Vietnam Journal of Community Medicine, Vol 63, No 6 (2022) 16-23

THE PREVALENCE OF FUNGAL INFECTION IN MEDICINAL PLANTS AT NGHE AN HOSPITAL OF TRADITIONAL MEDICINE, 2019

Tran Quang Phuc[1,*], Ho Van Thang[2], Do Thi Thanh Thuy[3]

[1]*National Hospital of Malariology, Parasitology and Entomology - 34 Trung Van, Nam Tu Liem, Hanoi, Vietnam*
[2]*Nghe An Hospital of Traditional Medicine - No. 1 Tue Tinh, Ha Huy Tap, Vinh, Nghe An, Vietnam*
[3]*198 Hospital - No. 9, Tran Binh, Mai Dich, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

Received 01/08/2022
Revised 15/09/2022; Accepted 13/10/2022

ABSTRACT

Objectives: Due to poor storage conditions, a large percentage of medicinal plants are infected with fungi. Parasitic fungi living in herbal medicine produce toxic substances such as aflatoxin, and ochratoxin, affecting the health of users. The study was conducted in the Nghe An Hospital of Traditional Medicine in 2019 to determine the prevalence of fungal infection and fungal composition in medicinal herbs.

Subjects and methods: Subjects of the study included medicinal plants preserved at the drugstore of Nghe An Hospital of Traditional Medicine. The study employed a descriptive experimental research method in Laboratory.

Results: The prevalence of fungal infection by direct KOH examination was 40.0%, of which filamentous fungi accounted for 92.0%, and yeast only 8.0%. The prevalence of fungal infection by culture in the Saboraud agar medium was 48.1%, of which the rate of fungal infection in Chinese medicinal herbs was 41.1%, and in Vietnamese medicinal herbs was 62.2%. By PCR, 11 species of fungi were identified, of which *A. niger* accounted for the highest percentage of 60.0% (30/50), followed by *A. tubingensis* 18.0% (9/50).

Conclusions: The prevalence of fungal infection in medicinal plants was as high as 48.1% with a diverse species composition (11 species). It is necessary to have appropriate preservation measures to reduce fungal infection in medicinal plants.

Keywords: Traditional medicine, medical fungi.

*Corressponding author
Email address: Phucnimpe@gmail.com
Phone number: (+84) 983 000 568
https://doi.org/10.52163/yhc.v63i6.448

NGHIÊN CỨU TỶ LỆ NHIỄM NẤM Ở CÁC VỊ THUỐC ĐÔNG DƯỢC TẠI BỆNH VIỆN ĐÔNG Y TỈNH NGHỆ AN NĂM 2019

Trần Quang Phục[1,*], Hồ Văn Thăng[2], Đỗ Thị Thanh Thủy[3]

[1]*Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương - 34 Trung Văn, Nam Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam*
[2]*Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An - Số 1 đường Tuệ Tĩnh, phường Hà Huy Tập, Tp Vinh, Nghệ An, Việt Nam*
[3]*Bệnh viện 198 Bộ Công An - Số 9 P. Trần Bình, Mai Dịch, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Ngày nhận bài: 01 tháng 08 năm 2022
Chỉnh sửa ngày: 15 tháng 09 năm 2022; Ngày duyệt đăng: 13 tháng 10 năm 2022

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Một tỷ lệ không nhỏ các vị thuốc Đông dược nhiễm nấm do điều kiện bảo quản không tốt. Khi nấm ký sinh trên các vị thuốc Đông dược sinh ra các chất độc như aflatoxin, ochatoxin ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người sử dụng… Đề tài nghiên cứu tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Đông dược tại Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An 2019.

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ, thành phần loài nấm ký sinh ở các vị thuốc Đông dược tại Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An năm 2019.

Đối tượng và phương pháp: Các vị thuốc Đông dược bảo quản tại kho thuốc Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An. Thiết kế bằng phương pháp nghiên cứu mô tả thực nghiệm tại Labo.

Kết quả: Tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật soi tươi trong môi trường KOH là 40,0%. Tỷ lệ nấm sợi chiếm 92,0%, nấm men chỉ chiếm 8,0%. Tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud là 48,1%, trong đó tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Bắc là 41,1%, thuốc Nam 62,2%. Bằng kỹ thuật PCR đã xác định 11 loài nấm, trong đó: *A. niger* chiếm tỷ lệ cao nhất 60,0%(30/50); tiếp đến *A. tubingensis* 18,0% (9/50).

Kết luận: Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Đông dược cao (48,1%), thành phần loài đa dạng (11 loài), cần có biện pháp bảo quản phù hợp giảm tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Đông dược.

Từ khóa: Thuốc Đông dược, nấm y học.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm là những sinh vật có nhân và thành tế bào thực sự, dị dưỡng, sinh sản bằng bào tử. Nấm phân bố rộng rãi trong tự nhiên, phần lớn sống hoại sinh trong đất, số ít có khả năng ký sinh gây bệnh cho người và động vật [1]. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm của nước ta và quá trình bảo quản không tốt do thiếu thốn phương tiện và kỹ thuật bảo quản, các vị thuốc Đông dược rất dễ bị ẩm mốc. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch thường nhiễm các loài nấm *Aspergillus* spp...[2],

*Tác giả liên hệ
Email: Phucnimpe@gmail.com
Điện thoại: (+84) 983 000 568
https://doi.org/10.52163/yhc.v63i6.448

[3]. Tổ chức Nông lương thế giới (FAO) khuyến cáo aflatoxin cần được kiểm soát chặt trẽ trong các sản phẩm sau thu hoạch. Các nước cần có bộ công cụ đủ mạnh là khung pháp lý về kỹ thuật phát hiện, đến sản xuất và lưu thông phân phối, nhằm bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng [4], [5], [6].

Tại Nghệ An, cho đến nay rất ít công trình nghiên cứu sâu về nấm ký sinh trên các vị thuốc Đông dược, các yếu tố nguy cơ ô nhiễm mầm thì rất cao... Với tính cấp thiết của vấn đề chúng tôi thực hiện đề tài: ***Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc đông dược tại Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An 2019***, nhằm xác định tỷ lệ nhiễm nấm trong một số vị thuốc Đông dược tại Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An năm 2019.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu

***- Đối tượng nghiên cứu*:** Các vị thuốc Đông dược gồm các vị thuốc Nam dược (khai thác trong nước), các vị thuốc Bắc.

- Địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An

- Thời gian nghiên cứu: Từ 1/2019 -12/2019

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Đề tài sử dụng thiết kế nghiên cứu mô tả thực nghiệm tại Labo

2.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

- Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho một nghiên cứu mô tả một tỷ lệ hiện mắc [7]

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \frac{p(1-p)}{p\omega^2}$$

Trong đó: n là cỡ mẫu nghiên cứu, p: tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Đông dược, chọn p = 0,5 (theo Đậu Huy Hoàn 2018), ω là sai số tương đối, chọn ω = 0,17, $Z^2_{(1-\alpha/2)}$ = 1,96 là hệ số tin cậy, với độ tin cậy 95%. Với các giá trị đã chọn tính được n = 133, thực tế nghiên cứu 135 mẫu

- Phương pháp chọn mẫu: Dựa vào danh mục thuốc Đông dược có trong kho thuốc của Bệnh viện, chọn ngẫu nhiên 135 mẫu thuốc nghiên cứu.

2.2.3. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật soi tươi và bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud. Xác định loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

2.2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Kỹ thuật soi tươi, kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Sauboraud; Kỹ thuật sinh học phân tử định danh loài nấm với gen mồi ITS1, ITS4.

+ Kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Sabouraud: Môi trường có độ pH ≤ 4,5 và có cloramphenicol. Các mẫu (+) được thực hiện kỹ thuật PCR và giải trình tự gen để định loài.

+ Kỹ thuật PCR và giải trình tự gen định loài nấm: Dụng cụ: Máy PCR (GeneAmp PCR system 9700 AB - Applied Biosystem, Mỹ), máy ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettech, Đức), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ), bộ điện di, gel agarose 1,5%, dung dịch TBE 0.5%. Cặp mồi cho phản ứng PCR là ITS5 và NL4 khuếch đại đoạn gen chứa 1 phần gen 18S rDNA; Toàn bộ đoạn gen 5.8S rDNA; Toàn bộ các đoạn giao gen ITS1, ITS2 và một phần gen 28S rDNA, kích thước khoảng 1000-1200bp, tùy từng loài nấm.

Tách chiết DNA: Các mẫu nấm được tách chiết ADN bằng bộ kít Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Cat. # 27300, Norgen Biotek Corp, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA của nấm sau khi tách chiết được sử dụng làm khuôn (template) cho phản ứng PCR.

Giải trình tự gen định danh loài nấm:

Trong đề tài này sử dụng mã số genbank KF617362.1. Kết quả kiểm định nếu tỷ lệ tương đồng > 95,0% là đúng tên loài như trong ngân hàng genbank; Nếu tỷ lệ tương đồng < 95,0% là không đúng tên loài như trong ngân hàng genbank.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được thống kê và phân tích bằng các phần mềm SPSS 16.0 và Stata.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật soi tươi

Bảng 3.1. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc Đông dược bằng kỹ thuật soi tươi (n = 135)

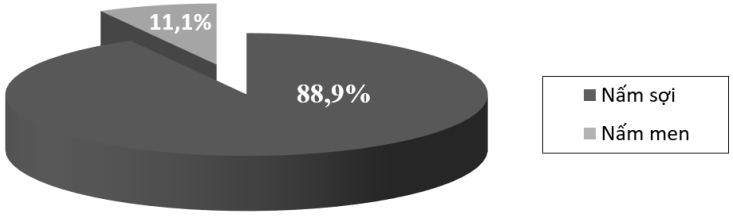
Nguồn vị thuốc	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu nhiễm nấm	Tỷ lệ (%)
Các mẫu thuốc Bắc (1)	90	25	27,80
Các mẫu thuốc Nam (2)	45	29	64,44
Tổng	135	54	40,0
Giá trị p	(1: 2) < 0,01		

Tỷ lệ nhiễm nấm chung bằng kỹ thuật soi tươi trong môi trường KOH là 40,0%. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Nam là 64,44%, ở các vị thuốc Bắc là 27,80%.

- Tỷ lệ nấm sợi, nấm men trong các mẫu thuốc Đông dược bằng hình thái học

Từ 54 mẫu nấm (+), được định danh bằng hình thái học như sau:

Hình 3.1. Tỷ lệ nấm sợi, nấm men (n = 54)



Tỷ lệ nấm sợi chiếm 92,0%, nấm men chỉ chiếm 8,0%.

Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm chung ở các vị thuốc Bắc và Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud (n = 135)

Nhóm vị thuốc	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu nhiễm nấm	Tỷ lệ (%)
Các vị thuốc Bắc (1)	90	37	41,1
Các vị thuốc Nam (2)	45	28	62,2
Tổng	135	65	48,1
Giá trị p	(1: 2) < 0,01		

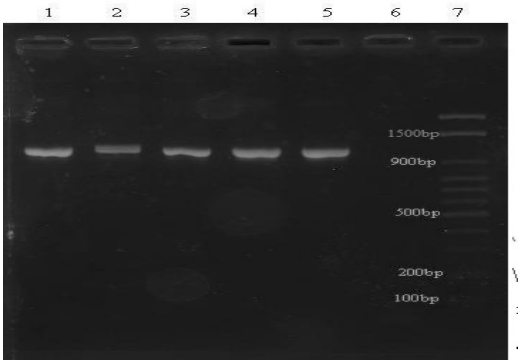
Tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud là 48,1%.

Có sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Bắc và các vị thuốc Nam (41,1% so với 62,2%, với p < 0,01).

3.2. Kết quả định danh loài nấm ở các mẫu thuốc Đông dược bằng kỹ thuật PCR

Từ 65 mẫu nấm (+) nuôi cấy trong môi trường Saboraud, để thực hiện kỹ thuật PCR và giải trình tự gen, có 15 mẫu hỏng, 50 mẫu cho kết quả tách chiết PCR và chạy điện di như sau:

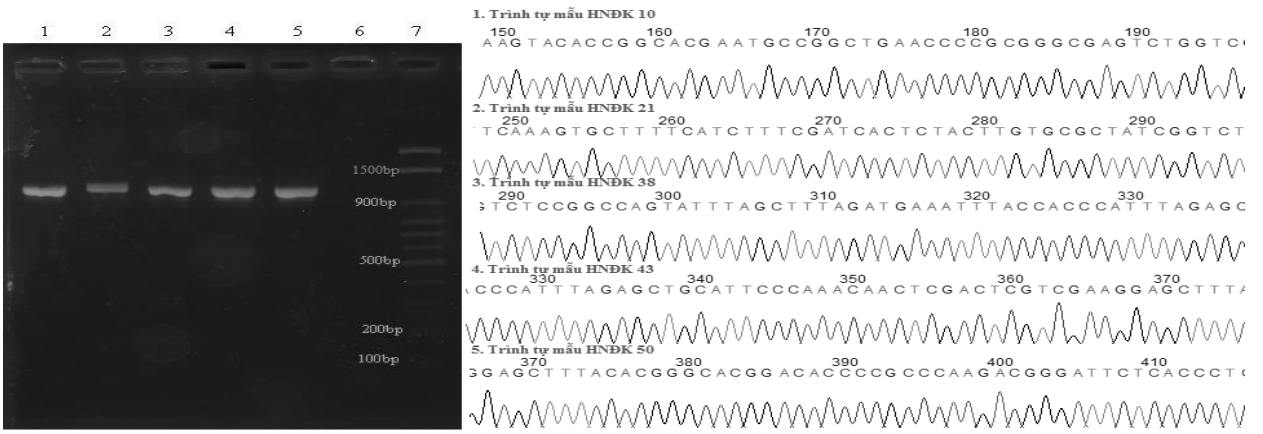
Hình 3.1. Sản phẩm điện di một số mẫu nấm phân lập



Hình 3.1, cho thấy, sản phẩm PCR của các mẫu nấm phân lập từ các vị thuốc Đông dược tại các bệnh viện của tỉnh Nghệ An chỉ có 1 band duy nhất, rõ nét, các band này đều có kích thước khoảng 1200bp, điều này chứng tỏ quy trình kỹ thuật và gen mồi lựa chọn là phù hợp.

- Kết quả giải trình tự gen:

Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen



Hình 3.2 cho thấy, đồ thị chạy PCR của các mẫu nấm phân lập từ dược liệu tại các bệnh viện của tỉnh Nghệ An là các đường liên tục, khớp với đồ thị chạy PCR của các mẫu gen chuẩn quốc tế. Trình tự các nucleotide thu được ở các mẫu đều có chất lượng tốt.

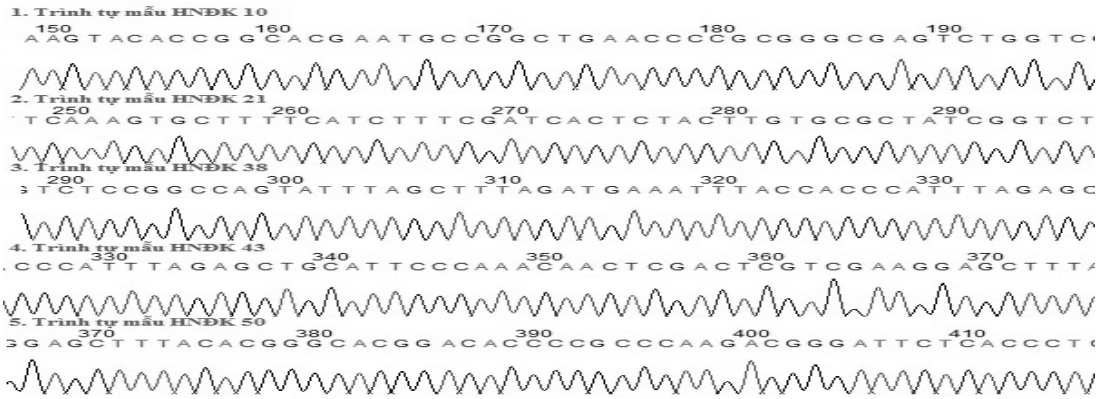
Kết quả này cho thấy gen mồi lựa chọn, điều kiện cho phản ứng PCR là hoàn toàn phù hợp và đạt mức tối ưu.

- Kết quả giải trình tự so sánh với ngân hàng gen chuẩn quốc tế

Sau khi nhân bội gen, chạy điện di, sản phẩm PCR tinh sạch được kiểm định so sánh với ngân hành genbank chuẩn quốc tế là các chủng chuẩn đã được đăng ký mã số trên ngân hàng genbank quốc tế với sự kiểm định của các labo có uy tín trên thế giới. Trong đề tài này chúng tôi sử dụng mã số genbank KF617362.1 .

Kết quả kiểm định độ tương đồng như Hình 3.3 và Bảng 3.3 sau:

Hình 3.3. Trình tự các nucleotit trong gen của các mẫu giải trình tự



Đồ thị hiển thị trên máy chạy PCR là các đường liên tục, rõ nét rất điển hình với các mẫu gen chuẩn quốc tế KF617362.1 đã được đăng ký bản quyền của các labo chuẩn quốc tế có uy tín.

- Tổng hợp thành phần loài nấm phân lập từ các mẫu thuốc Đông dược được thực hiện kỹ thuật PCR và giải trình tự gen

Bảng 3.3. Thành phần loài nấm phân lập từ các mẫu thuốc Đông dược (n =50)

Loài nấm	Dạng hình thái	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Aspergillus niger	Nấm sợi	30	60,0
Aspergillus tubingensis	Nấm sợi	9	18,0
Rhizopus oryzae	Nấm sợi	3	6,0
Aspergillus oryzae	Nấm sợi	1	2,0
Aspergillus flavus	Nấm sợi	1	2,0
Corynespora smithii	Nấm sợi	1	2,0
Alternaria tenuissima	Nấm sợi	1	2,0
K. ohmeri	Nấm men	1	2,0
C. parapsilosis	Nấm men	1	2,0
Fungal spp	Nấm men	1	2,0
Chưa xác định	Nấm men	1	2,0

Có 11 loài nấm khác nhau phân lập từ các mẫu thuốc đông dược. *A. niger* chiếm tỷ lệ cao nhất 60,0%(30/50); Tiếp đến *A. tubingensis* 18,0%(9/50); 1 mẫu (2,0%) chưa xác định loài.

4. BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ nhiễm nấm bằng soi tươi và nuôi cấy trong môi trường Saboraud

Với 135 vị thuốc có tên trong danh mục thuốc được bảo hiểm chi trả và là danh mục thuốc thiết yếu trong hoạt động chuyên môn về y học cổ truyền. Tỷ lệ phát hiện nhiễm nấm chung bằng kỹ thuật soi tươi trong môi trường KOH 20% là 40% và bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud là 48,1%. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với thực tiễn là hiện nay là phương pháp chẩn đoán nhiễm nấm bằng nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud vẫn là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán.

Kết quả nghiên của đề tài này cũng phù hợp với thực tế là các mẫu thuốc Nam có tỷ lệ nhiễm nấm cao hơn các mẫu thuốc Bắc. Các mẫu thuốc Nam hầu hết là khai thác sơ chế bằng phơi, sao, sấy không có các biện pháp khác. Khi gặp điều kiện thời tiết nóng, ẩm thì rất dễ bị nhiễm nấm. Đối với các mẫu thuốc Bắc hầu hết có sử dụng nhiều hình thức bảo quản vật lý, hóa học... như: tẩm, sao, sấy, sông khói, một số vị thuốc còn có thể có cả kim loại nặng để bảo quản, vì vậy tỷ lệ nhiễm nấm thấp hơn thuốc Nam là hợp lý.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số nghiên cứu trong và ngoài nước. Nguyễn Đinh Nga (2012), nghiên cứu khảo sát mức độ nhiễm nấm trong một số dược liệu bán ở Quận 5 – thành phố Hồ Chí Minh bằng phương pháp định danh loài nấm bằng khóa định loài, kết quả tỷ lệ nhiễm nấm trong dược liệu là 61%(86/141) [4]. Lý Thu Hương (2012), nghiên cứu tình trạng nhiễm vi nấm và ochratoxin A trong đất và rễ cây trồng tại Tây Nguyên thấy tỷ lệ nhiễm vi nấm là 43,75%, tỷ lệ nhiễm thay đổi từ 11,1% đến 62,5% [8]. Đậu Huy Hoàn (2018), nghiên cứu tỷ lệ nhiễm nấm trên các vị thuốc Đông dược, tỷ lệ nhiễm 51,8% (262/505), trong đó thuốc Bắc là 45,53% và thuốc Nam là 72,8%, nấm sợi chiếm 92% và 8% là nấm men. Có 11 loài nấm khác nhau phân lập [9]. Trên thế giới việc nghiên cứu nhiễm nấm phát triển rất mạnh, đa số là các nghiên cứu xác định sự có mặt của nấm thông qua các độc tố của chúng như aflatoxin, ochatoxin, fumonisin[10]. Kwale và CS (2014), nghiên cứu ở 5 quốc gia với 4 vùng sinh thái tại châu Phi xác định nhiễm nấm thông qua có mặt của aflatoxin B1, kết quả: 76% mẫu ngô, 64% mẫu kê, 60% mẫu lúa nhiễm độc tố của nấm, có nghĩa là tỷ lệ nhiễm nấm còn cao hơn tỷ lệ nhiễm các độ tố phát hiện ở trên [11].

4.2. Tỷ lệ thành phần loài nấm qua xác định bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen

Kết quả của đề tài tại Hình 3.1, Hình 3.2, Hình 3.3 cho thấy Gen mồi, các điều kiện cho phản ứng PCR, quy trình kỹ thuật thực hiện kỹ thuật PCR đề tài thực hiện là phù hợp. Khi so sánh với ngân hàng genbank các mẫu xác định loài có độ tương đồng rất cao > 99,00%.

Kết quả đã phát hiện 11 loài nấm, kết quả này cũng phản ánh sự đa dạng về thành phần loài nấm cũng như vai trò quan trong của *Aspergillus* spp như *Aspergillus niger, Aspergillus tubingensis, Aspergillus flavus*. Đây là các loài nấm có tỷ lệ cao nhất *Aspergillus niger* chiếm tới 60,0%, *Aspergillus tubingensis* chiếm 18,0%. Kết quả này phù hợp với một số đề tài nghiên cứu khác. Lý Thu Hương (2012), nghiên cứu tình trạng nhiễm vi nấm và ochratoxin A trong đất và rễ cây trồng tại Tây Nguyên, kết quả cho thấy: Thành phần loài nấm nấm chủ yếu là *Aspergillus niger* và *Penicillium viridicatum* [8]. Andre El Khoury và CS (2011), đã sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP đã định danh thành phần các loài nấm ở nho chủ yếu do 2 loài *Aspergillus flavus* và *Aspergillus paraciticus* chiếm tới > 70% thành phần loài nấm [10]. Nghiên cứu ở 18 nhóm hạt cà phê theo cách trồng truyền thống tại vùng Nam Minas Brazil tác giả Fabiana Aparecida Couto (2014), đã xác nhận có 32 loài nấm thuộc 13 giống nấm khác nhau. Tỷ lệ cao nhất *Aspergillus* gồm hai loài *Aspergillus plavus, Aspergillus niger.* Một số mẫu đa nhiễm là sự kết hợp hai loài *Aspergillus plavus* với *Cladosporium* spp [12].

5. KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud 48,1%. Tỷ lệ nấm sợi chiếm 92,0%, nấm men 8,0%, trong đó tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc Bắc là 41,1%, thuốc Nam 62,2%. Đã xác định 11 loài nấm khác nhau phân lập từ các mẫu thuốc Đông dược bằng kỹ thuật PCR, trong đó: *A. niger* chiếm tỷ lệ cao nhất 60,0%(30/50); Tiếp đến *A. tubingensis* 18,0%(9/50); *Rhizopus oryzae* 6,0%(3/50); 1 mẫu(2,0%) chưa xác định loài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Bộ Y tế, Ký sinh trùng thực hành, Sách đào tạo dược sỹ đại học, NXB Y học Hà Nội, 283 Trang, 2012.

[2] Cornell University, USA, Aflatoxins: Ocucurrence and Healt, Risks, Tekboo, 2013.

[3] David GS, Mycotoxins in Crops: A threat to Human and Domestic Animal Health,Virgnia Polytechnic Institute and State University Blachsburg. VA., 2013.

[4] Nguyễn Đình Nga, Nguyễn Thị Kiều Khanh, Văn Phố, "Khảo sát mức độ nhiễm nấm mốc và aflatoxin trong một số dược liệu bán ở Quận 5 – Thành phố Hồ Chí Minh", Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh, "Tập 16", Phụ bản số 1, Trang 93-96, 2012

[5] World Health Organization, Jont FAO/WHO Food Standards Programe Condex Committee On Contannamnts In Foods, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, pp.118.

[6] World Health Organization, Jont Fao/WHO Food Standards Programe Condex Committee On Contannamnts In Foods, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018, 178 pp

[7] National Institute of Malariology Parasitology and Enmotology, Health Researth Methology, Postgraduate and graduate textbooks, Medical Publishing House, Hanoi, 2018.

[8] Lý Thu Hương, Mức độ nhiễm vi nấm sinh ochratoxin A trong đất, và rễ cây cà phê ở một số vùng trồng cà phê trọng điểm, Luận văn thạc sỹ chuyên ngành Vi sinh vật, Đại học Khoa học tự nhiên- Đại học Quốc gia Hà Nội, 2012.

[9] Đậu Huy Hoàn, Nghiên cứu thực trạng nhiễm nấm và aflatoxin trên các vị thuốc đông dược tại một số bệnh viện tỉnh Nghệ An (2016 -2018), Luận án tiến sỹ y học, 2018.

[10] Andre EK, Ali A, Toufic R et al., , Defferentiation Between Aspergillus flavus and A Aspergillus parasiticus from pure culture and alflatoxin-Contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflr-aflj intergennic specer, Jounal of food science, Vol.76(4), 2011, pp.247-253.

[11] Ajfand, Africa Scholarly Science Communications Trust, African Jounal of Food Agricuture, Nutrition and Development, Vol.16(3), 2016, pp.10992-11003.

[12] Pereira M, Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation, African Jounal of Microbiology Research, Vol.8(6), 2014, pp.2505-2512, Doi: 10.5897/AJMR2013.6571.