

COMPARAÇÃO DE SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE TOXINAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus flavus* EM SOJA

Adilson Bizzetto*, Martin Homechin* e Deonísio Destro*

RESUMO. Foram avaliados diferentes substratos, quanto à capacidade de detecção de toxinas produzidas por espécies toxigênicas de *Aspergillus flavus*. A facilidade de fazer o substrato, rapidez para leitura, contaminações, possibilidade de uso em larga escala foram consideradas. Os substratos foram: ágar-coco, ágar-coco com celofane, ágar-água e papel de filtro com celofane. O microrganismo teste foi o *Aspergillus flavus* toxigênico, isolado de sementes de soja e transferido para o meio Czapeck-ágar. Discos desse meio com fungo foram transferidos para cada substrato. Na leitura 24, 48, 72 e 96 horas, após a instalação, determinou-se a intensidade de fluorescência produzida em luz U.V. de onda longa (365 nm), bem como o diâmetro da colônia e crescimento micelial radial. O melhor substrato foi o ágar-coco, o qual manifestou fluorescência de média e alta intensidade, após 48 horas de incubação e crescimento superior em relação aos demais substratos, principalmente, os com celofane. Os substratos ágar-água e papel de filtro com celofane foram menos eficientes, limitando-se à obtenção de fluorescência de baixa intensidade em, aproximadamente, 50% das placas avaliadas, independente do período de incubação.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, *Glycine max*, soja, substratos, toxinas.

COMPARISON OF SUBSTRATES USED TO DETECT TOXINS PRODUCED BY *Aspergillus flavus* IN SOYBEAN

ABSTRACT. Different substrates were evaluated regarding their capacity for detecting toxins produced by toxic species of *Aspergillus flavus*. The easy preparation of substrate, its quick reading, contaminations and the possibility of large scale production were also considered. Agar-coconut, agar-coconut with

* Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, 86051-970, Londrina-Paraná, Brasil.

Correspondência para Adilson Bizzetto.

Data de recebimento: 19/01/97.

Data de aceite: 29/08/97.

cellophane, agar-water and filter paper were the substrates analyzed. The macroorganism chosen was the toxigenic *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds and transferred to Czapeck-agar. The laminae containing fungi were transferred to each substrate. The 24, 48, 72 and 96-hours readings after installation determined the fluorescent intensity produced in long wave (365nm) U.V. light while the radial mycelial growth was determined by the colony diameter. The best substrate was agar-coconut which showed medium and high fluorescence intensity after 48-hours incubation, and higher growth in relation to the remaining substrates, mainly the ones with cellophane. The agar-water and filter paper with cellophane substrates were the least efficient obtaining only low intensity fluorescence in approximately 50% of the laminae examined regardless of the incubation period.

Key words: *Aspergillus flavus*, *Glycine max*, soybean, substrate, toxins.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare, os quais são encontrados no ar, solo, sementes, rações e outros produtos (Diener *et al.*, 1987; Zaika e Buchanan, 1987). Estas substâncias são tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas, e, quando administradas a animais de laboratório, ocasionam alterações histológicas, indução de tumores e, em doses elevadas, são letais (Wogan, 1966; Maggon *et al.*, 1977; Gourama e Bullerman, 1995). De acordo com Hesseltine (1966), são necessárias quantidades consideráveis de aflatoxinas para realização de estudos referentes às características químicas, à degradação de produtos e ao efeito de baixa e alta doses em animais. Segundo Lemke *et al.* (1989), existe instabilidade na síntese de aflatoxinas “in vitro” por *A. flavus* e *A. parasiticus* isolados em laboratórios. Essa instabilidade dificulta a quantificação e a documentação das espécies incidentes. Os fungos micotoxigênicos crescem em vários substratos, porém, nem todos são apropriados à produção de toxinas. Os fatores destacados por Diener *et al.* (1987), considerados importantes na infecção e na formação de aflatoxinas em plantas também o são em substratos de laboratório, ou seja, a disponibilidade de nutrientes, temperatura, tempo de incubação, umidade e a toxigenicidade da espécie. Considerando a composição dos substratos, Hensarling *et al.* (1983) notificaram que a adição de sulfato de zinco ao meio de cultivo causa a redução de aflatoxinas, sendo estas auxiliadas através da suplementação com fitato de sódio. Por outro lado,

a asparagina e prolina podem estimular a produção de toxinas (Payne e Hangler, 1983). Tais resultados foram confirmados por Bullerman *et al.* (1984), os quais verificaram maior formação de aflatoxinas em presença de certos aminoácidos e ácidos graxos. Segundo Gourama e Bullerman (1995), o efeito de minerais na produção de aflatoxina é variável. O zinco e o manganês são essenciais para a biossíntese e a mistura de cádmio e ferro estimula a produção de aflatoxinas. Em relação à temperatura, Diener e Davis (1966) observaram maior formação de aflatoxinas em meio líquido semi-sintético a 25°C e menor nas temperaturas de 20°C ou 30°C. Para Singh *et al.* (1991), a umidade e a temperatura elevada favorecem o crescimento micelial e a produção de toxinas.

Não há método efetivo para prevenir a contaminação de sementes com aflatoxina e a descontaminação é ineficiente e antieconômica. Assim, a maneira comumente empregada para regular a concentração de micotoxinas consiste na identificação em rejeição de lotes de sementes contaminadas. Em casos com produtos suspeitos, são realizadas análises para determinar a quantidade de micotoxinas existentes (Jones, 1981). Para isso, foram desenvolvidos vários métodos, entre os quais o proposto por Fennel *et al.*, Bothast e Hesseltine *apud* Singh *et al.* (1991), denominado de BGYF (bright greenish yellow fluorescence). Neste, a detecção rápida das aflatoxinas é determinada, através da fluorescência produzida por substâncias específicas (ácido kójico e peroxidase) em sementes submetidas à luz UV de comprimento onda longa (365nm). Metodologias semelhantes foram desenvolvidas por Lin e Dianese (1976), os quais adotaram o meio ágar-coco (CAM-Coconut Agar Medium), e por Hara *apud* Wicklow *et al.* (1981), utilizando o meio APA (Aflatoxin Producing Ability) para distinguir *Aspergillus flavus* de produtores positivos ou negativos de aflatoxinas, baseando-se na fluorescência. Análises químicas, como cromatografia delgada (TLC - Thin Layer Chromatography), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ELISA (Scott, 1995), são adotadas na detecção da produção de toxina pelo fungo. As duas últimas têm sido também empregadas na quantificação das toxinas presentes nos produtos (Gourama e Bullerman, 1995).

Segundo Wogan (1966), as aflatoxinas B1 e B2 emitem luz fluorescente azul, enquanto as G1 e G2 emitem fluorescência amarela-esverdeada, quando submetidas à luz U.V.

A detecção de toxinas através da fluorescência, em colônias submetidas à luz UV de onda longa, foi observada entre o terceiro e o sétimo dia após a incubação a 25°C (Lemke *et al.*, 1989). Comparações realizadas por Davis *et al.* (1987), entre o meio ágar-coco (CAM) e o meio APA, notificaram que, apesar de o último produzir maior fluorescência, o ágar-coco se destacou pela simplicidade, pela rapidez na confecção e pelo baixo custo, já que utiliza, como principal ingrediente, leite de coco comercial. Segundo Lin e Dianese (1976), ótima concentração de leite de coco para produção de fluorescência foi observada com diluição de 1: 4. De acordo com Wicklow *et al.* (1981), isolados heterogêneos podem-se manifestar em meio APA como não-toxigênicos, no entanto, quando submetidos a grãos quebrados, produzem níveis de aflatoxinas superiores a 3 ppb. Tais situações foram observadas com os isolados NRRL 6536 e NRRL 6412, em grãos de milho. Embora não tenha avaliado o real potencial de *A. flavus*, produtores de aflatoxinas em relação aos não-toxigênicos, o meio APA destacou-se por não produzir falsos-positivos, podendo ser utilizado para determinar precisamente os isolados de *A. flavus*, produtores positivos. Quanto ao meio CAM, Lin e Dianese (1976) verificaram maior intensidade de fluorescência em pH 6,9 e em temperatura de 24°C a 32°C. A adição de promotores de aflatoxinas, separadamente, como peptona (1%), glicose (7%), ácido cítrico (0,4%), sacarose (20%) e extrato de levedura (2%), não teve efeito ou reduziu a produção de fluorescência, embora tivesse estimulado o crescimento vegetativo. A adição de zinco na dose de 0,4 mg/litro proporcionou fluorescência semelhante ao meio ágar-coco sem aditivos. Utilizando fortes isolados produtores de toxinas, NRRL 2999 e UNBF A12, a fluorescência em meio ágar-coco foi verificada, após 32 horas de incubação. Utilizando isolados com menor potencial na produção de toxinas, NRRL 3357 e NRRL 3251, a produção de fluorescência foi observada a 53 horas de incubação.

A influência do papel celofane na intensidade de fluorescência e no crescimento de *A. flavus* e a comparação dos diferentes substratos, quanto à detecção de toxinas, visando a maior agilidade e confiabilidade nos trabalhos de rotina laboratorial consistiram nos objetivos do trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de fitopatologia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina-PR. Foram empregados quatro tratamentos, com 25 repetições cada,

compreendidos pelos meios ágar-coco (Lin e Dianese, 1976), meio ágar-coco com celofane, ágar-água e papel de filtro com celofane. O *Aspergillus flavus* de sementes de soja foi isolado em meio Czapeck-ágar. Após 5 dias de incubação a 25°C, foram transferidos para as repetições que compunham cada tratamento, na forma de discos de 3 mm, retirados das colônias desenvolvidas. Cada repetição recebeu um disco com micélio do fungo na porção central da placa e, a seguir, incubado a 25°C em estufa incubadora BOD, com alternância de luz e escuro a cada 12 horas.

As leituras foram feitas a 24, 48, 72 e 96 horas após a transferência dos isolados para os substratos. O meio ágar-coco teve como constituição um homogeneizado obtido da diluição de 200 ml de leite de coco comercial mais 600 ml de água esterilizada e pH corrigido a 6,9. No meio ágar-coco com celofane, o procedimento foi o mesmo, com adição de um disco de celofane de diâmetro semelhante ao da placa de Petri sobre a superfície do meio. No substrato papel de filtro com celofane, em cada placa dispuseram-se três folhas de papel de filtro esterilizadas em autoclave (120°C/60 min) e sobre estas o celofane também asséptico. Neste caso, antes da disposição dos discos, o papel de filtro de cada repetição foi umedecido com água destilada esterilizada. O substrato meio ágar-água foi composto de água e 2,5% de ágar. Para avaliação, as colônias foram examinadas visualmente sob luz U.V. de comprimento onda longa (365 nm) emitida pelo aparelho “ultra-violet products”, notificando-se a intensidade e a coloração da fluorescência produzida, a qual foi quantificada subjetivamente pelo número de sinais “+” (Lin e Dianese, 1976), assim como o diâmetro (média dos eixos horizontal e vertical) e crescimento micelial para cada substrato pelo uso de paquímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, pode-se observar que, após 24 horas de incubação do fungo nos meios avaliados, a fluorescência produzida pelo *Aspergillus* foi pequena, indicando não ser período apropriado para leitura de rotina. Em meio ágar-coco e ágar-água, detectou-se de fluorescência de média intensidade, entretanto, a fluorescência de baixa intensidade, numericamente, foi maior e semelhante nos quatro meios considerados, e mesmo para o número de

placas sem fluorescência. O contato direto do disco de meio de cultura com *Aspergillus flavus* e o substrato, provavelmente, facilitou a difusão das toxinas para os meios. Nos tratamentos com celofane, este curto prazo de avaliação pode ser considerado como uma barreira física a toxinas, apesar da porosidade do material permitir sua passagem. Para o crescimento micelial, houve semelhança entre os substratos, não diferindo estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 1. Intensidade de fluorescência produzida por *Aspergillus flavus* em diferentes substratos submetidos a diferentes tempos de incubação. UEL. Londrina, PR. 1996.

Período de incubação	Substratos	Intensidade de fluorescência *			
		+++	++	+	---
24 horas	ágar-coco	0	1	12	12
	ágar-coco + celofane	0	0	11	14
	papel de filtro + celofane	0	0	12	13
	ágar-água	0	1	12	12
48 horas	ágar-coco	10	9	6	0
	ágar-coco + celofane	0	3	8	14
	papel de filtro + celofane	0	0	14	11
	ágar-água	0	1	11	13
72 horas	ágar-coco	14	6	4	1
	ágar-coco + celofane	0	0	13	12
	papel de filtro + celofane	0	0	11	14
	ágar-água	0	0	13	12
96 horas	ágar-coco	17	6	2	0
	ágar-coco + celofane	0	4	11	10
	papel de filtro + celofane	0	0	11	14
	ágar-água	0	0	12	13

onde: +++ : fluorescência com alta intensidade, ++ : fluorescência com média intensidade, + : fluorescência com baixa intensidade, --- : sem fluorescência

* Números de placas com presença de fluorescência

Na avaliação, após 48 horas de incubação, o substrato ágar-coco destacou-se dos demais por favorecer a detecção de fluorescência de alta e média intensidade. O meio ágar-água apresentou estabilidade dos resultados em relação a 24 horas. A utilização deste período de incubação para detecção de toxinas poderá ser somente adotado com meio ágar-coco, onde a detecção de fluorescência foi observada em 100% das repetições avaliadas, o que também confirma a capacidade toxigênica do fungo estudado (Tabela 1). Neste mesmo período, o

crescimento micelial, no meio ágar-coco, destacou-se do meio ágar-água e este, por sua vez, dos meios com celofane, os quais não diferiram estatisticamente (Tabela 2). O meio ágar-coco forneceu melhores condições para o crescimento, provavelmente, devido à disponibilidade de proteínas (17%), carboidratos (49,6%) com predominância de sacarose (32%), lípideos (28,6%), fibras (4,2%) e cinzas (0,8%) existentes no leite de coco (Davis *et al.*, 1987). Verificou-se no entanto, que a suplementação do meio com açúcares não proporcionou modificações significativas, pois a produção de aflatoxinas por *A. flavus* e de fluorescência foi intensa tanto nos meios com pouco açúcar, quanto naqueles suplementados com 5 a 20% de dextrose. A presença de ácido ascórbico no leite de coco, notificada por Lin e Dianese (1976), comumente empregado como conservante, provavelmente, não interferiu no desenvolvimento e na produção de toxinas, pois, além da diluição efetuada com água, o pH foi corrigido para 6,9. De acordo com Bullerman *et al.* (1984), a maior atividade antifúngica de ácido ascórbico é verificada abaixo de pH 5,0, decrescendo à medida que o pH aumenta.

Tabela 2. Crescimento de *Aspergillus flavus* (mm) em diferentes meios e tempos de incubação a 25°C, em estufa incubadora BOD. UEL. Londrina, PR. 1996.

Tempo de incubação	Substratos			
	ágar-coco	ágar-água	ágar-coco + celofane	papel de filtro + celofane
24 horas	10,5 d [*] A ^{**}	10,25 cA	9,38 aA	9,1 aA
48 horas	18,4 cA	15,68abB	11,32 aC	9,18 aC
72 horas	24,62 bA	17,66 aB	11,42 aC	10,02 aC
96 horas	32 aA	15 aB	11,48 aC	10,06 aC

C.V. = 13,12%

* Letras minúsculas iguais de uma mesma coluna não apresentam diferença estatística (Tukey 5%)

** Letras maiúsculas iguais de uma mesma linha não apresentam diferença estatística (Tukey 5%)

A superioridade do ágar-coco, em relação aos demais, foi comprovada também após 72 horas de incubação, onde se verificou a produção em todas as placas e o aumento do número de repetições com fluorescência com alta intensidade. Os outros três meios, que apresentaram fluorescência de média intensidade com 48 horas, não se comportaram desta maneira após 72 horas de incubação. Esse resultado demonstra certa instabilidade na produção, reduzindo a confiabilidade para uso destes em trabalhos rotineiros de laboratório (Tabela 1).

Após 96 horas de incubação, o meio ágar-coco apresentou maior detecção da fluorescência, com 17 placas (68%) manifestando alta intensidade de fluorescência, 6 placas (24%) com média intensidade e 2 placas (8%) com baixa intensidade. Esse mesmo meio, mas com celofane, apresentou aumento de fluorescência para média intensidade e redução no número de placas sem fluorescência, porém, não superando o meio ágar-coco sem celofane. Os demais meios não favoreceram aumentos na detecção, resultado esse confirmado pela pequena resposta obtida nos tempos de incubação considerados (Tabela 1).

As diferenças estatísticas para crescimento radial, observadas nas 48 horas entre os tratamentos, foram semelhantes às das 72 e 96 horas, manifestando o ágar-coco melhores resultados (Tabela 2). Considerando essas características, os meios podem ser separados em três grupos, apresentando, em primeiro lugar, o ágar-coco, seguido de ágar-água e por último, substratos com celofane.

Numa análise específica de cada tratamento nos tempos de incubação considerados, verificou-se que o ágar-coco favoreceu significativo aumento de crescimento micelial com média diária variável entre 6 e 8 mm. No meio ágar-água, o ótimo crescimento situou-se entre 24 horas a 48 horas de incubação estabilizando a partir das 72 horas, o qual não diferiu estatisticamente de 96 horas de incubação (Tabela 2). Os substratos com celofane, por outro lado, não promoveram crescimento significativo nos tempos considerados, mas parecem ter cumprido um dos seus objetivos, de evitar o crescimento do microrganismo no substrato, porém, permitindo a passagem das toxinas por ele produzidas. O diâmetro das colônias, nos tratamentos com celofane, não ultrapassou a 11,5 mm, ocorrendo limitação do crescimento das estruturas do fungo junto ao disco de Czapeck-ágar transferido na porção central de cada placa (Tabela 2). A retirada do celofane com as estruturas do fungo sobre o substrato permite extrair e quantificar pelos métodos convencionais a concentração de aflatoxinas que se difundiram no meio.

O meio ágar-coco é certamente o mais adequado para ser utilizado, devido aos fatores favoráveis detectados neste experimento, como: manutenção da produção e intensidade de fluorescência, ausência de contaminações, bom crescimento micelial radial e rapidez na avaliação. Tais resultados confirmam os obtidos por Lin e Dianese (1976) e Davis *et al.* (1987), os quais notificaram excelentes resultados na leitura de fluorescência, no intervalo de 2 a 5 dias após a incubação. Segundo

Davis *et al.* (1987), quando culturas de *A. flavus* foram incubadas por mais de sete dias, tornaram-se difíceis as avaliações, pois atingiram as bordas das placas, além de obscurecer a fluorescência. Lemke *et al.* (1989) destacaram a opacidade do meio ágar-coco. Esta alvura da superfície é útil em diferenciações da coloração dos esporos e permite acompanhar o rápido crescimento. Outro ponto, é que como sua superfície é altamente absorptiva à luz ultravioleta, permite detectar no fundo das placas as zonas de fluorescência produzidas pelas aflatoxinas.

Dados preliminares revelaram maiores contaminações no meio ágar-coco com celofane. Embora tenha sido realizada em condições assépticas, essa maior contaminação pode ter ocorrido em função da necessidade de abertura das placas com ágar-coco para deposição dos discos de celofane. Esse manuseio e maior exposição ao ambiente podem levar a maiores probabilidades de contaminações. O substrato papel de filtro com celofane, apesar de apresentar resultados pouco representativos, destacou-se pela facilidade de preparo e menor contaminação. Isto, em parte, está relacionado às condições desfavoráveis que tal meio proporciona ao estabelecimento de contaminantes.

CONCLUSÕES

O meio ágar-coco é o mais adequado para a verificação da produção de aflatoxinas via fluorescência, produzida no substrato por isolados de *Aspergillus flavus*, obtido de grãos de soja, devido às características vantajosas observadas, o que facilita consideravelmente a determinação de espécies toxigênicas em curto prazo.

A detecção de aflatoxinas pela produção de fluorescência em meio ágar-coco deve ser feita a partir de 72 horas da inoculação, quando as placas estão incubadas em estufa BOD a 25°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOTHAST, R.J. & HESSELTINE, C.W. Bright greenish-yellow fluorescence and aflatoxin in agricultural commodities. In: SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, V. & MATHUR, S.B. *An illustrated manual on identification of seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their Mycotoxins*. Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 1991. p.137.

- BULLERMAN, L.B., SCHROEDER, L.L. & PARK, K. Formation and control of mycotoxins in food. *J. Food Prot.*, 47(8):637-646, 1984.
- DAVIS, N.D., IYER, S.K. & DIENER, U.L. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:1593-1595, 1987.
- DIENER, U.L. & DAVIS, N.D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 56:1390-1393, 1966.
- DIENER, U.L., COLE, R.J., SANDERS, T.H., GARY, A.P., LEE, L.S. & KLICH, M.A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:249-70, 1987.
- FENNELL, D.I., BOTHAST, R.J., LILLEHOJ, E.B. & PETERSEN, R.E. Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxins. In: SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, V. & MATHUR, S.B. *An illustrated manual on identification of Seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their Mycotoxins*. Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 1991. p.137.
- GOURAMA, H. & BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *J. Food Prot.*, 58(12):1395-1404, 1995.
- HARA, S. In: WICKLOW, D.T., SHOTWELL, O.L. & ADAMS, G.L. Use of aflatoxin producing ability medium to distinguish aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(3):697-699, 1981.
- HENSARLING, T.P., JACKS, T.J., LEE, L.S. & CIEGLER, A. Production of aflatoxins on soybean and cottonseed meals. *Mycopathologia*, 83:125-127, 1983.
- HESELDTINE, C.W., SHOTWELL, O.L., ELLIS, J.J. & STUBBLEFIELD, R.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriol. Rev.*, 30(4):795-805, 1966.
- JONES, R.K., DUNCAN, H.E. & HAMILTON, P.B. Planting date and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathology*, 71(8):810-816, 1981.
- LEMKE, P.A., DAVIS, N.D. & GREECH, G.W. Direct visual detection of aflatoxin synthesis by minicolonies of *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(7):1808-1810, 1989.
- LIN, M.T. & DIANESE, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp.* *Phytopathology*, 66:1466-1469, 1976.
- MAGGON, K.K., GUPTA, S.K. & VENKITASUBRAMANIAN, T.A. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.*, 41:822-855, 1977.
- PAYNE, G.A. & HANGLER, W.M. Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(4):805-812, 1983.
- SCOTT, P.M. *Natural toxins*. AOAC Methods of Analysis, 49:1-51, 1995.
- SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, V. & MATHUR, S.B. *An illustrated manual on identification of seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their Mycotoxins*.

Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 1991. p.137.

WICKLOW, D.T., SHOTWELL, O.L. & ADAMS, G.L. Use of aflatoxin producing ability medium to distinguish aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(3):697-699, 1981.

WOGAN, G.N. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriol. Rev.*, 30(2):460-470, 1966.

ZAICA, L.L. & BUCHANAN, R.L. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *J. Food Prot.*, 50(8):691-708, 1987.