظهر الفطر *Rhizopus* sp 62 عزلة وبنسبة 11.3 % , واظهر كل من الفطر *Penicillium* spp و *P. digitatum* نسبة متقاربة إذ سجل لهما 52 و53 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 9.5 % و 9.6 % وعلى التوالي , أما الفطر *F. oxyporium* سجل 34 عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 6.2 % . وبصورة عامة كانت أكثر الفطريات انتشاراً التابعة لجنس *Aspergillus* و*Penicillium* ويعزى ذلك إلى ما تتميز به أنواع هذين الجنسين من قابلية نمو في مديات بيئية مختلفة وقابلية إنزيمية عالية تمكنها من السيادة على بقية الفطريات**[22]** . وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل إلية **[12]** إذ احتل الفطر *A. flavus* المرتبة الأولى من بين جميع الفطريات المعزولة بقدر 236 و235 عزلة وبنسبة تردد 58.6 % و 51.2 % في الفول السوداني والفستق على التوالي ، إما *Alternaria* و *Fusarium* شكلا اقل عدد من بين جميع الفطريات إذ لم يظهرا في الفول السوداني بل في الفستق ووقع نصيب كل منهما 1 عزلة وبنسبة تردد 0.2 % . وكذلك تتفق هذه النتيجة مع توصل إلية **[23]** إذ احتل فطر *A. flavus* المرتبة الأولى كذلك بقدر 8110 عزلة وبنسبة تردد 38.63 % لكل من عينات الذرة الصفراء والحنطة والشلب ، في حين جاء الفطر *A. niger* من بعده إذ قدرة بعدد 6030 عزلة وبنسبة تردد 28.72 % للعينات نفسها .

وأظهرت النتائج كذلك في الجدول (2) إن أكثر العينات تلوثاً بالفطريات هي عينات الذرة الصفراء إذ كان العدد الكلي مساوياً إلى 123 عزلة , أما عينات الحنطة سجلت اقل نسبة فقد وصل العدد الكلي إلى 54 عزلة , في حين عينات حب القرع العسلي سجلت ثاني اكبر نسبة فقد وصلت إلى 110عزلة , تلتها عينات فستق الحقل وحب عباد الشمس وفستق الحلبي إذ سجلت (

96 و90 و74) عزلة وعلى التوالي . وقد يعود سبب زيادة إعداد الفطريات في الذرة الصفراء وخاصةً بالفطر *A.flavus* بالمقارنة مع العينات الأخرى إلى تلوثها إثناء نموها في الحقل أو في مرحلة الحصاد أو سوء خزن الحاصل وهذا بدورة يتأثر بعوامل معينه مثل مقاومة النبات ودرجة الحرارة و الرطوبة ومستويات الأوكسجين وثنائي اوكسيد الكاربون والغازات الأخرى والحموضة وكذلك نوع المنتج**[24]** ، وتتفق هذه النتيجة مع **[25]** إذ وجدوا الذرة الصفراء أكثر إصابة بالفطريات وخاصةً الفطر *A.flavus* بالمقارنة مع عينات الجبس والفاصوليا و الحنطة وقد عزاها الباحثون إلى نسبة الرطوبة العالية في الذرة الصفراء بالمقارنة مع العينات الأخرى ، فقد ذكر **[26]** بأن فطر *A. flavus* يزيد من إصابة الذرة الصفراء بزيادة الرطوبة والدفئ ، وكذلك تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إلية **[27]** إذ إن الفطر *A flavus* شكل أعلى نسبة على حبوب الذرة الصفراء ، وكذلك تتفق هذه النتيجة مع**[23]** إذ وجد حبوب الذرة الصفراء أكثر إصابة بالفطريات وصلت إلى 11740 عزلة مقارنةً بالحنطة والشلب إذ وصلا إلى (6300 و2950) عزلة على التوالي .

الجدول (2) العدد الكلي (Total) للفطريات المعزولة من المواد الغذائية قيد الدراسة .

المواد الغذائية / الفطريات	عدد الفطريات المعزولة من عينات الدراسة						المجموع الكلي
	الحنطة	ذرة صفراء	فستق حقل	فستق حلبي	حب قرع العسلي	حب عباد الشمس	
A . alternata	2	7	1	5	5	3	23
A.flavus	5	17	24	14	20	19	99
A . niger	10	14	14	7	20	5	70
A . terreus	9	-	-	4	3	6	22
C.cladosporsis	5	14	11	5	16	15	66
F . oxyporium	4	22	5	1	-	2	34
P.digitatum	1	7	8	14	8	15	53
P.spinulosum	9	13	12	6	16	10	66
***Penicillium* ssp**	1	4	20	10	8	9	52
Rhizopus	8	25	1	8	14	6	62
المجموع الكلي	54	123	96	74	110	90	547

الجدول (3) النسب المئوية لتردد (Frequency %) الفطريات المعزولة من المواد الغذائية قيد الدراسة .

المواد الغذائية / الفطريات	النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من عينات الدراسة						النسبة المئوية الكلية للتردد
	الحنطة	ذرة صفراء	فستق حقل	فستق حلبي	حب قرع العسلي	حب عباد الشمس	
A . alternata	% 3.7	% 5.7	% 1.1	% 6.7	% 4.6	% 3.3	% 4.3
A.flavus	% 9.3	% 14.0	% 25.0	%19.0	% 18.2	% 21.1	% 18.1
A . niger	% 18.5	% 11.5	% 14.6	% 9.5	% 18.2	% 5.6	%12.8
A . terreus	% 16.7	-	-	% 5.5	% 2.7	% 6.7	% 4.2
C.cladosporsis	% 9.3	% 11.4	% 11.5	% 6.7	% 14.5	% 16.7	% 12.0
F . oxyporium	% 7.4	% 17.9	% 5.2	% 1.3	-	% 2.2	% 6.2
P.digitatum	% 1.8	% 5.7	% 8.2	% 19.0	% 7.3	% 16.6	% 9.6
P.spinulosum	% 16.7	% 10.5	% 12.5	% 8.0	% 14.5	% 11.1	%12.0
***Penicillium* ssp**	% 1.8	% 3.2	% 20.8	% 13.5	% 7.3	% 10.0	% 9.5
Rhizopus	% 14.8	% 20.3	% 1.1	% 10.8	% 12.7	% 6.7	%11.3

بينت النتائج في الجدول (4) إن الفطر *A. terreus* سجل اقل نسبة تواجد في العينات وصلت إلى 5 عينات والنسبة المئوية للظهور الكلي بلغت 27.7 % ، في حين الفطر *A. flavus* و *A. alternata* سجلا ثاني اقل نسبة تواجد وصلت إلى6 و7 عينات والنسبة المئوية للظهور الكلي بلغت33.3 % و 38.8 % على التوالي ، إما الفطر *P. spinulosum* سجل أعلى نسبة تواجد إذ وصلت 17 عينة وبنسبة مئوية للظهور الكلي 94.4 % ، والفطر *F. oxyporium* و *Rhizopus* sp و *A. niger* احتل كل منهم نسبة تواجد وصلت إلى 10 عينات وبنسبة مئوية للظهور الكلي 55.5 % ، وشكل الفطران *Penicillium ssp* و *P. digitatum* نفس نسبة التواجد إذ بلغت 13 عينة وبنسبة مئوية للظهور الكلي 72.2 % ، والفطر *C. cladosporsis* احتل 12 عينة وبنسبة تردد للظهور الكلي بلغت 66.6 % .

الجدول (4) النسب المئوية لظهور (Occurrence %) الفطريات المعزولة من المواد قيد الدراسة .

المواد الغذائية / الفطريات	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من عينات الدراسة						عدد العينات التي ظهر فيها الفطر	النسبة المئوية الكلية للظهور
	الحنطة	ذرة صفراء	فستق حقل	فستق حلبي	حب قرع العسلي	حب عباد الشمس		
A . alternata	33.3 %	% 33.3	% 33.3	% 33.3	66.6%	% 33.3	7	% 38.8
A.flavus	%33.3	%33.3	%33.3	%33.3	%33.3	%33.3	6	%33.3
A . niger	%33.3	%66.6	%33.3	66.6%	66.6%	66.6%	10	% 55.5
A . terreus	%33.3	-	-	66.6%	% 33.3	% 33.3	5	% 27.7
C.cladosporsis	66.6 %	% 66.6	% 66.6	66.6%	66.6%	66.6%	12	% 66.6
F . oxyporium	%100	%100	66.6%	% 33.3	-	% 33.3	10	% 55.5
P.digitatum	% 33.3	66.6%	% 100	66.6%	% 100	66.6%	13	% 72.2
P.spinulosum	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100	66.6%	17	% 94.4
***Penicillium* ssp**	% 33.3	66.6%	% 100	66.6%	66.6%	% 100	13	% 72.2
Rhizopus	%100	%66.6	% 33.3	% 33.3	66.6%	66.6%	11	% 61.1

كفاءة عزلات الفطر *A. flavus* في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2

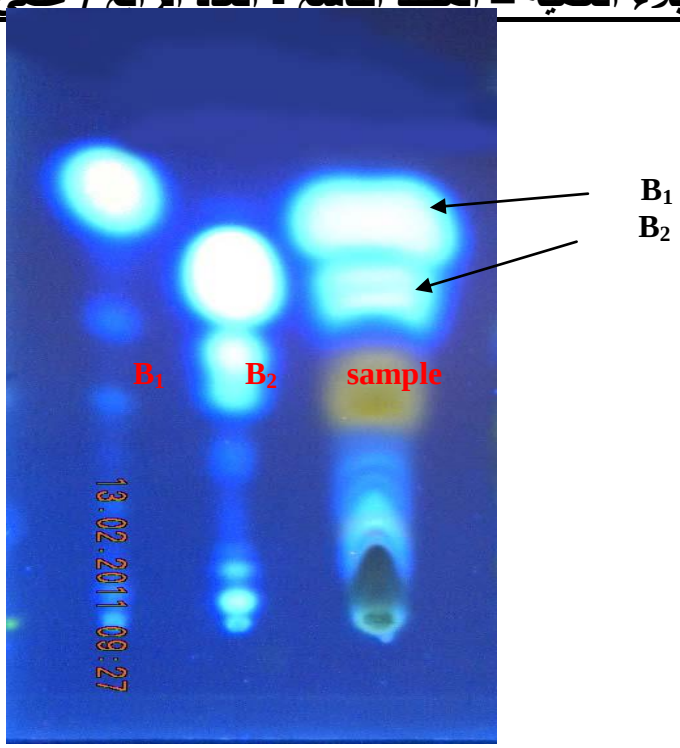
تم مبدئياً انتخاب ثلاث عزلات لكل نوع من العينات , بعد تنميتها على وسط PDA لمدة 15 يوم عند درجة حرارة 25 ± 2 وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة من الفطر , وبعد عملية الاستخلاص والفصل على صفائح الكروموتوكرافي ومقارنة البقع المفصولة مع بقع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي من حيث قيمة R_f وشدة التألق , ظهر تبايناً في شدة التألق للعزلات المختلفة مما يدل على اختلاف قابلية العزلات في أنتاجها سم الافلا B_1 وB_2 . أظهرت نتيجة الفحص هذا لـ 18 عزلة للفطر *A. flavus* قابلية 11 عزلات فقط لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 أي بنسبة 61.2 % , في حين 7 عزلات وبنسبة 38.8 % كانت غير منتجة لسم الافلا B_1 وB_2 جدول (5). وظهرت العزلتان AfZ_3 و AfH_2 أعلى تألق من بين جميع العزلات الشكل (1) , تلتهما العزلة AfZ_1 , أما العزلة AfW_1 سجلت اقل تألق ، كما أظهرت هذه التجربة إن سم الافلا المنتج من قبل العزلات كان من النوع B فقط دون تكوين سم الافلا G إذ لم تتكون بقع خضراء متألقة . و يرجع سبب الاختلاف في قابلية العزلات على إنتاج سم الافلا كماً و نوعاً إلى جينات الفطر *A. flavus* المتخصصة في تشفير الإنزيمات المسؤولة عن تخليق سم الافلا **[28]** ، ومن جانب أخر لقد وجد إن للمادة الأساس علاقة كبيرة بتخليق سم الافلا المنتج وان المادة الأساس التي لها تراكيز عالية من الكاربوهيدرات والأحماض الدهنية تعزز من إنتاج سم الافلا كما هو ملاحظ في المستويات العالية من سم الافلا الناتج من جوز الهند الطازج **[29]** . لا تتفق هذه النتيجة مع ما وجده**[30]** من إن ثلث عزلات الفطر *A. flavus* أي بنسبة 33.4 % فقط من مجموع 18 عزلة كانت منتجة لسم الافلا B_1 وB_2 ، وكذلك لا تتفق مع ما **[19]** إذ وجد 46 عزلة أي بنسبة 30.7 %من مجموع 150 عزلة للفطر *A. flavus* منتجة للسم و 104 عزلة أي بنسبة 69.3 % غير منتجة لسم الافلا .

الجدول (5)اختبار عزلات الفطر *A. flavus* لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 باستخدام TLC.

ت	رمز العزلة	مقارنة بالسم القياسيUVشدة التألق تحت	
		B_1	B_2
1	AfW_1	-	-
2	AfW_2	+++	++
3	AfW_3	++	+
4	AfZ_1	++++	+++
5	AfZ_2	+++	++
6	AfZ_3	++++	++++
7	AfL_1	+++	++
8	AfL_2	-	-
9	AfL_3	+++	++
10	AfP_1	-	-
11	AfP_2	-	-
12	AfP_3	++	++
13	AfC_1	+++	+++
14	AfC_2	-	-
15	AfC_3	-	-
16	AfH_1	-	-
17	AfH_2	++++	++++
18	AfH_3	+++	+++

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

* AfW: حنطة .
* AfZ : ذرة صفراء .
* AfL: فستق الحقل .
* AfP: فستق الحلبي
* AfC: حب قرع العسلي
* AfH: حب عباد الشمس



الشكل (1) ترحيل مستخلص عزلة *A. flavus* AfZ_3 على صفائح الكروموتوكرافي وبالمقارنة مع سم الافلا القياسي B_1 وB_2

.

المصادر References

1. CAST (Council for Agricultural Science and Technology).(2003). Mycotoxins:Risks in Plant, Animal and Human Systems . Task Force Report No. 139.
2. Ahsan, S. ;Bhatti, I. A. ;Asi, M. R. ;Bhatti, H. N. & Sheikh, M. A. (2010) . Occurrence of aflatoxins in maize grains from central areas of Punjab, Pakistan . Int. J. Agr. Boil., 12(4):571-575.
3. Lawlor, P. G. & Lynch, P. B. (2001). Mycotoxin in pig feeds 1:source of toxins,prevention and management of mycotoxicosis. peer reviewed. ,54(3);117-120.
4. Bokhari, F. M. (2002) . Aflatoxins production by *Aspergillus flavus* ,isolated from different food stuffs commonly used in Jeddah region , Saudi Arabia . Pak. J. Biol. Sci., 5(1):69-74.
5. Bhat, R. V. (2008). Human health problems associated with current agriculture food production . Asia . pac. J. Clin. Nutr., 17(1): 91-94.
6. Verman, R. J. (2004). Aflatoxin cause DNA damage . Int. J. Hum. Genet., 4(4):231-236.
7. Younis, Y. M. H. & Malik, K. M. (2003) . TLC and HPLC assay of aflatoxin contamination in Sudanese peanuts and peanut products ., Kuwait. J. Sci. Eng. 30(1):79-94.
8. الفيصل , هبه قاسم حميد (2005) . التحري عن سموم افلا B1 و B2و اوكرا A و السترينين في الحبية والبرغل والجريش . رسالة ماجستير / كلية الزراعة – جامعة بغداد.
9. Felicia, W. U. (2004). Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards . Environ. Sci. Technol.,38(15):4049-4055.
10. Magan, N. & Lacey, J. (1988) . Ecological determinants of mould growth in stored grian . Int. J. Food Microbiol. 7: 245-256.
11. Hugo, W. B. & Russell, A. D. (1998) . Pharmaceutical Microbiology. 6 Th edt., Marston book services LTd :510 pp.
12. Hedayati, M. T.;Kaboli, S. & Mayahi, S. (2010). Mycoflora of pistachio and peanut kernels from Sari,Iran. J. Microbiol .,3(3):114-120.

13. Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (2003) . Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus Penicillium aguide to identification of food and air – borne terverticillate penicillia and their mycotoxins . Stud. Mycol. , 49 : 1 – 174 .
14. Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965). The Genus *Aspergillus*. 1st edt ., Williams & wilking Co., Battimore, : 686 PP.
15. Booth , T. ; Gorrie , S. & Mabsin , T.M. (1988) . Life Strategies among fungal ; assemblages on *Salicornia europase* agg . Mycol. ; 80 : 176 - 191 .
16. Rajasinghe, M. ;Abeywickrama, K. & Jayasekera, R. (2009) . Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and aflatoxin formation in selected spices during storage . Trop. Agr. Res. Ext., 12(1):1- 6 .
17. Aryantha, N. P. ; Lunggani, A. T. (2007) . Suppression on the aflatoxin-B production and the growth of *Aspergillus flavus* by lactic acid bacterial (*Lactobacillus delbrueckii* , *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus planetarium*) . Biotechnol., 6(2):257-262.
18. Azab, R. M. ;Tawakkol, W. M. ;Hamad, A. M.;Abou-Elmagd, M. K.;El-Agrab, H. M. & Refai, M. K. (2005). Detection and estimation of aflatoxin B_1 in feed and its biodegradation by bacteria and fungi. Egypt. J. natur. toxins. ,2:39-56.
19. Rahimi, P. ; Sharifnabi, B. & Bahar, M. (2008). Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from Pistachio in Iran . J. Phytopathol., 156 :15–20 .
20. Krishna Kishore, G. ; Pande, S. ; Manjula, K. ; Narayana Rao, J. & Thomas, D. (2002) . Occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Andhra Pradesh, India . Plant Pathol. J., 18(4) : 204-209.
21. Campos, S. G. ; Cavaglieri, L. R. ; Ferna´ndez Juri, M. G. ; Dalcero, A. M. ; Kru¨ ger, C. L. ;Keller, A. M. ; Magnoli, C. E. & Rosa, C. A. R. (2008) . Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil . J. Animal Physiol. Animal Nutr. 92 : 377–383 .
22. Pitt, J. I. (1994) . The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health . J. Med. Vet. Mycol., 32(1):17-32.
23. الوائلي , هديل وائل (2006) . تأثير الزيت الطيار للقشور الصفراء لثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* وأوراق حشيشة الليمون *Cymbopogon citratus* في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وانتاجه للافلاتوكسين B_1. رسالة ماجستير/ كلية التربية / ابن الهيثم – جامعة بغداد .
24. Harwig, J. & Munro, C. I. (1975) . Mycotoxins of possible importance in diseases of canadian farm animals . can. vet. jour., 16 (5): 125 – 141.
25. Makun, H. A. ;Anjorin, S. T. ;Moronfoye, B. ;Adejo, F. O. ;Afolabi, O. A. ;Fagbayibo, G. ;Balogun, B. O. & Surajudeen, A. A.(2010). Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria. Afr .J. Foo. Scie. , 4(4) :127-135
26. Trenk, H. L. & Hartman, P.A. (1970). Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. Appl. microbiol. ,19(5)781-784.
27. الجبوري، كركز محمد ثلج (1998). عزل الفطريات المنتجة للسموم من بعض اعلاف الدواجن. المجلة العراقية للعلوم البيطرية. المجلد 11، العدد 1:45-50.
28. Scherm, B. ; Palomba, M. ; Serra, D. ; Marcello, A. & Migheli, Q. (2005) . Detection of transcripts of the aflatoxin genes af lD, af lO, and af lP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* . Int. J. Food Microbiol. 98: 201 – 210 .
29. Arseculeratne, S. N.; Desiva, L. M. ; Wijesundera, S. & Bandunatha, C. H. S. R. (1969). Coconut as amedium for the experimental production of layoxin. J. Appl. Microbiol., 18: 88-94.
30. Batista, L. R. ; Chalfoun, S. M.; Prado, G.; Schwan, R. F. and Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed green coffea beans (*Coffea arabical* L.). Int. J. Food Microbiol., 85 (3): 293-300.