روش تولید و سنجش نیمه صنعتی آفلاتوکسین در محیط کشت برنج

فانی مکی، ا.*[۱و۲]، افضلی، ن.[۱]، امیدی، ا.[۱و۳]، محمدی، ح.ر.[۴].

دریافت: ۱۲/ ۱۳۹۲/۰۵ پذیرش: ۰۹/ ۱۳۹۲/۱۰

خلاصه

آفلاتوکسین B_1 یکی از مهمترین سموم قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* است که غذا و علوفه را آلوده می‌کند. هدف از اجرای این مطالعه تولید و سنجش میزان آفلاتوکسین تولید شده بر روی محیط کشت برنج جهت اجرای مطالعات تحقیقاتی می‌باشد. در مطالعات برون تنی، سویه مرجع قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IR111) NO PTCC:5004) در محیط کشت Potato dextrose agar (PDA) تکثیر شد. قارچ تکثیر شده سپس به محیط کشت برنج جهت تولید آفلاتوکسین B_1 منتقل گردید. نتایج حاصل نشان داد که اصلی ترین عامل محیطی مؤثر بر تولید آفلاتوکسین B_1 در محیط کشت برنج دمای محیط و شرایط انکوباسیون (میزان نور محیط) می‌باشد. همچنین، تولید آفلاتوکسین تحت شرایط رطوبتی یکسان در محیطی تاریک با دمای ^{o}C ۲۴ به بیشترین میزان ممکن خواهد رسید. در حالی که بدترین شرایط محیطی برای تولید آفلاتوکسین، محیطی روشن با دمای ^{o}C ۴۰ تشخیص داده شد. در این پژوهش مشخص گردید که دما و نور عوامل مؤثری در تولید آفلاتوکسین به شمار می‌روند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین B_1، محیط کشت برنج، شرایط محیطی، سرطان.

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

۲. معاونت تحقیق، توسعه و آموزش، شرکت زرین گستر سارینا، استان خراسان رضوی، کاشمر، ایران.

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

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

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

مقدمه

آفلاتوکسین به وسیله قارچ های مختلفی تولید می شود، ولی مهمترین قارچ تولید کننده آن در طبیعت *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) می باشد که دارای انتشار بسیار وسیع در طبیعت است. غلات یکی از سوبستراهای مناسب برای رشد این قارچ محسوب می شوند (Amiri dumari و همکاران، ۲۰۱۳؛ فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱). آفلاتوکسین های شایع در صنعت پرورش طیور B_1، B_2، G_1 و G_2 هستند که مسمومیت با آفلاتوکسین B_1 شایع ترین نوع آفلاتوکسیکوزیس است (فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۲a). Odetite و همکاران، ۱۹۶۶، جهت کشت قارچ *آسپرژیلوس* پارازیتیکوس از ویال یک میلی گرمی سویه پارازیتیکوس به شماره NRRL ۲۹۹۹ استفاده کردند. گروهی از محققان این سویه را بهترین سویه قارچ، جهت تولید سم آفلاتوکسین B_1 دانسته و افزودند، این سویه بهتر از سویه *آسپرژیلوس فلاووس* (به شماره IR 111) آفلاتوکسین B_1 تولید می کند (فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۲b). Hong و همکاران (۲۰۱۳)، مشاهده کردند که آفلاتوکسین B_1 را می توان بر روی بادام زمینی، گندم و ذرت کشت داد. Garcia و همکاران (۲۰۱۳)، کشت قارچ آفلاتوکسین B_1 را بر روی برنج، گندم، سویا و سورگوم انجام داده و در نهایت بهترین اثر کشت و تولید توکسین را بر روی برنج مشاهده کردند. همچنین، دانه ذرت بویژه از نظر چربی، پروتئین، کربوهیدرات ها و نمک های بعضی عناصر به گونه ای است که در دما و رطوبت مناسب، محیط بسیار مطلوبی جهت رشد قارچ *آسپرژیلوس* می باشد (Garcia و همکاران، ۳۱۰۲). در این پژوهش کشت قارچ و تولید سم آفلاتوکسین B_1 در شرایط محیطی متفاوت بر روی برنج، مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

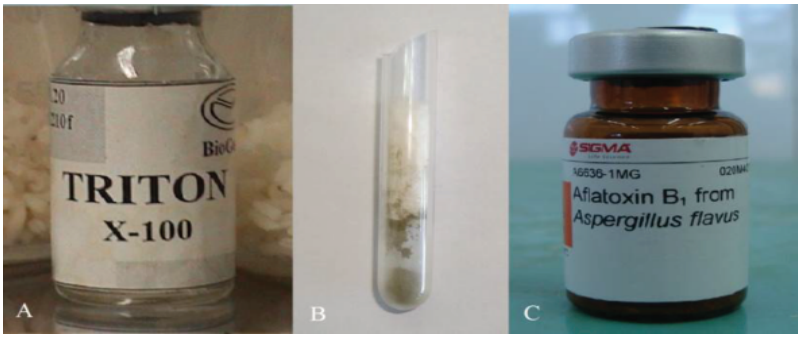
مواد و روش کار

کشت قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین B_1

در شرایط آزمایشگاهی قارچ *آسپرژیلوس فلاوس* (PTCC NO (IR111) ۵۰۰۴ : بر روی محیط کشت Potato Dexterose Agar (PDA) تکثیر شد (تصویر ۱). در مرحله اول، محیط کشت آماده شده در پتری دیش های یکبار مصرف تقسیم می شود. سپس، قارچ *آسپرژیلوس* بوسیله محلول ۱ درصد (Triton X-100) بصورت سوسپانسیون از محیط کشت اولیه جدا شده و بر روی محیط های کشت از قبل تهیه شده، بصورت خطی کشت داده می شود (Garcia و همکاران، ۳۱۰۲؛ فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۲c) ، (تصویر ۲). کشت های قارچی آماده شده به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در گرمخانه گذاشته می شوند. در مرحله بعد، جهت تولید سم آفلاتوکسین B_1 بر روی محیط کشت برنج از فلاسک های ارلن مایر استفاده می شود. بطوری که در هر فلاسک ارلن مایر (۲۵۰ سی سی)، ۲۵ گرم برنج به همراه ۱۳ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و به مدت ۱ ساعت نگهداری می شود تا رطوبت بداخل بافت برنج نفوذ کند (تصویر ۳). فلاسک ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو می شوند. همچنین، به منظور انتقال قارچ کشت شده در مرحله قبل به محیط کشت برنج، مجدد سوسپانسیونی (تعلیقی) از قارچ تولید شده در محیط پتری دیش ها تهیه می شود (Garcia و همکاران، ۲۰۱۳؛ فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱). در این مرحله، تعلیق آماده شده را به میزان ۰/۵ میلی لیتر به هر یک از فلاسک های محتوی برنج اضافه کرده (تصویر ۳) و سپس آن ها را به دستگاه گرمخانه یخچالدار منتقل می نمایند. فلاسک ها در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز در گرمخانه نگهداری می شوند. در این مدت کشت ها را روزانه ۲ مرتبه، هر ۱۲ ساعت یکبار، به مدت ۲ دقیقه کاملاً مخلوط کرده تا بافت برنج داخل فلاسک ها متلاشی شود (تصویر ۲). به تدریج روند رشد قارچ بر روی فلاسک های حاوی محیط کشت افزایش یافته به طوری که در پایان دوره گرمخانه، سطح محیط کشت برنج سرشار از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* خواهد شد (Garcia و همکاران، ۲۰۱۳؛ فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱) . روش کشت توصیه شده در این بخش روشی مناسب جهت کشت قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی سایر غلات از جمله؛ گندم، ذرت، بادام زمینی و سویا می باشد.

سنجش غلظت آفلاتوکسین تولید شده به روش کروماتوگرافی لایه نازک. (Thin Layer Chromatography)

در مرحلـه اول، ۵۲ گـرم نمونه ۱۰۰ + میلی لیتر آب مقطر در یک فلاسـک ارلن مایر ۵۰۰ سی سـی به مدت ۲ دقیقه در یک دستگاه تکان دهنده قرار داده شـد (تصویر ۴، قسـمت (۱). ۱۵۰ میلی لیتر اسـتن به فلاسک قبلی اضافه شـد و محتویات آن به مدت ۲ دقیقه بطـور کامل مخلوط گردید (تصویر ۴، قسـمت ۱). در این مرحله، فلاسک ارلن مایر ۵۰۰ سی سی به مدت ۲ دقیقه در یک دستگاه تکان دهنده قرار داده شد (تصویر ۴، قسمت ۱). ۱۵۰ میلی لیتر استن به فلاسک قبلی اضافه شد و محتویات آن به مدت ۲ دقیقه بطور کامل مخلوط گردید (تصویر ۴، قسمت ۱). در این مرحله، محتویات از میان کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد (تصویر ۴، قسمت ۲). در مرحله بعد، ۷۵ میلی لیتر از مواد فیلتر شده + ۳ گرم کربنات مس ($Cu\ So_4$) + ۱۰۰ میلی لیتر محلول فِریک ژل را



تصویر۱. **(A)** محلول (Triton X - 100)، **(B)** ویال یک میلی‌گرمی (PTCC : IR 111) *Aspergillus flavus*،
(C) Aflatocin B_1 From *Aspergillus flavus* Standard – A6636- 1mg.

تصویر ۲. مراحل رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* سویه IR111 : از روز اول تا هفتم + روز بیست و یکم (فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱)

تصویر ۳. آماده سازی و نحوه کشت قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی محیط کشت برنج به روش In vitro: **(A)** ml ۱۴ آب مقطر + gr ۲۵ برنج، پوشاندن درب فلاسک‌ها با پنبه و فویل آلومینیومی و نگهداری آن‌ها به مدت یک ساعت. **(B)** اتوکلاو کردن فلاسک‌های حاوی برنج در دمای ^{oC} ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه و **(C)** اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد TRITON X 100، به هر کدام از پلیت‌های حاوی قارچ و مخلوط کردن آن توسط آنس بطوری که محلول یکنواختی از قارچ حاصل شود (فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱).

تصویر ۴. مراحل اجرایی سنجش آفلاتوکسین B_1 به روش TLC

در یک بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری به آرامی تکان داده تا محتویات بطور کامل مخلوط شوند (تصویر ۴، قسمت ۳). مجدداً، محتویات از میان کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر می‌شود. در ادامه؛ ۱۰۰ میلی لیتر از مواد فیلتر شده به یک قیف دِکانتور محتوی ۱۰۰ میلی لیتر از (H_2SO_4) ۰/۰۳ درصد + ۲۰ میلی‌لیتر کُلروفرم منتقل می‌شود. در این مرحله، محلولی ۲ فازی تشکیل خواهد شد (لایه کلروفرم در فاز پائینی جمع می‌شود)، (تصویر ۴، قسمت ۴ و ۵). پیچ انتهایی قیف دکانتور را به آرامی باز کرده تا فاز کلروفرم خارج شود (تصویر ۴، قسمت ۶). در ادامه؛ لایه کلروفرم مرحله قبل (۲۰ میلی لیتر) با ۱۰۰ میلی لیتر محلول پتاسیم ترکیب می‌شود (تصویر ۴، قسمت ۷). سپس، قیف دکانتور محتوی عصاره کلروفرم و محلول شستشوی پتاسیمی به آرامی چرخانده می‌شود (امولوسیون به شدت تکان داده نشود، لازم به ذکر است که عصاره کلروفرم در پایین قرار می‌گیرد). لایه کلروفرمی بوسیله یک قیف از میان یک لایه Na_2SO_4 عبور داده شده و جمع آوری می‌شود (تصویر ۴، قسمت ۸). عصاره کلروفرم تهیه شده، در آون با حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد تبخیر شده و باقیمانده مواد خشک شده در ۰/۲ میلی لیتر محلول کلروفرم حل می‌شوند. محلول تهیه شده بر روی صفحه نازک کروماتوگرافی (TLC) در یک راستا و همراه استاندارد نقطه گذاری می‌شود (صفحه آلومینیومی TLC همراه با سیلیکاژل (F_{254}/60 ,Germany, Merk). در نهایت، صفحه در مخزنی حاوی کلروفرم : استون : آب (۸۸ : ۱۲ : ۱) قرار می‌گیرد. صفحه TLC را در هوا خشک کرده، تحت نور لامپ UV (۳۶۵ nm) مورد قضاوت قرار داده و شدت نقطه فلورسنس آبی نمونه با نقطه فلورسنس استاندارد مقایسه می‌شود (Odetite و همکاران، ۱۹۶۶؛ فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱)، (تصویر ۴).

✓ مقدار آفلاتوکسین B_1 بوسیله فرمول زیر محاسبه می شود؛

$$AFB_1 = ((S\times Y\times V)/(Z\times W))\times 1000$$

در این فرمول؛

S = مقدار آفلاتوکسین B_1 بر حسب µl در نقطه استاندارد، قابل مقایسه بامقدار Z برحسب µl نقطه نمونه.

Z = مقدار آفلاتوکسین B_1 بر حسب µl در نقطه نمونه، قابل مقایسه با مقدار S بر حسب µl آفلاتوکسین استاندارد.

Y = غلظت آفلاتوکسین B_1 استاندارد (10 µg/ml)، حاوی

مشخصات:

Aflatoxin B_1 From *Aspergillus flavus*.

Sigma Alorich - Art Number A6636-1mg.

دما	شرایط گرمخانه	pH	بازده تولید سم(ppb)
۱۸ oC	تاریک	۶/۵	۴۵/۰۰
	روشن	۶/۵	۴۰/۰۰
۲۴ oC	تاریک	۶/۵	۷۰/۰
	روشن	۶/۵	۵۵/۰۰
۳۲ oC	تاریک	۶/۵	۳۵/۰۰
	روشن	۶/۵	۲۰/۰۰
۴۰ oC	تاریک	۶/۵	۲۵/۰۰
	روشن	۶/۵	۱۰/۰۰

جدول ۱. بازده تولید سم آفلاتوکسین B_1، در شرایط محیطی مختلف (ppb)

CAS 1162-65-8; $C_{17}H_{12}O_6$; FW 312.3; MP 268-269 oC; EC 214-603-3; CH-Gift 1.

V = حجم محلول باقیمانده بر حسب µl قبل از نقطه گذاری.

W = وزن موثر نمونه می‌باشد.

$$W = 25 \times (75\times100/250\times175) = 4.286 \text{ Gram}$$

نتایج

در این پژوهش مشخص شد که در شرایط رطوبتی و pH یکسان، مناسب ترین شرایط محیطی جهت تولید آفلاتوکسین B_1 محیطی تاریک با دمای ۲۴ oC می‌باشد. در حالی که، نامساعدترین شرایط محیطی جهت تولید این توکسین محیطی روشن با دمای ۴۰ oC بود. همچنین مشخص گردید که دما و شرایط گرمخانه (نور) از مهمترین عوامل موثر بر تولید آفلاتوکسین محسوب می‌شوند (جدول۱).

بحث

رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تحت تأثیر اقلیم‌های مختلف قرار می‌گیرد. اقلیم‌های معتدل و سردسیر، با بارندگی فراوان مستعد رشد قارچ هستند (Jaime-Garcia,Cotty، ۲۰۰۷؛ Cardwell, Cotty، ۲۰۰۲). گروهی دیگر از محققان، نتایج مشابهی را با گزارشات Cotty, Cardwell ۲۰۰۲، درکشورهای استرالیا (Berghofer و همکاران، ۲۰۰۳)، مصر (El-Shanshoury و همکاران، ۲۰۱۴) و ایران (Ghiasian و همکاران، ۲۰۰۴) مشاهده کردند. Klich و همکاران، (۲۰۰۷)، اصلی ترین عامل محیطی مؤثر بر تولید سم آفلاتوکسین B_1 را در محیط‌های کشت مختلف، رطوبت دانسته و افزودند؛ میزان تولید سم آفلاتوکسین تحت شرایط رطوبتی یکسان به ترتیب در محیط‌های کشت گندم، بادام زمینی، ذرت و برنج افزایش می‌یابد. برداشت گندم در روزهای آفتابی می‌تواند تا حدود زیادی رطوبت موجود در دانه غلات را کاهش دهد و شرایط تولید قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* را به حداقل برساند (Horn، ۲۰۰۳). تولید سم آفلاتوکسین B_1 در بازه‌های دمایی ۱۸، ۲۴، ۳۲ و ۴۰ oC انجام شد (Joffe و همکاران، ۱۹۶۹). این محققان در این آزمایش هر دو شرایط محیطی روشنایی و تاریکی را تجربه کردند و به این نتیجه رسیدند که؛ نامساعدترین شرایط محیطی جهت تولید سم آفلاتوکسین B_1، محیطی روشن با دمای ۱۸ و ۴۰ oC است. همچنین، بهترین شرایط محیطی را جهت تولید سم آفلاتوکسین B_1، دما و pH به ترتیب ۴۰ oC و ۶/۲ پیشنهاد نمودند. یافته‌های حاصل از این مطالعه با گزارش‌های این محققان کاملا همخوانی دارد. Odetite و همکاران، (۱۹۶۶)، بیشترین میزان سم تولید شده را بر روی محیط کشت برنج مشاهده کردند. مطابق با گزارش گروهی دیگر از محققان، تحت شرایط مناسب محیطی بیشترین میزان آفلاتوکسین را در بین دانه غلات میتوان از محیط کشت برنج استخراج کرد (kana و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج بدست آمده از این پژوهش با گزارش Amar و همکاران (۲۰۱۰)، که نور را عامل مضری در تولید سم آفلاتوکسین معرفی کردند مطابقت دارد. در نتیجه، نحوه کشت قارچ *آسپرژیلوس* و تولید آفلاتوکسین از اهمیت ویژه ای برخوردار است. دما و شرایط گرمخانه از مهمترین عوامل تأثیر گذار بر میزان توکسین تولید شده می‌باشند.

تشکر و قدردانی

بخشی از این تحقیق مربوط به پایان نامه کارشناسی ارشد آقای امید فانی مکی، گروه آموزشی علوم دامی دانشگاه بیرجند بود. از آقای مهندس مجتبی فروزان مهر که در مراحل اجرای این تحقیق همکاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر می گردد.

Journal of Veterinary Laboratory Research 5 (2013) 95-104

Semi-industrial methods of production and measurement of aflatoxin in rice media

Fani Makki, O.[*1,2], Afzali, N.[1], Omidi, A.[1,3], Mohammadi, H.R.[4].

Received: 03.08.2013 Accepted: 30.12.2013

Abstract

Aflatoxin B_1 (AFB1) is one of the most important fungal toxins that can contaminate food and feed. The purpose of this study was to evaluate different methods of measurement and production of AF on the rice media for the implementation in the research studies. Reference strains of *Aspergillus flavus* obtained from fungi collection of the Centre of Scientific and Industrial Research Organization in Iran (PTCC NO: 5004 (IR111)) proliferate on Potato dextrose agar (PDA) medium and used for in vitro studies. Also, growing fungus was transferred to the rice media for production of AFB1. The results showed that the major environmental factors affecting production of AFB1 in rice cultivation are temperature and incubation conditions (ambient light level). In addition, aflatoxin production under the same humidity conditions in the dark environment with temperature of 24oC reaches to the greatest possible extent. In contrast, the worst circumstances to produce AF, were detected a bright environment with temperature of 40oC. The study revealed that temperature and light are main factors in the production of AF.

Key words: Aflatoxin B_1, rice media, Environmental conditions, Cancer.

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

2. Research Assistance, Development and Education, Zarin Gostar Sarina Company, Khorasan Razavi Province, Kashmar, Iran.

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

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

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

منابع

فانی مکی، ا. ۱۳۹۱. اثر سطوح مختلف بذر گیاه خار مریم بر روی نرخ رشد، برخی از متابولیت های خونی و مرفولوژی بافت کبد جوجه های گوشتی آلوده شده با آفلاتوکسین (ب۱). پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

فانی مکی، ا.؛ افضلی، ن.؛ امیدی، ا.؛ فروزان مهر، م. ۱۳۹۲a. سم زدایی آفلاتوکسین به روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی. مجله بیوتکنولوژی دامپزشکی. **۱(۲)**، ۲۳ – ۳۱.

فانی مکی، ا.؛ افضلی، ن.؛ امیدی، ا.؛ شیبک، ع. ۱۳۹۲B. مقایسه میزان آفلاتوکسین (ب۱) تولید شده به وسیله دو قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تحت شرایط مختلف دما، نور و pH. ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج. **۱۸(۳)**، ۲۱۰ – ۲۱۸.

فانی مکی، ا.؛ افضلی، ن.، امیدی، ا.، فروزان مهر، م.، محمدی، ح.ر. ۱۳۹۲c. اثر سطوح مختلف اسید سیتریک، اسید پروپیونیک و باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بر تولید آفلاتوکسین ناشی از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، **٤(۲)**، ۳۲۵–۳۳۰.

Amar, R., Nourredine, B., Salim, M., Florence, M., Ahmed, L., Nasserdine, S. 2010. Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. Food and Chemical Toxicology. **12(4)**, 2772 - 2777.

Amiri dumari, H., Sarir, H., Afzali, N., Fani makki, O. 2013. Effects of milk thistle seed against aflatoxin B^1 in broiler model. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. **18(9)**, 786.

Berghofer, L.K., Hocking, A.D., Miskelly, D., Jansson, E. 2003. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology¬. **85**, 137–149.

Cardwell, K., Cotty, P.J. 2002. Distribution of Aspergillus section flavi among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin,West Africa. Plant Disease. **86**, 434–439.

Cotty, P., Jaime-Garcia, R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology. **119**, 109–115.

El-Shanshoury, A.E.R.R., El-Sabbagh, S.M. 2014. Occurrence of moulds, toxicogenic capability of *Aspergillus flavus* and levels of aflatoxins in maize, wheat, rice and peanut from markets in central delta provinces, Egypt. International Journal of Current Microbiology and Applied Science. **3(3)**, 852-865.

Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2013. Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. International journal of food microbiology. **162(2)**, 182-189.

Ghiasian, S.A., Kord–Bacheh, P., Rezayat, S.M., Maghsood, A.H., Taherkhani, H. 2004. Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in. Mycopathologia. **158**, 113–121.

Hong, S.B., Lee, M., Kim, D.H., Chung, S.H., Shin, H.D., Samson, R.A. 2013. The proportion of non-aflatoxigenic strains of the *Aspergillus flavus* complex from meju by analyses of the aflatoxin biosynthetic genes. Journal of Microbiology. **51(6)**, 766-772.

Horn, B.W. 2003. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. Journal of Toxicology. **22**, 351–379.

Joffe, Z., Lisker, N. 1969. Effects of Light, Temperature, and PH Value on Aflatoxin Production In Vitro.

Applied and Environmental Microbiology. **18(3)**, 517.

Kana, J.R., Gnonlonfin, B.G.J., Kana, J.R., Gnonlonfin, B.G.J., Harvey, J., Wainaina, J., Wanjuki, I., Skilton, R.A., Teguia, A. 2013. Mycobiota and Toxigenecity Profile of *Aspergillus flavus* Recovered from Food and Poultry Feed Mixtures in Cameroon. Journal of Animal and Poultry Sciences. **2(4)**, 98-107.

Klich, M.A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mycoscience. **48**, 71–80.

Odetite, L., Shotwell, C., Hesseltine, W., Stubblefield, R.D., Sorenson, W.G. 1966. Production of Aflatoxin on Rice. Applied and Environmental Microbiology. **14(4)**, 412-418.