



مطالعه‌ای بر روی نان سنتی تبریز: نقش کپک‌ها در تولید آفلاتوکسین و اثرات احتمالی آن بر سلامت انسان

آمنه بهشت پسند

چکیده:

نان به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین مواد غذایی در رژیم روزانه انسان، در معرض خطر آلودگی به آفلاتوکسین‌ها قرار دارد. ترکیباتی سمی که توسط گونه‌های خاصی از قارچ‌ها مانند *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* تولید می‌شوند. هدف این مطالعه، بررسی نقش کپک‌ها در تولید آفلاتوکسین در زنجیره تولید نان و تحلیل اثرات این سموم بر سلامت انسان بود. نمونه‌های نان سنتی از مناطق مختلف جمع‌آوری و با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و روش‌های الیزا و از نظر میزان آفلاتوکسین B₁ و همچنین بررسی سمیت و اثرات بیولوژیکی آفلاتوکسین B₁ با استفاده از تست رنگ سنجی سنچس MTT و آزمون فلوسایتومتری به منظور سنجش میزان آپوپتوز بررسی گردید. نتایج نشان داد پنج ایزوله قارچی از نمونه‌های نان سنتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تبریز جداسازی و با کدهای TAF-1 تا TAF-5 نام‌گذاری شدند، بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که ایزوله‌ها دارای تفاوت‌های قابل توجهی در رنگ، بافت و ویژگی‌های پشت‌کلنی بودند. در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا چهار پیک آفلاتوکسین‌های G₁، G₂، B₂ و B₁ مشاهده شد، که پیک مربوط به آفلاتوکسین B₁ بیشترین شدت فلورسانس و سطح زیر منحنی داشت. نتایج الیزا نشان داد در غلظت‌های پایین (۵ و ۱۰ ppb)، درصد بازیابی بسیار بالا و نزدیک به ۱۰۰٪ بود که بیانگر دقت و کارایی مناسب روش در این محدوده است. آزمون MTT نشان داد با افزایش غلظت آفلاتوکسین، درصد سمیت در زمان‌های طولانی‌تر (۴۸ و ۷۲ ساعت) شدیدتر بوده و در غلظت‌های بالاتر (۱ و ۵ میکرومولار) به بیشترین مقدار خود رسیده است. فلوسایتومتری با کیت Annexin V-FITC/PI نشان داد در غلظت ۵ میکرومولار افزایش قابل توجهی در درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک مشاهده شد که بیانگر فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی و سمیت مؤثر آفلاتوکسین B₁ در غلظت ۵ میکرومولار است. یافته‌ها نشان می‌دهند که شرایط نامناسب نگهداری آرد و نان می‌تواند زمینه‌ساز رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و تهدیدی جدی برای سلامت عمومی باشد. این مطالعه بر ضرورت پایش مستمر، آموزش تولیدکنندگان، و بهبود شرایط بهداشتی در زنجیره تولید نان تأکید دارد.

کلمات کلیدی: نان سنتی، کپک، آفلاتوکسین، سلامت



۱. مقدمه

نان یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های غذایی پایه در رژیم‌های تغذیه‌ای انسان است که از دیرباز نقش کلیدی در تأمین انرژی و مواد مغذی ایفا کرده است. این محصول حاصل فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیکی پیچیده‌ای مانند تخمیر، گلوتن‌سازی و ژلاتینه شدن نشاسته است که در نهایت منجر به تولید ساختاری متخلخل، قابل هضم و خوش طعم می‌شود (۱). ترکیب اصلی نان شامل آرد غلات (عمدتاً گندم)، آب، نمک و در برخی موارد مخمر یا مواد بهبوددهنده است که هر یک در کیفیت نهایی محصول تأثیر بسزایی دارند. نان نه تنها منبعی غنی از کربوهیدرات‌ها و فیبر غذایی است، بلکه در صورت غنی‌سازی می‌تواند حاوی ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری نیز باشد (۲). بررسی علمی نان از منظر تغذیه‌ای، میکروبیولوژیکی و فناوری تولید، زمینه‌ساز ارتقای سلامت عمومی و بهبود کیفیت این ماده غذایی پرمصرف در جوامع مختلف است. آفلاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها هستند که توسط گونه‌های خاصی از کپک‌ها، به‌ویژه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* تولید می‌شوند (۳). این کپک‌ها قادرند در شرایط محیطی خاصی مانند دمای بالا، رطوبت زیاد، تهویه ضعیف و وجود مواد آلی، رشد کرده و ترکیبات سمی آفلاتوکسینی را تولید کنند (۴). آرد گندم، به‌عنوان ماده اولیه اصلی در تهیه نان، در صورت نگهداری نامناسب در انبارهای مرطوب و گرم، مستعد رشد این کپک‌ها و تولید آفلاتوکسین می‌شود (۵). فرآیند تولید نان شامل مراحل متعددی از جمله برداشت گندم، ذخیره‌سازی، آسیاب، حمل‌ونقل، خمیرگیری، پخت و نگهداری نهایی است (۶). در هر یک از این مراحل، اگر شرایط بهداشتی و محیطی کنترل نشود، امکان رشد کپک‌ها و تولید آفلاتوکسین وجود دارد. به‌ویژه در نان‌های سنتی که بدون مواد نگهدارنده و در شرایط غیرصنعتی تولید می‌شوند، احتمال آلودگی قارچی بیشتر است (۷). کپک‌ها می‌توانند در سطح یا داخل نان رشد کرده و در صورت مصرف، سلامت مصرف‌کننده را به خطر اندازند. آفلاتوکسین‌ها دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌ای هستند که آن‌ها را به ترکیباتی بسیار واکنش‌پذیر و سمی تبدیل می‌کند (۸). از منظر اپیدمیولوژیک، کشورهای در حال توسعه با اقلیم گرم و مرطوب، مانند ایران، بیشتر در معرض خطر آلودگی نان به آفلاتوکسین هستند. مطالعات نشان داده‌اند که در برخی مناطق، میزان آفلاتوکسین در نان‌های سنتی از حد مجاز تعیین‌شده توسط سازمان‌های بین‌المللی فراتر رفته است (۹). این موضوع نه تنها سلامت عمومی را تهدید می‌کند، بلکه می‌تواند مانعی برای صادرات محصولات غذایی و کاهش اعتماد مصرف‌کنندگان باشد. آفلاتوکسین‌ها، به‌ویژه نوع B₁، از جمله سمی‌ترین ترکیبات شناخته‌شده در میان مایکوتوکسین‌ها هستند که اثرات جدی و چندوجهی بر سلامت انسان دارند. این ترکیبات پس از ورود به بدن از طریق مصرف مواد غذایی آلوده مانند نان، به سرعت در کبد متابولیزه شده و منجر به تولید اپوکسیدهای فعال می‌شوند که با DNA سلولی واکنش داده و جهش‌های ژنتیکی ایجاد می‌کنند (۱۰). این فرآیند زمینه‌ساز بروز سرطان سلول‌های کبدی (هپاتوسلولار کارسینوما) است و به همین دلیل، آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) آفلاتوکسین B₁ را در گروه ۱ مواد سرطان‌زای انسانی طبقه‌بندی کرده است (۱۱).



علاوه بر اثرات سرطان‌زایی، آفلاتوکسین‌ها دارای خاصیت ایمنونوتوکسیسیته هستند و می‌توانند عملکرد سیستم ایمنی بدن را به‌طور قابل توجهی تضعیف کنند. این سموم با اختلال در تولید سلول‌های ایمنی و کاهش فعالیت فاگوسیت‌ها، بدن را در برابر عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی آسیب‌پذیرتر می‌سازند (۱۲). در کودکان، مواجهه مزمن با آفلاتوکسین‌ها می‌تواند منجر به اختلالات رشد، کاهش جذب مواد مغذی مانند ویتامین‌های A و D، آهن، روی و سلنیوم، و در نهایت بروز سوءتغذیه پروتئینی یا کو/شیورکور شود. این وضعیت نه‌تنها سلامت جسمی، بلکه رشد شناختی و عملکرد ذهنی کودک را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۳). در بزرگسالان، مصرف مداوم مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین‌ها مانند نان سنتی تهیه‌شده از آرد آلوده، می‌تواند موجب بروز مشکلات مزمن کبدی، کاهش باروری، اختلالات گوارشی، و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن شود (۱۴). همچنین، در زنان باردار، مواجهه با این سموم ممکن است منجر به ناهنجاری‌های جنینی، سقط خودبه‌خودی یا تولد نوزادان با وزن پایین شود. از منظر بهداشت عمومی، آلودگی نان به آفلاتوکسین‌ها نه‌تنها تهدیدی برای سلامت فردی است، بلکه با افزایش هزینه‌های درمانی، کاهش بهره‌وری نیروی کار، و محدودیت‌های صادراتی، پیامدهای اقتصادی و اجتماعی گسترده‌ای نیز به‌همراه دارد (۱۵). کنترل دقیق این آلودگی‌ها در زنجیره تولید نان، به‌ویژه در مناطق گرم و مرطوب، یک ضرورت حیاتی برای حفظ سلامت جامعه محسوب می‌شود (۱۶). برای کاهش خطر تولید آفلاتوکسین در نان، رعایت اصول بهداشتی در تمام مراحل زنجیره تولید ضروری است. استفاده از آرد با کیفیت و نگهداری صحیح آن، کنترل رطوبت و دما در انبارها، نظارت بر شرایط پخت و بسته‌بندی، و آموزش نانوایان و تولیدکنندگان از جمله راهکارهای مؤثر در پیشگیری از آلودگی قارچی هستند (۱۷). همچنین، پایش مستمر نان‌های سنتی از نظر آلودگی میکروبی و سم‌شناسی، می‌تواند نقش مهمی در ارتقای سلامت عمومی ایفا کند. بر همین اساس، هدف اصلی این پژوهش بررسی نقش کپک‌ها در تولید آفلاتوکسین در زنجیره تولید نان و تحلیل اثرات احتمالی این سموم بر سلامت انسان است (۱۸). این مطالعه می‌کوشد با ارائه شواهد علمی، اهمیت کنترل آلودگی قارچی در فرآیند تولید نان را برجسته کرده و راهکارهایی برای کاهش خطرات ناشی از آفلاتوکسین‌ها پیشنهاد دهد. دستیابی به نانی سالم و ایمن، نه‌تنها یک ضرورت تغذیه‌ای، بلکه گامی مؤثر در ارتقای سلامت جامعه و کاهش بار بیماری‌های مزمن خواهد بود.

۲. روش تحقیق

این پژوهش با هدف بررسی نقش کپک‌ها در تولید آفلاتوکسین و تحلیل اثرات احتمالی آن بر سلامت انسان طراحی شده است. روش تحقیق به‌صورت توصیفی-تحلیلی و با بهره‌گیری از رویکرد آزمایشگاهی انجام گردید. مراحل اجرایی پژوهش به شرح زیر است:

۲-۱. نمونه‌برداری از نان‌های سنتی

نمونه‌برداری از نان‌های سنتی در مناطق مختلف شهری و روستایی نانوای‌های تبریز، انجام شد. نمونه‌ها شامل انواع نان در شرایط نگهداری متفاوت (تازه، مانده، مرطوب، خشک) بودند و اطلاعات مربوط به نوع نان، تاریخ تولید، محل عرضه و شرایط



نگهداری ثبت گردید. نمونه‌ها با رعایت اصول بهداشتی و در بسته‌بندی‌های استریل جمع‌آوری شده و در دمای کنترل شده به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲-۲. جداسازی و شناسایی کپک‌ها

جهت حذف آلودگی‌های سطحی و جلوگیری از رشد قارچ‌های محیطی غیراختصاصی، قطعات نان (در ابعاد تقریبی ۲×۲ سانتی‌متر) ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در محلول اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شده و سپس به مدت ۱ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها با آب مقطر استریل به‌طور کامل شست‌وشو داده شده و با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک شدند. نمونه‌های آماده‌شده به‌صورت سه‌تایی و در سه تکرار مستقل روی محیط کشت عمومی Potato Dextrose Agar (PDA) کشت داده شدند و در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۷ روز در انکوباتور نگهداری شدند. پس از پایان دوره انکوباسیون، کلنی‌های قارچی ظاهرشده از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی (شکل، رنگ، بافت و سرعت رشد) و میکروسکوپی (هیف، کونیدیوفور و کونیدیا) با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌هایی که از نظر مورفولوژیک مشکوک به تولید مایکوتوکسین بودند، برای بررسی‌های تکمیلی روی محیط کشت اختصاصی Czapek's Yeast Extract Agar (CYA) مجدداً کشت داده شدند تا ویژگی‌های فنوتیپی و پتانسیل توکسین‌زایی آن‌ها ارزیابی گردد.

۳-۲. سنجش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

برای تعیین غلظت آفلاتوکسین‌های تولید شده در نمونه‌های نان سنتی تبریز، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. این روش بر اساس پروتکل استاندارد (Sinha (2007) (۱۹) با اصلاحاتی متناسب با شرایط آزمایشگاه طراحی گردید تا ضمن حفظ دقت و صحت نتایج، هزینه‌های اجرایی کاهش یابد. مراحل آنالیز شامل استخراج، پاک‌سازی، مشتق‌سازی و تزریق به دستگاه HPLC بود.

۲-۳-۱. استخراج نمونه

ابتدا ۵ گرم از نمونه نان آسیاب‌شده در لوله‌های سانتریفیوژ پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری وزن‌کشی شد. به هر لوله، ۲۰ میلی‌لیتر محلول استونیتریل - آب با نسبت حجمی ۹۰:۱۰ افزوده گردید. مخلوط‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه ورتکس هم‌زده شدند و سپس در سرعت ۱۸۹۵ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه فوقانی هر نمونه از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شده و به لوله‌های تمیز و برچسب‌خورده منتقل گردید.



۲-۳-۲. حذف ترکیبات اضافی

برای حذف ترکیبات اضافی، ۶ میلی لیتر از محلول استخراج شده از هر نمونه از طریق ستون SPE به صورت ثقلی عبور داده شد. ستون پاک سازی شامل ۱/۵ گرم ترکیب ۵۰:۵۰ (وزنی/وزنی) آلومینا خنثی و C18 بود که بین دو دیسک فیلتری قرار گرفته بود. محلول خروجی در ویال های ۷ میلی لیتری جمع آوری شد و ۴ میلی لیتر از آن تحت جریان ملایم نیتروژن در دمای اتاق خشک گردید.

۲-۳-۳. مشتق سازی

رسوب خشک شده حاصل از مرحله قبل در ۴۰۰ میکرولیتر محلول مشتق ساز شامل آب، اسید تری فلئوئورواستیک و اسید استیک گلاسیال به نسبت حجمی ۵:۱۰:۳۵ (v/v/v) حل شد. محلول به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و سپس در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در بلاک حرارتی گرم شد. محلول های حاصل حداقل به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند تا واکنش مشتق سازی کامل گردد.

۲-۳-۴. شرایط دستگاه HPLC

آنالیز آفلاتوکسین ها با استفاده از دستگاه HPLC مدل Waters 2695 انجام شد که مجهز به پمپ چهارگانه، دگازر خلأ، انژکتور خودکار و آشکارساز فلورسانس چندطول موج (Waters 2475) بود. حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر تعیین شد و فاز متحرک شامل آب و استونیتریل با نرخ جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه به ستون تزریق گردید. زمان کل اجرای آنالیز ۳۳ دقیقه بود. داده ها با استفاده از نرم افزار اختصاصی دستگاه ثبت و تحلیل شدند.

۲-۴. سنجش الایزا (ELISA)

برای سنجش غلظت آفلاتوکسین B₁ در نمونه های نان سنتی تبریز، از روش الایزا رقابتی با استفاده از کیت تجاری Aflatoxin ELISA ساخت شرکت r-biopharm AG (دارمشتات، آلمان) بهره گرفته شد. این روش بر اساس واکنش رقابتی میان آفلاتوکسین موجود در نمونه و آفلاتوکسین کونژوگه شده با آنزیم، برای اتصال به آنتی بادی اختصاصی طراحی شده است و امکان اندازه گیری دقیق آفلاتوکسین در غلظت های پایین را فراهم می سازد. ابتدا مقدار ۵ گرم از نمونه نان آسیاب شده در پنج لوله سانتریفیوژ پلاستیکی ۵۰ میلی لیتری وزن کشی شد. لوله اول به عنوان کنترل منفی (0ppb) در نظر گرفته شد و چهار لوله دیگر با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ppb از آفلاتوکسین B₁ اسپایک شدند. به هر لوله ۲۵ میلی لیتر متانول ۷۰٪ افزوده شد و مخلوط ها به مدت ۵ دقیقه با استفاده از شیکر چندلوله ای به شدت هم زده شدند. محلول حاصل از استخراج از طریق



کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید. از محلول صاف‌شده، ۱ میلی‌لیتر برداشته و با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر دی‌یونیزه‌شده رقیق شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده به هر چاهک (well) در صفحه میکروپلیت منتقل گردید. در چاهک‌های جداگانه، ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد و ۵۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه‌شده با آفلاتوکسین افزوده شد. پس از آن، ۵۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی مونوکلونال ضد آفلاتوکسین B₁ با کلون AF6، به هر چاهک اضافه گردید. صفحه به آرامی به صورت دستی تکان داده شد تا محلول‌ها به خوبی مخلوط شوند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از انکوباسیون، مایع داخل چاهک‌ها تخلیه گردید و صفحه به صورت وارونه روی حوله صافی تمیز ضربه زده شد تا باقی‌مانده مایع حذف شود. سپس هر چاهک با ۲۵۰ میکرولیتر محلول شست‌وشو پر شده و مجدداً تخلیه گردید. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر چاهک افزوده شد و صفحه به آرامی تکان داده شد. انکوباسیون دوم به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول توقف واکنش به هر چاهک اضافه شد و صفحه مجدداً به آرامی تکان داده شد. در پایان، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان اندازه‌گیری شد.

۲-۵. بررسی سمیت و اثرات بیولوژیکی آفلاتوکسین B₁

۲-۵-۱. آماده‌سازی رده سلولی HepG2

در این مطالعه از رده سلولی انسانی (Human hepatocellular carcinoma cell line) HepG2 استفاده شد، که از مؤسسه سلول‌درمانی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری ایران تهیه گردید. سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, FBS) و ۱۰٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (100 IU/mL) و استرپتومایسین (100 µg/mL) کشت داده شدند. محیط کشت در شرایط استریل و تحت هود لامینار آماده‌سازی شد. سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی T-75 قرار داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ دی‌اکسید کربن و رطوبت نسبی بالا نگهداری شدند تا شرایط فیزیولوژیک مشابه بدن انسان فراهم گردد. رشد سلول‌ها به صورت روزانه با میکروسکوپ معکوس بررسی شد و زمانی که سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رشد و تراکم حدود ۷۰-۸۰٪ رسیدند، جهت پاساژ سلولی اقدام شد. برای پاساژ، ابتدا محیط کشت مصرف‌شده خارج گردید و سلول‌ها با PBS (Phosphate Buffered Saline) شست‌وشو داده شدند. سپس محلول تریپسین-EDTA (۰/۲۵٪) به فلاسک اضافه شده و سلول‌ها به مدت ۲-۳ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند تا اتصال آن‌ها به سطح ظرف کشت قطع شود. پس از جدا شدن سلول‌ها، با افزودن محیط کشت تازه، تریپسین خنثی شده و سوسپانسیون سلولی به فلاسک‌های جدید منتقل گردید. این فرآیند تا رسیدن به تعداد سلول مناسب برای تیمار با آفلاتوکسین B₁ ادامه یافت.

۲-۵-۲. تیمار سلول‌های HepG2 با آفلاتوکسین B₁

جهت بررسی اثرات سمی آفلاتوکسین B₁ بر سلول‌های کبدی انسانی، ابتدا آفلاتوکسین B₁ از نمونه‌های نان سنتی آلوده جمع‌آوری‌شده از نانوایی‌های سطح شهر تبریز استخراج و خالص‌سازی گردید. پس از تغلیظ عصاره متانولی و خالص‌سازی با



ستون‌های ایمنونوفینیتی، باقی‌مانده خشک حاصل از تبخیر در حجم مشخصی از دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) حل شد تا محلول مادر با غلظت تقریبی ۱۰ میلی‌مولار تهیه گردد. برای تیمار سلول‌ها، محلول مادر در محیط کشت DMEM رقیق‌سازی شد تا غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میکرومولار حاصل گردد. سلول‌های HepG2 که در مرحله لگاریتمی رشد قرار داشتند، در پلیت‌های ۶ خانه‌ای با تراکم اولیه 2×10^5 سلول در هر خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت اولیه و اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به سطح پلیت، محیط کشت خارج شده و سلول‌ها با محیط حاوی آفلاتوکسین B₁ در غلظت‌های مذکور تیمار شدند. مدت زمان تیمار در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تنظیم گردید تا امکان بررسی وابستگی پاسخ سلولی به زمان فراهم شود. تمامی تیمارها در شرایط استاندارد انکوباسیون شامل دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ دی‌اکسید کربن و رطوبت بالا انجام شد.

۲-۵-۳. روش رنگ سنجی سنجش MTT

در این راستا شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو انجام شد و حدود 1×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای کشت داده شد و به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، از آفلاتوکسین B₁ در رقت‌های تهیه شده (غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میکرومولار) به چاهک‌ها اضافه و برای هر رقت سه چاهک از آفلاتوکسین B₁ در نظر گرفته شد، بنابراین ۳ بار تکرار تست برای هر رقت در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. یک ردیف به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که آفلاتوکسین B₁ به آن اضافه نشد. این گروه فقط شامل سلول‌ها و محیط و FBS می باشد. سپس سلول‌ها و محیط کشت از چاهک‌ها خارج شدند. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ ۱٪ MTT در تاریکی به پلیت‌ها اضافه شد. پلیت‌ها در فویل آلومینیوم پیچیده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. محیط رویی حاوی MTT از چاهک‌ها حذف شد و به کریستال فورمازان باقی مانده از MTT هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ماده DMSO اضافه و بعد از پوشاندن چاهک‌ها، (جلوگیری از رسیدن نور) به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. در نهایت جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزایدر خوانده شد. سپس IC₅₀ تعیین شد.

$$\text{Cytotoxicity} = (1 - (\text{OD of the test sample}) / (\text{OD of the control})) \times 100\%$$

۲-۵-۴. آزمون فلوسایتومتری به منظور سنجش میزان آپوپتوز

به منظور تأیید آپوپتوز در سلول‌ها تحت تاثیر آفلاتوکسین B₁ از آزمون فلوسایتومتری آنکسین PI/V استفاده شد. در واقع از Annexin V برای شناسایی میزان سلول‌های آپوپتوز شده و از پروپیدیوم یدید (PI) برای شناسایی میزان سلول‌های نکروز شده استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO₂ منظور دسترسی به جمعیت مورد نظر کشت شدند. طبق دستورالعمل کیت برای هر آزمون به 5×10^5 سلول نیاز است. سلول‌ها در پلیت با غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین B₁ (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میکرومولار) تیمار شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها به فالكون منتقل شده و سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آن دور ریخته شد.



رسوب سلولی پس از یک بار شستشو با PBS با ۵۰۰ میکرولیتر بافر باند کننده مواجه شد. در ادامه ۲/۵ میکرولیتر FITC به نمونه‌ها اضافه و پس از ۲۰ دقیقه در یخچال قرارداده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه ۳۵۰۰ دور دقیقه سانتریفیوژ انجام شد، محلول رویی دور ریخته شد. مجدد ۱۰۰ میکرو لیتر بافر باند کننده و یک میکرولیتر رنگ PI اضافه گردید، سپس نمونه‌ها به ویال‌های مربوط به فلوسایتومتری منتقل شدند و میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت و نتایج توسط نرم‌افزار 7.6 FlowJo آنالیز شد.

۲-۶. تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزارهای تخصصی مانند SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مقایسه میانگین گروه‌ها انجام شد. نتایج به همراه نمودارهای مقایسه ای ثبت شد. برای فلوسایتومتری با استفاده از flowjo و نمودارهای هیستوگرام درصد آپوپتوز هر نمونه مشخص شد.

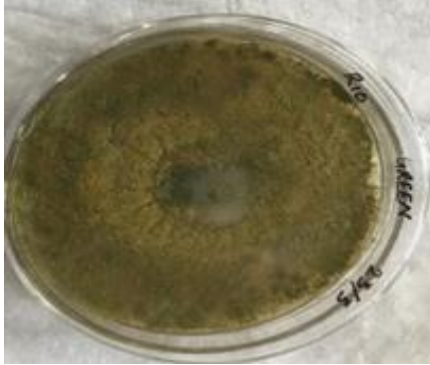
۳. یافته‌های پژوهش

۳-۱. جداسازی و شناسایی کپک‌ها

در این مطالعه، پنج ایزوله قارچی از نمونه‌های نان سنتی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تبریز جداسازی و با کدهای-TAF-1 تا TAF-5 نام‌گذاری شدند، در شکل (۱) نشان داده است. بررسی‌های میکروسکوپی کلنی‌ها بر روی محیط کشت PDA نشان داد که ایزوله‌ها دارای تفاوت‌های قابل‌توجهی در رنگ، بافت و ویژگی‌های پشت کلنی بودند. تفاوت‌های فنوتیپی اولیه می‌تواند بیانگر تنوع گونه‌ای یا تفاوت‌های فیزیولوژیکی میان ایزوله‌ها باشد که در مراحل بعدی با آزمون‌های مولکولی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

ایزوله	بررسی‌های میکروسکوپی کلنی‌ها
TAF-1	کلنی زرد مایل به سبز، پشت کلنی نارنجی





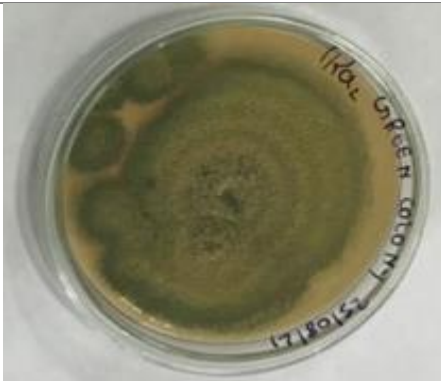
کلنی سبز زیتونی، پشت کلنی قهوه‌ای مایل
به قرمز

TAF-2



کلنی سبز، پشت کلنی نارنجی

TAF-3



کلنی زرد مایل به سبز، پشت کلنی زرد
کم‌رنگ

TAF-4



کلنی سبز زیتونی، پشت کلنی قهوه‌ای مایل
به قرمز، با حاشیه سفید و زبر

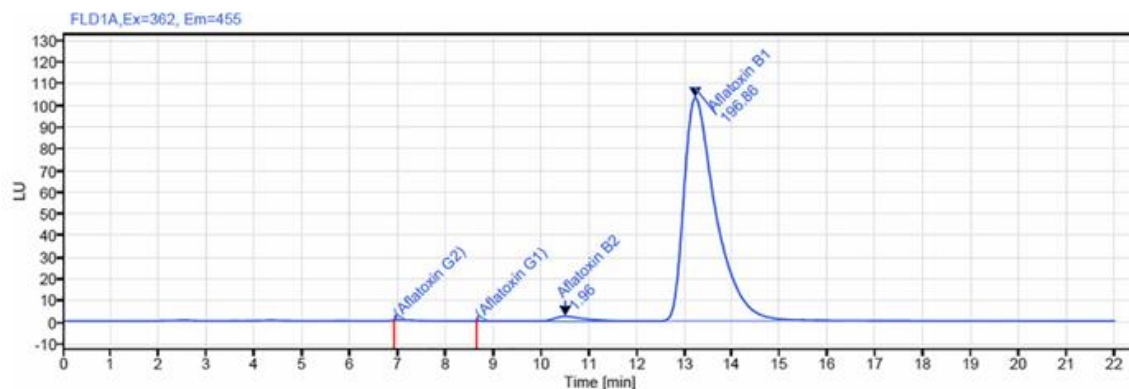
TAF-5

شکل ۱. بررسی‌های میکروسکوپی کلنی‌ها بر روی محیط کشت PDA



۳-۲. سنجش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

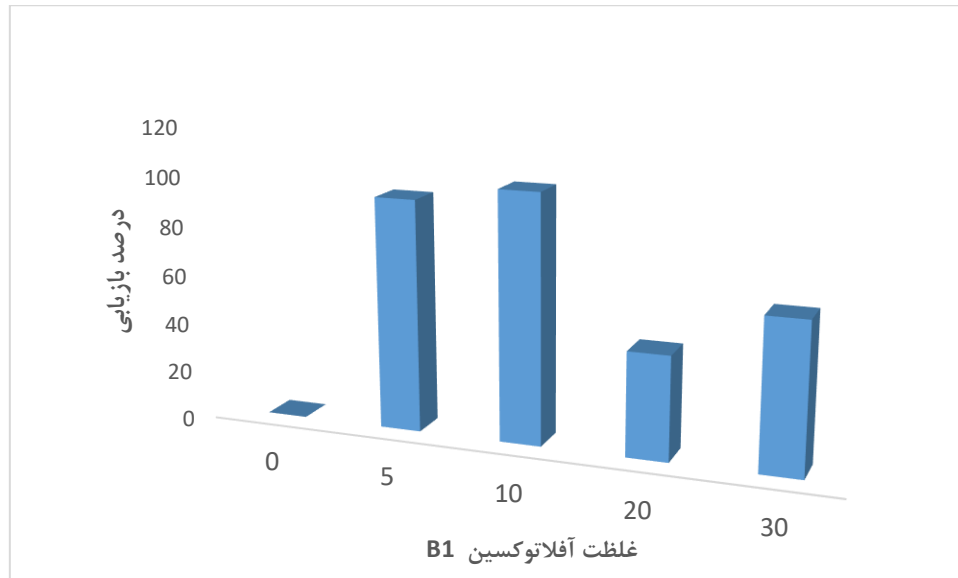
با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با آشکارساز فلورسانس (FLD1A, $\lambda_{em}=455\text{ nm}$ $\lambda_{ex}=362\text{ nm}$)، الگوی جداسازی و شناسایی آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های مورد بررسی تعیین شد (شکل ۲). در کروماتوگرام حاصل، چهار پیک مشخص در زمان‌های بازداری به طور تقریبی ۷، ۸/۵، ۱۰/۵ و ۱۳/۵ دقیقه مشاهده گردید که به ترتیب مربوط به آفلاتوکسین‌های G1، G2، B2 و B1 بودند. پیک مربوط به آفلاتوکسین B1 با بیشترین شدت فلورسانس و سطح زیر منحنی قابل توجه، بیانگر غلظت بالای این ترکیب در نمونه بود. حضور این آفلاتوکسین‌ها، به‌ویژه B1، نشان‌دهنده پتانسیل تولید آفلاتوکسین توسط ایزوله‌های جدا شده بوده و ضرورت پایش مستمر ایمنی میکروبی نان‌های سنتی را برجسته می‌سازد.



شکل ۲. پروفایل کروماتوگرافی آفلاتوکسین‌ها بر اساس شدت فلورسانس در طول زمان بازداری

۳-۳. سنجش الایزا

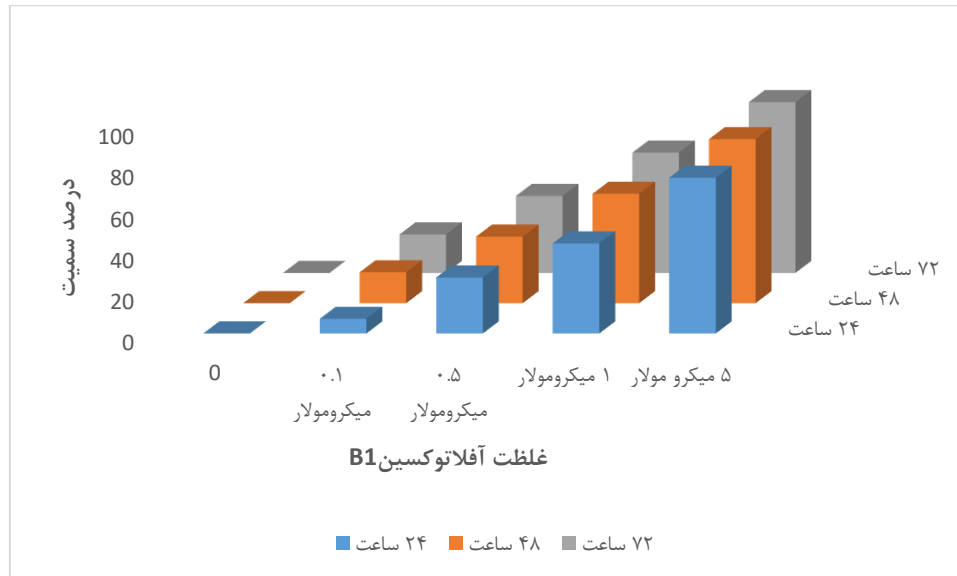
در آزمون الایزا، درصد بازیابی آفلاتوکسین B1 در غلظت‌های مختلف نشان‌دهنده عملکرد این روش در شرایط متفاوت بود. در غلظت‌های پایین (۵ و ۱۰ ppb)، درصد بازیابی بسیار بالا و نزدیک به ۱۰۰٪ بود که بیانگر دقت و کارایی مناسب روش در این محدوده است. اما با افزایش غلظت به ۲۰ و ۳۰ ppb، درصد بازیابی به ترتیب به حدود ۵۰٪ و ۷۰٪ کاهش یافت، که می‌تواند ناشی از اشباع آنتی‌بادی‌ها یا محدودیت‌های حساسیت روش در غلظت‌های بالا باشد. در غلظت صفر نیز بازیابی صفر بود که صحت پایه‌ای آزمون را تأیید می‌کند. این نتایج نشان می‌دهند که روش الایزا در غلظت‌های پایین عملکرد مطلوبی دارد اما در غلظت‌های بالاتر نیاز به بهینه‌سازی دارد (نمودار ۱).



نمودار ۱. میانگین درصد بازیابی آفلاتوکسین B₁ با استفاده از الیزا

۳-۴. روش رنگ سنجی سنجش MTT

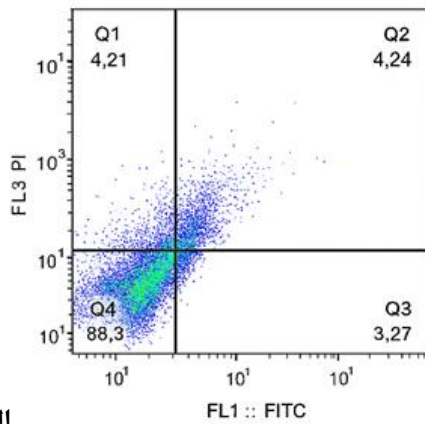
با افزایش غلظت آفلاتوکسین، درصد سمیت در هر سه زمان به طور قابل توجهی کاهش یافته است که بیانگر افزایش سمیت سلولی می باشد. این کاهش در زمان های طولانی تر (۴۸ و ۷۲ ساعت) شدیدتر بوده و در غلظت های بالاتر (۱ و ۵ میکرومولار) به بیشترین مقدار خود رسیده است. به ویژه در غلظت ۵ میکرومولار، افت چشمگیر مشاهده شده که نشان دهنده اثر سمی قوی آفلاتوکسین B₁ در این سطح است. این نتایج نشان می دهند که سمیت وابسته به دوز و زمان بوده و غلظت های بالاتر در زمان های طولانی تر اثرات مخرب تری بر سلول ها دارند (نمودار ۲).



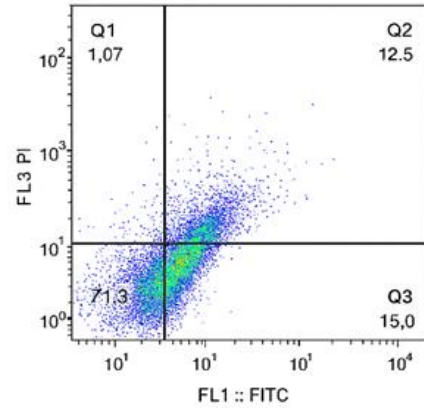
نمودار ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین B₁ (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میکرومولار) بر پاسخ سلولی HepG2 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

۳-۵. آزمون فلوسایتومتری به منظور سنجش میزان آپوپتوز

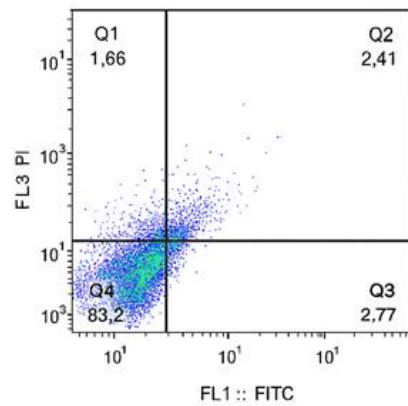
نتایج آزمون فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC و PI نشان داد که تیمار سلول‌ها با آفلاتوکسین B₁ منجر به تغییرات قابل توجهی در میزان آپوپتوز و نکروز شد. در گروه کنترل (الف)، بیشترین درصد سلول‌ها در ناحیه Q4 قرار داشتند (۸۸/۳٪) که نشان‌دهنده سلامت و زنده بودن سلول‌هاست. با افزایش غلظت آفلاتوکسین، تغییراتی در توزیع سلول‌ها مشاهده شد. در غلظت ۰/۱ میکرومولار (ب)، کاهش جزئی در سلول‌های زنده (۸۳٪) و افزایش در آپوپتوز اولیه و نهایی مشاهده شد که نشان‌دهنده شروع پاسخ سلولی به سم است. جالب اینکه در غلظت ۰/۵ میکرومولار (پ)، درصد سلول‌های زنده حتی بیشتر از کنترل بود (۹۳/۸٪) که ممکن است ناشی از پاسخ تطبیقی یا اثرات غیرخطی سم باشد. در غلظت ۱ میکرومولار (ج)، کاهش قابل توجهی در سلول‌های زنده (۷۴/۷٪) و افزایش در آپوپتوز نهایی و نکروز دیده شد که بیانگر سمیت مؤثر آفلاتوکسین در این دوز است. در نهایت، در غلظت ۵ میکرومولار (ی)، افزایش قابل توجهی در درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک مشاهده شد که بیانگر فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی و سمیت مؤثر آفلاتوکسین B₁ در غلظت ۵ میکرومولار است.



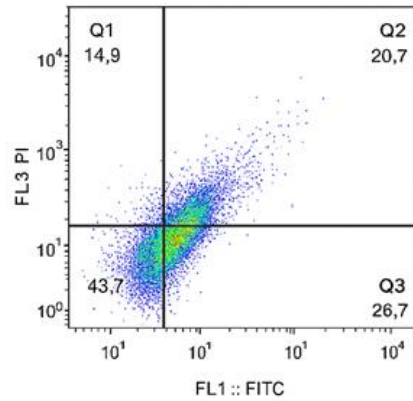
الف



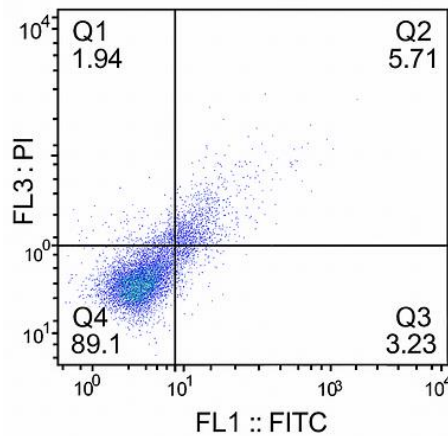
ب



ج



د



ه

شکل ۳. بررسی مارکرهای آپوپتوزی و نکروزی برای تعیین رفتار سلول‌های HepG2 در معرض (الف) محیط کشت (گروه کنترل)، (ب) غلظت ۰/۱ میکرومولار، (پ) غلظت ۰/۵ میکرومولار، (ج) غلظت ۱ میکرومولار و (ی) غلظت ۵ میکرومولار آفلاتوکسین B₁ از طریق سنجش فلوسایتومتری.



۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به نقش حیاتی نان در تأمین انرژی و تغذیه روزانه انسان، بررسی ایمنی میکروبی و شیمیایی این ماده غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر، نگرانی‌ها پیرامون آلودگی نان‌های سنتی به مایکوتوکسین‌ها، به‌ویژه آفلاتوکسین B₁، افزایش یافته است؛ چرا که این ترکیب سمی توسط گونه‌های خاصی از کپک‌ها مانند *Aspergillus flavus* تولید شده و می‌تواند در شرایط نامناسب نگهداری آرد یا نان، وارد زنجیره غذایی شود. از آن‌جا که آفلاتوکسین‌ها اثرات سرطان‌زا، ایمنوتوکسیک و جهش‌زای قابل توجهی دارند، شناسایی منابع تولید، سنجش میزان آلودگی و بررسی اثرات بیولوژیکی آن‌ها بر سلول‌های انسانی، گامی ضروری در راستای ارتقای سلامت عمومی محسوب می‌شود. در این بخش، یافته‌های حاصل از بررسی ایزوله‌های قارچی، تحلیل کروماتوگرافی، آزمون الایزا، سنجش سمیت سلولی و فلوسایتومتری مورد بحث قرار می‌گیرد تا تصویری جامع از خطرات بالقوه آفلاتوکسین در نان‌های سنتی تبریز ارائه شود. این پژوهش، ابتدا پنج ایزوله قارچی از نان‌های سنتی تبریز جداسازی و شناسایی شدند. بررسی‌های ماکروسکوپی کلنی‌ها بر روی محیط کشت PDA نشان داد که ایزوله‌ها دارای تفاوت‌های قابل توجهی در رنگ، بافت و ویژگی‌های پشت کلنی بودند. این تفاوت‌های فنوتیپی بیانگر تنوع گونه‌ای یا تفاوت‌های فیزیولوژیکی میان ایزوله‌هاست. به‌ویژه ایزوله‌های TAF-2 و TAF-5 با رنگ سبز زیتونی و پشت کلنی قهوه‌ای مایل به قرمز، شباهت زیادی به گونه‌های *Aspergillus flavus* داشتند که در مطالعات پیشین به‌عنوان تولیدکننده اصلی آفلاتوکسین شناخته شده‌اند (۲۰).

با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، الگوی جداسازی آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های نان بررسی شد. کروماتوگرام‌های حاصل نشان دادند که پیک مربوط به آفلاتوکسین B₁ دارای بیشترین شدت فلورسانس و سطح زیر منحنی بود که بیانگر غلظت بالای این ترکیب در نمونه‌هاست. حضور هم‌زمان آفلاتوکسین‌های G₁، G₂، B₂ و B₁ نشان‌دهنده پتانسیل بالای ایزوله‌های قارچی برای تولید مایکوتوکسین‌هاست. این یافته‌ها با نتایج مطالعه رزاقی و همکاران (۱) هم‌راستا هستند که تولید هم‌زمان چند نوع آفلاتوکسین توسط ایزوله‌های ایرانی را گزارش کرده‌اند (۲۱). در آزمون الایزا، درصد بازیابی آفلاتوکسین B₁ در غلظت‌های پایین (۵ و ۱۰ ppb) بسیار بالا و نزدیک به ۱۰۰٪ بود که نشان‌دهنده دقت و حساسیت بالای این روش در محدوده‌های پایین غلظتی است. با افزایش غلظت به ۲۰ و ۳۰ ppb، درصد بازیابی به ترتیب به حدود ۴۲٪ و ۶۱٪ کاهش یافت. این افت می‌تواند ناشی از اشباع آنتی‌بادی‌ها یا محدودیت‌های واکنش رقابتی در غلظت‌های بالا باشد. مطالعات پیشین نیز کارایی روش الایزا را در سنجش آفلاتوکسین‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند. Boyacoglu و Nilufer (۲۰۲۲) گزارش کردند که در روش الایزا، درصد بازیابی دارای نوسانات قابل توجهی بین تکرارها بوده و این موضوع نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش به شرایط آزمایشگاهی و نوع نمونه است (۲۲). همچنین، Rossi و همکاران (۲۰۱۰) وجود همبستگی مثبت بین نتایج حاصل از الایزا و HPLC را در نمونه‌های خوراک دام تأیید کردند، که بیانگر قابلیت بالقوه الایزا برای غربالگری اولیه آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های غذایی است (۲۳). در همین راستا، Dimitrieska-Stojkovic و همکاران (۲۰۱۱) نیز از روش الایزا به‌عنوان ابزار غربالگری و از HPLC به‌عنوان روش تأییدی استفاده کردند، که این رویکرد در مطالعات چندمرحله‌ای بسیار کاربردی و مقرون‌به‌صرفه گزارش شده است (۲۴).



آزمون رنگ‌سنجی MTT برای بررسی سمیت آفلاتوکسین B₁ بر سلول‌های HepG2 انجام شد. نتایج نشان داد که سمیت سلولی به‌صورت وابسته به دوز و زمان افزایش می‌یابد. در غلظت ۵ میکرومولار و زمان ۷۲ ساعت، درصد سمیت به بیش از ۸۲٪ رسید که بیانگر اثرات مخرب شدید این سم بر فعالیت متابولیک سلول‌هاست. همچنین، تعیین IC₅₀ در این مطالعه نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱ میکرومولار به‌طور قابل توجهی فعالیت سلولی را مختل می‌کنند. فدوی اردستانی و همکاران (۱۴۰۲) در اثرات سایتوتوکسیک آفلاتوکسین B₁ بر روی رده سلولی کبدی HEPG2 بررسی شد. نتایج نشان داد که مواجهه با آفلاتوکسین باعث افزایش بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹، افزایش آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شد (۲۵). وطن‌دوست و همکاران (۱۳۹۸) آسیب‌های بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین B₁ بررسی کردند. نتایج نشان دادند که آفلاتوکسین باعث نکروز، فیبروز و نفوذ سلول‌های التهابی در بافت کبد شد (۲۶). Zhang و همکاران (۲۰۱۶) هم‌راستا هستند که کاهش زنده‌مانی سلول‌های کبدی در مواجهه با آفلاتوکسین B₁ را گزارش کرده‌اند (۲۷).

همچنین آزمون فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC و PI نشان داد که آفلاتوکسین B₁ موجب افزایش آپوپتوز و نکروز در سلول‌های تیمار شده می‌شود. در غلظت ۱ میکرومولار، درصد سلول‌های زنده به ۷۴٪ کاهش یافت و در غلظت ۵ میکرومولار، افزایش قابل توجهی در سلول‌های آپپتوتیک و نکروتیک مشاهده شد. این نتایج تأیید می‌کنند که آفلاتوکسین B₁ از طریق فعال‌سازی مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، موجب تخریب ساختار سلولی می‌شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که آفلاتوکسین B₁ با القای استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری، نقش مهمی در القای آپوپتوز سلول‌های کبدی ایفا می‌کند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای توسط Wang و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که مواجهه جوجه‌های گوشتی با آفلاتوکسین B₁ منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش سطح گلوتاتیون میتوکندری، و افت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شد. این تغییرات موجب اختلال در تعادل ردوکس سلولی و فعال‌سازی مسیرهای آپپتوتیک در سلول‌های کبدی گردید (۲۸). همچنین، مطالعه دهقانی و همکاران (۱۴۰۰) نشان داد که استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی القا کند، و پیش‌تیمار با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند جینجرول توانست این اثرات را به‌طور معناداری کاهش دهد (۲۹). Liu و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند آفلاتوکسین‌ها از طریق آسیب به میتوکندری و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، مسیرهای آپوپتوز وابسته به کاسپاز را فعال می‌کنند و موجب مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در بافت کبد می‌شوند (۳۰).

بنابراین، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که نان‌های سنتی تبریز می‌توانند حامل ایزوله‌های قارچی تولیدکننده آفلاتوکسین باشند و این سم در غلظت‌های بالا اثرات سمی شدیدی بر سلول‌های کبدی انسانی دارد. ترکیب نتایج آزمون‌های انجام شده در این پژوهش تصویری جامع از خطرات بالقوه آفلاتوکسین B₁ ارائه می‌دهد. این نتایج اهمیت پایش مستمر نان‌های سنتی و کنترل کیفیت آرد مصرفی را برجسته می‌سازد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، شناسایی مولکولی ایزوله‌ها و بررسی بیان ژن‌های مرتبط با تولید آفلاتوکسین انجام گیرد تا درک دقیق‌تری از مکانیسم‌های زیستی این سم حاصل شود.



فهرست منابع

1. Mirzaei, M., & Amiri, M. (2018). Nutritional and technological aspects of traditional bread. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 15(2), 123–134.
2. Mohammadi, A., & Ghasemi, S. (2020). Enrichment of traditional bread with micronutrients: A review. *Journal of Nutrition and Food Security*, 5(1), 45–52.
3. Haghighi, E., Mehraban Sangatash, M., Mortazavi, S. A., Sarabi, M., Noorbakhsh, R., & Armin, M. (2020). Study of aflatoxin-producing fungi contamination of raisins varieties produced in Khorasan Razavi Province. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 9(1).
4. Choudhary AK (2020) Present status, prevalence and seasonal variations of aflatoxin in cattle feed, Bihar, India. *Ind J Sci Technol* 13(17):1738–1745.
5. Arifah F, Aini LQ, Muhibuddin A (2023) Molecular and morphological characterization of fungi isolated from nutmeg (*Myristica fragrans*) in North Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas J Biol Diversity*. 24(1):d240151.
6. Shakeri Jokary, S., Mirlohi, M., & Mosharraf, L. (2015). Aflatoxin contamination in flour and bread: Risk assessment in Iran. *Journal of Isfahan Medical School*, 33(368), 1–10.
7. Sofiian, I., & Nozari, H. (2020). Effect of wheat processing and baking on aflatoxin B₁ levels. *Iranian Journal of Food Microbiology*, 7(4), 55–64.
8. Chen X, Abdallah MF, Landschoot S, Audenaert K, De Saeger S, Chen X, Rajko vic A (2023) *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* and Their Main Mycotoxins: Global Distribution and Scenarios of Interactions in Maize. *Toxins* 15(9):577.
9. Azadbakht, N., Khosravi Nejad, K., & Tarrahi, M.J. (2008). Aflatoxin contamination in bread waste in Lorestan province. *Yafteh*, 10(3), 45–52.
10. Behvarz Quarterly (2020). Introduction to aflatoxins and their harmful effects. *Behvarz*, 31(105), 71–71.
11. I.A.R.C. (2016). New I.A.R.C. report urges action against widespread mycotoxin contamination in developing countries. Lyon: IARC, Press release N: 242.
12. Turner, P.C., et al. (2003). Aflatoxin exposure and impaired child growth in West Africa. *Environmental Health Perspectives*, 111(2), 187–193.
13. Gong, Y.Y., et al. (2004). Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children. *British Journal of Nutrition*, 90(3), 403–410.
14. Mary, V.S., Theumer, M.G., Arias, S.L., Rubinstein, H.R., & López, A.G. (2012). Aflatoxin B₁ induces apoptosis in rat liver through activation of caspase-3 and DNA fragmentation. *Toxicology Letters*, 215(2), 151–156.
15. Pourmohseni, M. (2020). Aflatoxins and their toxicological effects. *Behvarz*, 31(105), 71–71.



16. Adejumo TO, Adejoro DO (2014) Incidence of aflatoxins, fumonisins, tri chothecenes and ochratoxins in Nigerian foods and possible intervention strategies. *Food Science and Quality Management* 31:127–146
17. FAO/WHO. (2004). *Codex Alimentarius: Code of Practice for the Prevention and Reduction of Mycotoxin Contamination in Cereals*. Rome: FAO.
18. Kansal M, Kishore K, Kumar P (2017) Impacts of flood and its management – a case study of bihar. *Int J Adv Res* 5(3):1695–1706.
19. Sinha KK. (1999). Testing methods for aflatoxins in foods. *Food Nutr Bull*. 20(4):458–64.
20. Razzaghi-Abyaneh, M., Gholami-Shabani, M., & Shams-Ghahfarokhi, M. (2017). *Aflatoxins and aflatoxigenic fungi in Iran: A systematic review of the past, present, and future*. *Iranian Journal of Mycology*, 4(2), 65–84.
21. Klich, M.A. (2002). *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, The Netherlands
22. Nilufer D, Boyacoglu D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini. *J Agric Food Chem*. 2002;50:3375–9.
23. Rossi, P., et al. (2010). *Correlation between ELISA and HPLC in aflatoxin detection in feed*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1449–1454.
24. Dimitrieska-Stojkovic, E., et al. (2011). *Aflatoxins in animal feed: ELISA screening and HPLC confirmation*. *Food Control*, 22(6), 1021–1025.
25. Fadavi Ardastani, M., Ahmadi, S., Rezaei, N., & Mousavi, F. (2023). *Cytotoxic effects of aflatoxin B₁ and the protective role of nano-formulated pomegranate seed oil on HepG2 cell line*. *Iranian Journal of Medical Biotechnology*, 21(3), 45–56.
26. Vatandoust, M., Karimi, A., Sohrabi, R., & Naderi, M. (2019). *Evaluation of liver tissue damage in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to aflatoxin B₁ and the protective effect of thyme and rosemary combination*. *Animal and Aquatic Sciences Research*, 30(2), 67–78.
27. Zhang, Y., Wang, Y., & Zhao, L. (2016). *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by aflatoxin B₁ in human liver cells*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 45–52.
28. Wang, X., Liu, J., & Chen, S. (2021). *Protective effects of curcumin against aflatoxin B₁-induced oxidative stress and apoptosis in broiler liver*. *Poultry Science*, 100(2), 456–464.
29. Dehghani, R., Rouhi, L., Zia Jahromi, N., Dehghani, S., & Khashei, K. (2021). *Reduction of oxidative stress-induced cytotoxicity and apoptosis in human adipose tissue-derived and rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells by gingerol*. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences*, 9(2), 1–11.
30. Liu, Y., Wu, F., & Wang, J. (2018). *Aflatoxin B₁ induces apoptosis and oxidative stress in HepG2 cells via mitochondrial pathway*. *Toxicology Letters*, 287, 44–52.