



Investigation of the Effects of Ganoderic Acid and Copper Nanoparticles on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*

Mohaddeseh Larypoor ¹, Elahe Sabouri ², Tina Zarinpanah ³, Hamidreza Shir Mohammadi ²
Fereshteh Rahmati ⁴

¹ Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

² Master's Student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

³ PhD Student, Department of Microbiology, Kish.C., Islamic Azad University, Kish, Iran.

⁴ Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Aflatoxin B1 is one of the most critical mycotoxins that enters the human body through the consumption of food and has carcinogenic effects in humans. Edible and medicinal macrofungi contain active compounds with antimicrobial and anticancer properties. The objective of this study was to investigate the inhibitory and antitoxigenic effects of ganoderic acid derived from *Ganoderma lucidum* and a copper nanoparticle (CuNP), both individually and synergistically, on the growth of *Aspergillus flavus* and the production of Aflatoxin B1.

Materials & methods: In this experimental research, ganoderic acid and the copper nanoparticle were extracted and prepared using standard methods. Antifungal activity was evaluated using the disk diffusion assay, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC), and Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀) tests. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to measure the level of Aflatoxin B1.

Results: Both compounds effectively inhibited fungal growth. The copper nanoparticle completely inhibited growth at a concentration of 125 µg/ml (MIC), while ganoderic acid achieved this effect at a concentration of 250 µg/ml. However, HPLC results indicated that ganoderic acid significantly reduced Aflatoxin B1 more than the other treatments.

Conclusion: Ganoderic acid can be proposed as a safe, effective, and biological compound for inhibiting *Aspergillus flavus* and reducing Aflatoxin B1 levels in foodstuffs and animal feed. The findings suggest that the addition of the copper nanoparticle to this compound did not significantly improve the antitoxigenic performance, and future research should focus on a more precise investigation of the molecular mechanisms of these interactions.

Keywords: Aflatoxin B1, *Aspergillus flavus*, ganoderic acid, copper nanoparticles, antifungal activity.

Received: 24 February 2025

Revised: 13 April 2025

Accepted: 19 May 2025

Correspondence to: Mohaddeseh Larypoor

Tel: +98 9122885346

E-mail: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2025, 18 (1): 56 - 68



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



بررسی تاثیرات گانودریک اسید و نانوذره مس بر تولید آفلاتوکسین B1 توسط آسپرژیلوس فلاووس

محدثه لاری پور^{۱*}، الهه صبوری^۲، تینا زرین پناه^۳، حمیدرضا شیرمحمدی^۲، فرشته رحمتی^۴

^۱ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
^۳ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بین‌المللی کیش، کیش، ایران.
^۴ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آفلاتوکسین B1 از مهمترین سموم قارچی که از طریق مصرف مواد غذایی به بدن انسان وارد شده و اثرات سرطان‌زایی در انسان دارد. قارچ‌های خوراکی دارویی کلاه‌دار حاوی مواد موثره با اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی می‌باشند. هدف این مطالعه بررسی اثرات بازدارندگی و ضد توکسین‌زایی گانودریک اسید مشتق از گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) و نانوذره مس به صورت مستقل و هم‌افزا بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) و تولید آفلاتوکسین B1 بود. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، گانودریک اسید و نانوذره مس بر اساس روش‌های استاندارد استخراج و آماده‌سازی شدند. فعالیت ضد قارچی با استفاده از آزمون‌های دیسک دیفیوژن، MIC، MFC و IC50 ارزیابی شد. برای سنجش سطح آفلاتوکسین B1 از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده گردید.

یافته‌ها: هر دو ترکیب به طور مؤثری رشد قارچ را مهار کردند. نانوذره مس در غلظت ۱۲۵ µg/ml به طور کامل موجب مهار رشد شد (MIC)، در حالی که گانودریک اسید در غلظت ۲۵۰ µg/ml به این اثر دست یافت. با این حال، نتایج HPLC نشان داد که گانودریک اسید به طور معنی‌داری آفلاتوکسین B1 را بیش از سایر تیمارها کاهش داد.

نتیجه‌گیری: گانودریک اسید می‌تواند به عنوان یک ترکیب زیستی، ایمن و مؤثر برای مهار *آسپرژیلوس فلاووس* و کاهش سطح آفلاتوکسین B1 در مواد غذایی و خوراک دام مطرح باشد. یافته‌ها نشان می‌دهد که افزودن نانوذره مس به این ترکیب، موجب بهبود معنادار عملکرد ضدتوکسین‌زایی نشده و تحقیقات آینده باید به بررسی دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی این تعاملات بپردازد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B1، *آسپرژیلوس فلاووس*، گانودریک اسید، نانوذره مس، فعالیت ضدقارچی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۲/۲۹

ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۱/۲۴

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۶

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها تجربه می‌کنند که منجر به نگرانی‌های جدی درباره کیفیت غذایی شده است (۱ و ۲). مایکوتوکسین‌ها سموم قارچی هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه توانایی آلودگی بسیاری از محصولات غذایی و خوراکی را دارا می‌باشد. آفلاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها است

امروزه مردم در کشورهای در حال توسعه به ویژه در مناطق روستایی، چالش‌های بیشتری در ارتباط با آلودگی

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

تلفن: ۰۹۱۲۲۸۸۵۳۴۶

پست الکترونیک: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir



دارد. علاوه بر بیماری زایی عامل اصلی تولید آفلاتوکسین B1 نیز می باشد (۱۴ و ۱۵). آفلاتوکسین B1 علاوه بر مشکلات سوء تغذیه، باعث تأخیر در بلوغ جسمی و ذهنی، تغییرات در تولید مثل و بیماری های سیستم عصبی در انسان و حیوانات می شود (۱۶ و ۱۷). آلودگی آفلاتوکسین ها در مواد غذایی مختلف را می توان با استفاده از تکنیک های فیزیکی مختلف شامل مرتب سازی، غیرفعال سازی حرارتی، پرتودرمانی، استفاده از ماکرو ویو، استفاده از بخار تحت فشار، برشته کردن خشک، شناور سازی، جداسازی چگالی، مدیریت نمود (۱۸ و ۱۹). از طرف دیگر، برخی دیگر از روش ها به منظور جلوگیری، غیرفعال کردن، حذف یا کاهش میزان آفلاتوکسین در مرحله قبل و پس از تولید محصول نیز مورد استفاده قرار می گیرند که می توان به غیرفعال سازی حرارتی، اشعه فرابنفش یا استخراج با حلال ها اشاره نمود (۲۰).

با این حال، این روش ها نمی توانند توکسین موجود در محصول را به طور کامل حذف کرد، زیرا که این روش ها گران قیمت هستند و منجر به از دست رفتن کیفیت و ویژگی های غذایی و حساس محصول می شوند. بنابراین، امروزه روش های آلودگی زدایی زیستی به دلیل ویژگی های خود (علاوه بر حفظ کیفیت محصول غذا) مانند کارایی بالا، مقرون به صرفه بودن، سازگاری با محیط زیست و امکان پذیر بودن، جایگزین مناسبی برای روش های فیزیکی یا شیمیایی شده است (۲۱). گانودرما *لوسیدوم* که یکی از رایج ترین قارچ های دارویی است که برای افزایش سلامتی و طول عمر که در سراسر جهان از جمله چین، ژاپن و هند مورد استفاده قرار می گیرد. از زیستگاه های رایج این قارچ می توان به جنگل های برگریز، جنگل های مخروطی و جنگل های بلوط و افرا اشاره نمود (۲۲ و ۲۳). پلی ساکاریدها و تری پینوئیدها از جمله گانودریک اسیدها اجزای اصلی فعال بیولوژیکی هستند که گانودرما *لوسیدوم* را به عامل خاص تبدیل می کند (۳۴). تعدادی از گانودریک اسیدها در شرایط آزمایشگاهی و غیر آن، فعالیت های ضد سرطان و ضد متاستاز نشان داده اند و آن ها به عنوان کاندیدای امیدوارکننده برای

از نظر ساختاری سمی، جهش زا و سرطانزا می باشد (۳ و ۴).

آفلاتوکسین ها در انواع محصولات کشاورزی و غذایی مانند غلات (گندم، ذرت، جو و برنج) دانه های روغنی (بادام زمینی، پسته، گردو) میوه های خشک (انجیر، خرما و کشمش)، ادویه جات (فلفل سیاه، فلفل قرمز و زیره) و محصولات لبنی تولید می شود (۵). از آنجا که انسان و حیوانات، از شیر به عنوان منبع اصلی تغذیه متکی هستند، آلودگی آفلاتوکسین در شیر و فراورده های آن نگران کننده است. هنگامی که گاوهای شیری، بزها و گوسفندان خوراک آلوده مصرف می کنند، شیر با آفلاتوکسین آلوده می شود و سلامت انسان را به خطر می اندازد (۶). کبد به عنوان ارگان هدف اصلی برای متابولیسم آفلاتوکسین متابولیت های بسیار سمی تولید می کند که باعث سمیت کبدی می شود. قرار گرفتن در معرض دوزهای پایین تر آفلاتوکسین برای مدت طولانی تر باعث ایجاد کارسینوم سلولی کبدی و سیروز کبدی می شود. قرار گرفتن در معرض دوز متوسط تا زیاد برای مدت زمان نسبتاً کوتاه تری می تواند منجر به آفلاتوکسیکوزیس حاد شود. مسمومیت حاد منجر، زردی پوست و صلبیه، خونریزی، درد شکم، بی حالی، آسیب حاد کبدی، تشنج کما و مرگ شود (۷-۹). آفلاتوکسین انواع مختلفی دارد که از مهم ترین آن ها می توان به گروه های B1 و B2 و G1 و G2 اشاره نمود. آفلاتوکسین B1 خطرناک ترین و کشنده ترین مایکوتوکسین می باشد که توسط *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می شود (۱۰ و ۱۱). آفلاتوکسین B1 قوی ترین، جهش زا و سرطانزا ترین آفلاتوکسین های شناخته شده است که اندام هدف آن کبد می باشد و توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) به عنوان کارسینوژن گروه یک شناخته شده است (۱۲ و ۱۴).

آسپرژیلوس فلاووس متعلق به شاخه آسکومایکوتا، رده یوروتیومیست ها و راسته یوروتیالس است (۱۳). این قارچ از جمله قارچ هایی است که در حین نگهداری محصولات زراعی در مرحله قبل از برداشت توانایی آسیب جدی به محصول را

مواد و روش‌ها

الف) تهیه سوسپانسیون آسپرژیلوس فلاووس: آسپرژیلوس فلاووس با شماره PTCC 5312 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بصورت آمپول‌های لیوفیلیزه تهیه شد. سپس در محیط کشت ساپرو دکستروز براث استریل ریخته شد و به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس گرم‌گذاری شد. پس از رشد و اسپورزایی قارچ، با افزودن ۰/۹ گرم سدیم کلراید در ۱ لیتر آب مقطر، سرم فیزیولوژی همراه با حاوی یک قطره توئین ۸۰ درصد به محیط کشت اضافه شد. سوسپانسیون قارچ‌ها بدست آمد و توسط لامپ نئوبار و زیر میکروسکوپ، شمارش اسپورها انجام شد (۳۳).

ب) تهیه گانودرما لوسیدوم، گانودریک اسید و نانوذره مس: قارچ گانودرما لوسیدوم با شماره PTCC 30306 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. برای عصاره‌گیری از گانودرما لوسیدوم خشک شده، ابتدا با استفاده از یک خرد کننده خرد و از صافی با فیلتر ۸۰ عبور داده شد. سپس مقادیر ثابت پودر خرد شده اندازه‌گیری شده و سه مرتبه در محلول کلروفرم برای مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سلسیوس فیلتر و تبخیر شده تا به حجم یک پنجم اولیه برسد. در نهایت محلول بی کربنات سدیم با هیدروکلریک اسید ۶ مولار به pH معادل ۳ رسانده و سرانجام توسط متانول و فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر جدا شد. مقدار ۲۵ گرم از پودر نانو ذره مس استاندارد با کد ۱۰۶۱ از شرکت VCN Materials با اندازه ذره ۴۰ نانومتری تهیه گردید. مقدار ۲۵ میلی‌گرم از پودر نانو ذره مس درون ۱۰ میلی لیتر از محلول DMSO درون لوله استریل مخلوط شد (۳۳).

ج) حساسیت آنتی بیوتیکی: به منظور بررسی اثر سینرژیسمی گانودریک اسید بعد از کشت چمنی قارچ‌ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار، دیسک بلانک استریل در مرکز پلیت قرار داده شد و با سمپلر مقدار ۱۰ میکرولیتر از گانودریک اسید و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از نانوذره مس بر روی دیسک ریخته شد (۳۴). در روش ایجاد چاهک همان مقدار از مواد مورد نظر برای دیسک بلانک، در چاهک ریخته شد. سپس

داروهای ضدسرطان تبدیل کرده‌اند (۲۵ و ۲۶). اثر گانودرما لوسیدوم در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله: ضد سرطان، آنتی اکسیدان، ضد دیابت، ضد چربی خون، ضد پیری و ضد جهش می‌توان نام برد (۲۷ و ۲۸). امروزه نانوتکنولوژی یکی از حوزه‌های مهم پویا تحقیقاتی در مطالعات می‌باشد. معمولاً ذراتی را با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر با توجه به یک بعد ترکیب می‌کنند که ویژگی‌های کاملاً جدید و بهبود یافته را با توجه به ویژگی‌های خاص نشان می‌دهند (۲۹).

نانو مواد اکسید فلزی، دارای فعالیت سلول‌کشی گسترده‌ای هستند که علیه باکتری، قارچ و ویروس فعالیت دارند. نانوذرات مس به دلیل سطح متوسط بالا و اندازه کوچک به عنوان میکروب کشی استثنائی عمل می‌کنند (۳۰). اخیراً در مطالعه‌ای Da Hye Ryu و همکاران روش بهینه‌سازی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد دیابتی و ضد التهابی گانودریک اسید استخراج شده از گانودرما لوسیدوم خشک شده را با استفاده از روش سطح پاسخ ارایه نمودند (۳۱). Priti Kumari و با روش بیوستزی نانوذره اکسید روی که یک پروتکل ساده، مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست، پرمحصول، سبز و مفید است، نشان دادند نانوذرات اکسید روی بیوستتر شده از عصاره برگ بادرنجوبه رشد آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین آن را کنترل می‌کند (۳۲). اکنون این پژوهش با هدف جایگزینی از میکروارگانیزم‌ها و مولکول‌های زیستی فعال و بررسی کاربرد آن‌ها در کنترل و از بین بردن آفلاتوکسین به منظور دستیابی به روشی که قادر است با کمترین استفاده از آلودگی‌زدای زیستی، بالاترین خاصیت مهارکنندگی و کنترل را ایجاد کند. با توجه به خاصیت متعدد گانودریک اسید، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، حداقل غلظت قارچ کشی (MFC)، دیسک فیوژن و نصف حداکثر غلظت بازدارندگی (IC50) برای بررسی خاصیت سینرژیستی بین این عصاره و نانوذره مس مورد توجه قرار گرفت. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر هم‌افزایی گانودریک اسید و نانوذره مس بر مهار رشد و میزان کشندگی این ترکیب در آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد.

شد و بلافاصله ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از قارچ‌ها به صورت جداگانه مایه‌زنی گردید. برای بررسی اثر سینرژیسم، مقدار ۱۲/۵ میکروگرم از غلظت اولیه تهیه شده از نانوذره مس به داخل لوله‌های استریل با سمپلر ریخته شد. سپس ۲۵ میکروگرم از این مخلوط داخل فالكون‌های حاوی ۲۰ میکرولیتر محیط کشت مایع اضافه شد. فالكون‌ها به مدت ده روز در تاریکی و انکوباتور شیکردار با دمای ۲۴ درجه سلسیوس قرار گرفت.

ح) روش آنالیز داده‌ها: داده‌های حاصل از آزمایش HPLC در سنجش آفلاتوکسین، ابتدا با استفاده نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۶) و کد گزاری وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ شدند. سپس شاخص‌های آماری توصیفی داده‌های آزمایش برای کل داده‌ها و هم برای هر گروه محاسبه شد. طرح آماری مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA way One) بود و همچنین از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین گروه‌های مورد مقایسه استفاده شد. سطح معنی دار بودن (value P) در تمام آزمون‌های مورد استفاده ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این بخش، یافته‌های تجربی پژوهش حاضر در خصوص اثرات گانودریک اسید، نانوذره مس و ترکیب این دو بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و میزان تولید آفلاتوکسین B1 ارائه می‌شود. آزمون‌های ضد قارچی شامل دیسک فیوژن، MIC، MFC و IC50، و سنجش میزان آفلاتوکسین به روش HPLC انجام گرفت. همچنین با استفاده از آنالیزهای آماری توصیفی و تحلیلی، تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی بررسی و تفسیر شده‌اند تا اثرات مهاري هر ترکیب به صورت مستقل و هم‌افزا مشخص گردد.

الف) نتایج حاصل از آزمون FTIR به منظور شناسایی گروه‌های عاملی موجود در گانودریک اسید، نانوذره مس و ترکیب هم‌افزایی آن‌ها، آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوريه انجام گرفت. طیف جذب نمونه‌ها در محدوده

تمامی پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد.

د) تعیین MIC به روش میکروبراث دیلوشن: این تست براساس پروتوکل مرجع موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام گرفت. ستون اول ۱۰۰ میکرو لیتر از استوک قارچی مربوطه اضافه شد. ستون ۲ به عنوان کنترل حلال شامل ۱۰۰ میکرو لیتر از استوک حلال است. ستون ۳ نماینده‌ی کنترل منفی می‌باشد که شامل استوک ۱۰۰ میکرو لیتر آمفوتریسین B درون چاهک‌ها ریخته شد. ستون ۴ یعنی کنترل مثبت شامل ۱۰۰ میکرو لیتر محیط DMEM است. در ستون ۵، ۲۰۰ میکرو لیتر از بالاترین غلظت استوک ترکیب مورد بررسی ریخته شد. از ستون ۶ تا آخر رقت سازی گانودریک اسید صورت گرفت. تمامی پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. همچنین این مراحل نیز برای نانو ذره مس و همچنین مخلوط گانودریک اسید و نانو ذره مس نیز انجام شد.

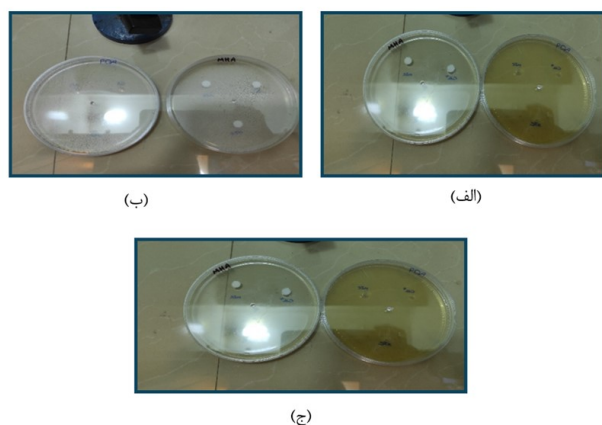
ه) تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC): در شرایط استاندارد از گوده‌ی MIC به قبل (برای هر ردیف) حدود ۱۰ میکرو لیتر از محتویات داخل چاهک کشیده و روی محیط پوتیتو دکستروز ریخته شد در نهایت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شد.

و) میکروبیواسی به روش پلیت ۶ خانه (IC50): ابتدا به مقدار ۵ میلی لیتر محیط کشت پوتیتو دکستروز براث درون هر گوده از پلیت ۶ خانه اضافه شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از رقت‌های تهیه شده از گانودریک اسید، نانو ذره مس و مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس به صورت تریپلیکیت ریخته شد. در نهایت به مدت ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط ساکن گرمخانه‌گذاری گشت.

ز) بازدارندگی تأثیر گانودریک اسید از تولید آفلاتوکسین B1 از قارچ آسپرژیلوس فلاووس: از بالاترین غلظت گانودریک اسید متوسط یعنی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت ۲۵/۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر به فالكون‌های ۵۰ میلی لیتری، مقدار ۲۰ میلی لیتر محیط کشت پوتیتو دکستروز براث اضافه

رشد (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MFC) و غلظت مهار میانه (IC50) استفاده شد.

(ج) آزمون دیسک دیفیوژن: در شکل ۴-۲ نتایج حاصل از آزمون دیسک دیفیوژن برای سه ترکیب آزمایشی ارائه شده است. تصویر (الف) مربوط به گانودریک اسید، تصویر (ب) مربوط به نانوذره مس، و تصویر (ج) مربوط به ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس می باشد.



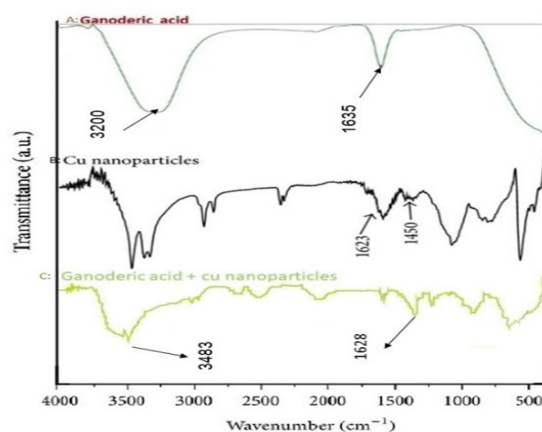
شکل ۲: نتایج دیسک فیوژن (الف) گانودریک اسید، (ب) نانوذره مس و (ج) مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس.

همان طور که مشاهده می شود، هر سه ترکیب منجر به ایجاد هاله ی عدم رشد در اطراف دیسک ها شده اند که نشان دهنده ی فعالیت ضدقارچی آن ها علیه *آسپرژیلوس فلاووس* است. قطر قابل توجه نواحی شفاف اطراف دیسک ها به ویژه در نمونه نانوذره مس و ترکیب دو ماده، گویای قدرت مهارکنندگی بالا است. با توجه به قطر یکسان دیسک ها و شرایط یکسان آزمون، می توان نتیجه گرفت که هر سه ماده خاصیت ضدقارچی قابل توجهی دارند، هرچند شدت تأثیر آن ها ممکن است متفاوت باشد.

(د) نتایج MIC و MFC: جهت ارزیابی دقیق تر توان بازدارندگی و کشندگی گانودریک اسید، نانوذره مس و ترکیب این دو ماده بر قارچ *Aspergillus flavus* آزمون های تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MFC) انجام شد که نتایج آن در شکل ۳ قابل مشاهده است. در تصویر (الف)، مربوط به گانودریک اسید، عدم رشد قارچ در محیط

$4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شد و نتایج در شکل (۱) نمایش داده شده است. در طیف گانودریک اسید، پیک های مشخص در ناحیه ی $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده ی کشش ارتعاشی گروه های هیدروکسیل (-OH) بود. پیک های ظاهر شده در نواحی $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ نیز به گروه های کربونیل (C=O) مربوط بود که نمایانگر حضور ساختارهای تری ترپنوئیدی در ترکیب است. در نمونه نانوذره مس، باندهای مشاهده شده در ناحیه $600-500 \text{ cm}^{-1}$ به باند ارتعاشی Cu-O نسبت داده شد که تأییدی بر تشکیل نانوذرات اکسید مس می باشد.

نبود پیک های مشخص کربونیل و هیدروکسیل در این طیف، تأییدکننده ی ماهیت معدنی آن بود. در طیف مربوط به ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس، باندهای مشخص هر دو ترکیب مشاهده شد. با این حال، تغییراتی جزئی در شدت و مکان برخی باندها، به ویژه در ناحیه ی 3400 cm^{-1} و 600 cm^{-1} ، مشاهده گردید که می تواند نشان دهنده ی برهم کنش ضعیف بین این دو ترکیب باشد. این یافته بیانگر آن است که ترکیب هم افزایی گانودریک اسید و نانوذره مس از نظر ساختار شیمیایی پایدار بوده و اجزای تشکیل دهنده آن خصوصیات خود را حفظ کرده اند.



شکل ۱: طیف FTIR گانودریک اسید، (B) نانوذره مس و (C) ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس.

(ب) نتایج اثرات ضد قارچی: برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی گانودریک اسید، نانوذره مس، و ترکیب این دو ماده، از روش های دیسک دیفیوژن، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی

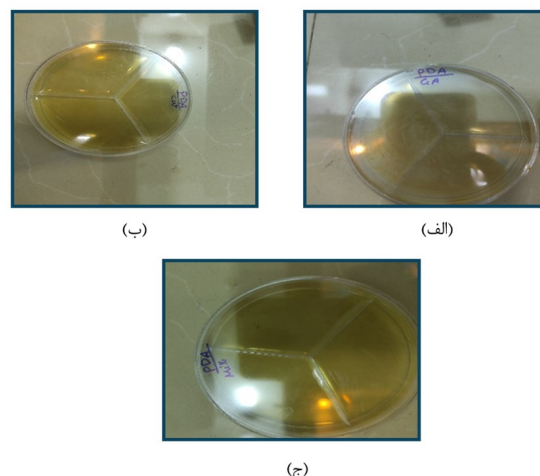
کامل رشد قارچ شدند. گانودریک اسید در غلظت $250 \mu\text{g/ml}$ ، مهار رشد 83% درصدی نشان داد، در حالی که نانوذره مس در غلظت $125 \mu\text{g/ml}$ با درصد مهار 69% درصد عملکرد بهتری نسبت به گانودریک اسید در همان غلظت داشت. ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس در غلظت $250 \mu\text{g/ml}$ موجب مهار 87% درصدی رشد شد که تفاوت اندکی با گانودریک اسید به تنهایی داشت و به لحاظ آماری اثر هم‌افزایی قابل توجهی را نشان نداد. این نتایج نشان‌دهنده‌ی اثربخشی قابل توجه هر سه ترکیب در مهار رشد قارچ بوده ولی تأکید دارند که نانوذره مس، حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز فعالیت ضدقارچی بالاتری دارد.

جدول ۱: نتایج مربوط به تأثیر گانودریک اسید، نانوذره مس، و مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس بر مهار قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*.

نام ترکیب	غلظت ($\mu\text{g/ml}$)	وزن خشک (mg)	درصد مهار رشد
گانودریک اسید	کنترل مثبت	۲۳/۴	۰
	۵۰۰	۰	۱۰۰
	۲۵۰	۵/۱۱	۸۳
نانوذره مس	۱۲۵	۵/۷۳	۶۷
	۲۵۰	۰	۱۰۰
	۱۲۵	۶/۶۳	۶۹
مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس	۶۲/۵	۶/۹۲	۵۸
	۵۰۰	۰	۱۰۰
	۲۵۰	۵/۲۴	۸۷
	۱۲۵	۵/۴۰	۷۴

و) مقایسه درصد جذب نوری: به منظور بررسی رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، میزان جذب نوری (OD) در پنج گروه آزمایشی شامل کنترل محیط، کنترل شاهد، گانودریک اسید، نانوذره مس، و ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس طی ۱۰ روز متوالی اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت مقایسه‌ای در شکل ۴ ارائه شده است. در گروه کنترل محیط، جذب نوری در تمامی روزها صفر گزارش شد ($\text{OD}=0.00$)، که نشان‌دهنده نبود آلودگی قارچی در این محیط و صحت شرایط استریل محیط

کشت نشان‌دهنده‌ی اثربخشی این ترکیب در مهار کامل رشد در غلظت (MIC) $250 \mu\text{g/ml}$ و اثر کشندگی آن در غلظت (MFC) $500 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. تصویر (ب) که مربوط به نانوذره مس است، مهار کامل رشد قارچ را در غلظت $125 \mu\text{g/ml}$ نشان می‌دهد و در غلظت $250 \mu\text{g/ml}$ خاصیت کشندگی آن تأیید شده است. تصویر (ج) ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس را نمایش می‌دهد که مشابه گانودریک اسید به تنهایی، دارای MIC برابر با $250 \mu\text{g/ml}$ و MFC معادل $500 \mu\text{g/ml}$ بود. مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که نانوذره مس در غلظت پایین‌تری نسبت به سایر گروه‌ها اثربخش بوده و عملکرد ضدقارچی قوی‌تری دارد، در حالی که ترکیب دو ماده تفاوت معنی‌داری نسبت به گانودریک اسید تنها نداشته و اثر هم‌افزایی مشخصی میان آن‌ها مشاهده نشد. این یافته‌ها با نتایج آزمون دیسک دیفیوژن نیز هم‌راستا بوده و تأیید می‌کنند که نانوذره مس، به عنوان ترکیبی مؤثر، در غلظت‌های پایین‌تری قادر به مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* می‌باشد، هرچند هر دو ماده در غلظت مناسب توانایی توقف کامل رشد قارچ را دارند.



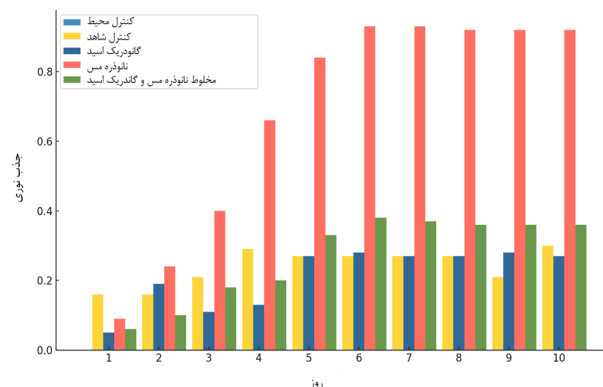
شکل ۳: نتایج MIC و MFC (الف) گانودریک اسید، (ب) نانوذره مس و (ج) مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس.

ه) مقایسه درصد مهار رشد قارچ: جدول ۱ نتایج اثر مهارکنندگی گانودریک اسید، نانوذره مس و ترکیب هم‌افزایی این دو را بر رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* نشان می‌دهد. بر اساس داده‌ها، هر سه ترکیب در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ باعث مهار

در میان گروه‌های تیمار شده داشت. از ۰/۰۵ در روز اول به حداکثر ۰/۳۶ در روز هفتم رسید و سپس تا روز دهم مقدار آن بین ۰/۳۳ تا ۰/۳۵ باقی ماند. این روند نشان‌دهنده مهار قابل توجه رشد قارچ در این گروه است، اما با توجه به نزدیکی مقادیر آن به گروه گانودریک اسید، به نظر می‌رسد اثر هم‌افزایی بارزی بین این دو ماده مشاهده نشده است.

(ن) اندازه‌گیری آفلاتوکسین B1. به منظور بررسی اثر تیمارهای ضدقارچی بر تولید آفلاتوکسین B1 توسط اسپرژیلوس فلاووس نمونه‌ها با روش HPLC آنالیز و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ تحلیل شدند. تحلیل آماری با آزمون واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی دانکن در سطح معناداری ۰/۰۵ انجام گرفت. همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، غلظت آفلاتوکسین B1 در بین گروه‌های مورد بررسی دارای پراکندگی مشخصی بود. بیشترین میانگین سطح آفلاتوکسین در گروه کنترل شاهد با مقدار ۰/۵۹ μg/ml مشاهده شد و پس از آن گروه‌های نانوذره مس (۰/۴۷ μg/ml) و ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس (۰/۴۵۷ μg/ml) قرار گرفتند. در مقابل، گروه گانودریک اسید با میانگین ۰/۲۹ μg/ml، کمترین سطح آفلاتوکسین را در بین گروه‌های آزمایش شده نشان داد. سطح آفلاتوکسین در گروه کنترل محیط صفر بود که نشان‌دهنده عدم آلودگی و شرایط استریل می‌باشد. انحراف معیار در این گروه‌ها بین ۰/۰۲۱ تا ۰/۰۳۳ متغیر بود که نشان‌دهنده همگنی نسبی در درون گروه‌هاست. میانگین کلی سطح آفلاتوکسین در کل نمونه‌ها برابر با ۰/۳۶۲۵ μg/ml گزارش شد.

آزمایش است. در گروه کنترل شاهد، مقدار جذب نوری از روز اول تا روز ششم به صورت افزایشی از ۱۵/۰ به ۰/۳۹ رسید و سپس تا پایان روز دهم بین ۰/۴۰ تا ۰/۴۴ باقی ماند. این روند بیانگر رشد طبیعی قارچ در محیط فاقد ماده ضدقارچ است.

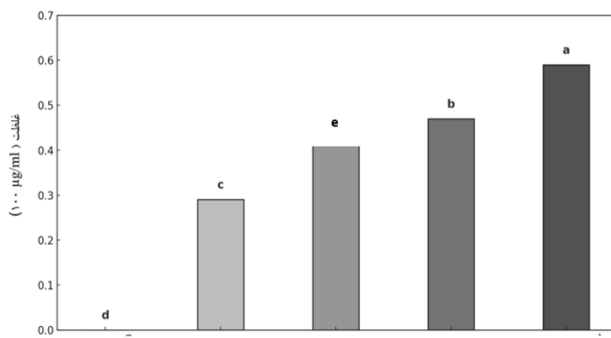


شکل ۴: جذب نوری پنج گروه، کنترل محیط، کنترل شاهد، گانودریک اسید، نانو ذره مس و مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس.

در گروه گانودریک اسید، روند افزایش جذب نوری کندتر بود؛ جذب نوری از مقدار ۰/۰۸ در روز اول به ۰/۳۳ در روز ششم رسید و تا روز دهم بین ۰/۳۳ تا ۰/۳۶ نوسان داشت. این داده‌ها نشان می‌دهد که گانودریک اسید توانسته رشد قارچ را نسبت به کنترل شاهد کاهش دهد. در گروه نانوذره مس، میزان جذب نوری به صورت شتاب‌دار افزایش یافت؛ از ۰/۱۰ در روز اول به ۰/۹۰ در روز پنجم و ۰/۹۹ از روز ششم به بعد رسید و تا روز دهم ثابت باقی ماند. این رشد بالا نشان‌دهنده کاهش اثربخشی نانوذره مس به تنهایی در کنترل رشد قارچ است، یا به عبارتی قارچ به آن مقاوم بوده است. در گروه ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس، جذب نوری کمترین مقدار را

جدول ۲: شاخص‌های آماره‌های توصیفی گروه‌های مورد آزمایش.

میانگین	تعداد	انحراف استاندارد	خطای معیار	مجموع	حداقل	حداکثر
کنترل شاهد	۴	۰/۰۶۲۳	۰/۰۳۱۶	۲۲/۳۶	۰/۵۳	۰/۶۷
کنترل محیط	۴	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
گروه گانودریک اسید	۴	۰/۰۴۲۴	۰/۰۲۱۲	۱/۱۶	۰/۲۴	۰/۳۳
گروه نانو ذره مس	۴	۰/۰۳۱۲	۰/۰۱۵۵	۱/۹۰	۰/۴۴	۰/۵۱
گانودریک اسید و نانو ذره مس	۴	۰/۰۴۶۴	۰/۰۲۳۲	۱/۸۳	۰/۴۱	۰/۵۲۲
کل	۲۰	۰/۲۱۳۶	۰/۰۴۷۷	۷/۲۵	۰/۰۰	۰/۶۷



شکل ۵: مقایسه میانگین سطح آفلاتوکسین B1 در بین پنج گروه تیمار شامل (a) شاهد تیمار (b) نانوذره مس، (c) مخلوط گانودریک اسید و نانوذره مس، (d) گانودریک اسید (e) کنترل محیط.

نظیر آسپرژیلوس فلاووس تولید شده و از سوی آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) در گروه یک سرطان‌زایی طبقه‌بندی شده‌اند. این ترکیبات نه تنها سلامت انسان و دام را از طریق مواد غذایی آلوده تهدید می‌کنند، بلکه از منظر اقتصادی نیز خسارات قابل توجهی در صنعت کشاورزی و دامپروری ایجاد می‌کنند. از این رو، شناسایی ترکیبات زیستی و ایمن با قابلیت مهار رشد قارچ و کاهش سطح آفلاتوکسین، ضرورتی انکارناپذیر در بهداشت عمومی و صنایع غذایی به شمار می‌رود.

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر گانودریک اسید، به‌عنوان متابولیتی فعال حاصل از قارچ گانودرما لوسیدوم و نانوذره مس بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و سطح تولید آفلاتوکسین B1 طراحی شد. نتایج نشان داد که هر دو ترکیب دارای توانایی مهار رشد قارچی و کاهش تولید آفلاتوکسین هستند، اما گانودریک اسید به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری مؤثرتر از سایر تیمارها عمل کرد. میزان آفلاتوکسین B1 در این گروه به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از گروه‌های دریافت‌کننده نانوذره مس و ترکیب دو ماده بود (۰/۲۹ در برابر ۰/۴۷ و ۰/۴۵۷ میکروگرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر، $p < 0.05$) این یافته نشان می‌دهد که اثر هم‌افزایی بین دو ماده مورد مطالعه مشاهده نشده و حتی ممکن است عملکرد ترکیبی آن‌ها با نوعی تضعیف متقابل همراه باشد.

پژوهش‌های Devipriya و همکاران نشان داد که نانوذرات مس اثرات ضد قارچی بر روی آسپرژیلوس نیجر و آسپرژیلوس فلاووس دارد (۳۵). همچنین مطالعات Maqsood و همکاران

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت بین گروه‌های آزمایشی از نظر آماری معنادار است ($p < 0.01$). آزمون تعقیبی دانکن تفاوت معنادار بین گروه گانودریک اسید با دو گروه دیگر (نانوذره مس و ترکیب آن با گانودریک اسید) را تأیید کرد، در حالی که بین دو گروه اخیر تفاوت آماری معناداری مشاهده نشد. این یافته نشان می‌دهد که گانودریک اسید به‌تنهایی مؤثرتر از سایر تیمارها در کاهش سطح آفلاتوکسین B1 عمل کرده است و اثر هم‌افزایی چشمگیری در ترکیب با نانوذره مس مشاهده نگردید.

در تحلیل آماری میانگین سطح آفلاتوکسین B1 میان گروه‌های مورد بررسی، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (Duncan) به‌عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد. نتایج این مقایسه‌ها در نمودار ۵ نمایش داده شده است. همان‌گونه که در نمودار مشخص است، بیشترین میانگین غلظت آفلاتوکسین B1 در گروه کنترل شاهد با مقدار ۰/۵۹ میکروگرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر و کمترین مقدار آن در گروه کنترل محیط با مقدار صفر مشاهده شد. در میان سه گروه تیمار شده، گروه گانودریک اسید به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کمترین سطح آفلاتوکسین را در بین گروه‌های آزمایشی با میانگین ۰/۲۹ میکروگرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر داشت. در مقابل، دو گروه دیگر یعنی ترکیب گانودریک اسید و نانوذره مس و نانوذره مس به‌تنهایی به‌ترتیب با میانگین‌های ۰/۴۵۷ و ۰/۴۷ میکروگرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر قرار داشتند. این دو گروه از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0.05$)، اما هر دو به‌طور معنی‌داری سطح آفلاتوکسین بالاتری نسبت به گانودریک اسید داشتند ($p < 0.05$). به‌طور کلی، نتایج این تحلیل نشان می‌دهد که گانودریک اسید اثر مهارکنندگی مؤثرتری بر کاهش سطح آفلاتوکسین B1 دارد و افزودن نانوذره مس به این ترکیب، تأثیر افزایشی معنی‌داری در کاهش سم قارچی ایجاد نکرده است.

بحث

آفلاتوکسین‌ها، به‌ویژه آفلاتوکسین B1، از جمله مایکوتوکسین‌های بسیار خطرناک هستند که توسط قارچ‌هایی

قارچ بومی گانودرما لوسیدوم، قابلیت بالایی در کاهش رشد قارچ و سطح آفلاتوکسین از خود نشان داد. پژوهش Radwan و همکاران نیز بر خواص ضدتوموری، ایمنی‌افزا و هدف‌گیری انتخابی گانودریک اسید تأکید داشتند (۲۵). همچنین نتایج حاصل از آنالیز HPLC در این پژوهش، کاهش معنی‌دار آفلاتوکسین B1 را در گروه دریافت‌کننده گانودریک اسید نشان داد که با یافته‌های Prathivadi و همکاران درباره توانایی ترکیبات زیستی در کاهش تا ۹۴٪ آفلاتوکسین هم‌راستا بود (۳۹).

نتیجه‌گیری

نوآوری این پژوهش استفاده از گانودریک اسید استخراج‌شده از گانودرما لوسیدوم است که با توجه به ماهیت طبیعی و بومی این قارچ که در مناطق شمالی ایران به صورت خودرو رویش دارد، همچنین به صورت ارزان در دسترس است و از سالیان پیش به‌عنوان یک ماده خوراکی مورد استفاده مردم قرار داشته است و اثرات سمی تاکنون از آن شناسایی نشده است، بنابراین ترکیبات موثر آن از جمله گانودریک اسید، می‌تواند به‌عنوان یک جاذب توکسین به صورت بالقوه عمل کند و در برنامه‌های کنترل زیستی آلودگی قارچی و حذف آفلاتوکسین در مواد غذایی و خوراک دام مورد توجه قرار گیرد و پس از مصرف توسط انسان یا حیوان، به همراه توکسین از دستگاه گوارش حذف شود، بدون آنکه اثر سوء بر روی سلامت انسان یا دام داشته باشد. همچنین با بهینه‌سازی شرایط استخراج مانند اسیدیته، تهویه و میزان زیست‌توده، می‌توان تولید گانودریک اسید را افزایش داده و صنعتی‌سازی و تجاری‌سازی کرد. در نهایت، یافته‌های این تحقیق تأیید می‌کند که گانودریک اسید با مکانیسم‌های احتمالی مانند مهار سنتز آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یا ایجاد اختلال در رشد میسلومی، نه تنها توان بالقوه‌ای در مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس دارد، بلکه از تولید آفلاتوکسین نیز ممانعت می‌کند و می‌تواند جایگزین مناسبی برای عوامل شیمیایی در کنترل آلودگی‌های قارچی باشد. عدم مشاهده اثر هم‌افزا بین گانودریک اسید و

نشان داد که نانوذرات اکسید مس نه تنها اثر بازدارندگی روی رشد آسپرژیلوس فلاووس دارد، بلکه از تولید مایکوتوکسین در این قارچ جلوگیری می‌کند (۳۶). این مطالعات اثربخشی ضدقارچی این نانوذرات را تأیید کرده‌اند، با این حال، کارایی آن‌ها به غلظت، روش سنتز، اندازه ذرات، و نوع قارچ هدف وابسته است. همچنین پژوهش‌های Das و همکاران نشان داد که نانوذره مس سنتز شده به روش سبز دارای خاصیت ضدقارچی قوی‌تری علیه قارچ‌های رشته‌ای نظیر آسپرژیلوس نیجر و همچنین شبه مخمرهایی مانند کاندیدا آلبیکنس است، ولی در این مطالعه، نانوذره مس در برابر آسپرژیلوس فلاووس، در مقایسه با گانودریک اسید، اثر مهارکنندگی ضعیف‌تری نشان داد (۳۷). احتمالاً تفاوت در ساختار رویشی قارچ‌ها، روش استخراج و یا ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذره از جمله دلایل این تفاوت عملکرد می‌باشد. از سوی دیگر، قارچ گانودرما لوسیدوم دارای مواد زیست فعال متعددی است که مهم‌ترین آن‌ها پلی‌ساکاریدها، تری‌ترپنوئیدهایی از جمله انواع گانودریک اسید، پروتئین‌ها، استرول‌ها و اسیدهای چرب می‌باشند. این ترکیبات خواص درمانی متعددی، از جمله فعالیت‌های ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی دارند. همچنین این قارچ آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و لیزوزیم دارد که به مبارزه با بیماری‌ها کمک می‌کنند (۳۸). گانودرما لوسیدوم به‌عنوان یکی از قارچ‌های دارویی مهم در طب سنتی چینی شناخته می‌شود و مصرف آن به بهبود سلامت و افزایش طول عمر مرتبط است. در ایران، قارچ گانودرما لوسیدوم در مناطق معتدل و مرطوب مانند تنکابن، گرگان، رامسر، گیلان و جنگل‌های مازندران به صورت خودرو رشد می‌کند. همچنین در سواحل جنوبی ایران به دلیل شرایط گرم و مرطوب، این قارچ قابلیت رشد دارد. این قارچ معمولاً بر روی تنه درختان جنگلی مانند بلوط، افرا، بید و ماگنولیا که در حال پوسیدگی است، رشد می‌کند. شرایط آب و هوایی ایران به‌ویژه در تابستان برای پرورش این قارچ مناسب است و امکان کشت آن در محیط‌های کنترل شده نیز وجود دارد. گانودریک اسید به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال مشتق از

نانوذره مس، موضوعی است که نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر در مطالعات آینده با استفاده از طراحی تجربی پیشرفته‌تر و مدل‌های حیوانی می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند و هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال برای حمایت از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. S.Z. Iqbal, Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review, Current Opinion in Food Science, 42 (2021) 237–247.
2. P. Pinton, C. Terciolo, D. Payros, I.P. Oswald, Mycotoxins hazard: the European view, Current Opinion in Food Science, DOI (2025) 101306.
3. G.S. Shephard, Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century, Analytical and bioanalytical Chemistry, 395 (2009) 1215–1224.
4. M. Sayadi, H. Tajik, Detoxification of aflatoxin b1 by *Lactobacillus rhamnosus* in a simulated model of the human digestive system, Journal of Microbial World, 11 (2019) 380–391 (In Persian).
5. D.K. Mahato, K.E. Lee, M. Kamle, S. Devi, K.N. Dewangan, P. Kumar, S.G. Kang, Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies, Frontiers in microbiology, 10 (2019) 2266.
6. N. Benkerroum, A. Ismail, Human breast milk contamination with aflatoxins, impact on children's health, and possible control means: A review, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19 (2022) 16792.
7. U.P. Sarma, P.J. Bhetaria, P. Devi, A. Varma, Aflatoxins: implications on health, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 32 (2017) 124–133.
8. Y. Liu, C.-C.H. Chang, G.M. Marsh, F. Wu, Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis, European journal of cancer, 48 (2012) 2125–2136.
9. C. Wild, J. Miller, J. Groopman, Effects of aflatoxins on aflatoxicosis and liver cancer, Mycotoxin Control in Low-and Middle-Income Countries. International Agency for Research on Cancer, DOI (2015).

10. K. Muaz, M. Riaz, C.A.F.d. Oliveira, S. Akhtar, S.W. Ali, H. Nadeem, S. Park, B. Balasubramanian, Aflatoxin M1 in milk and dairy products: Global occurrence and potential decontamination strategies, *Toxin reviews*, 41 (2022) 588–605.
11. P. Chandra, Aflatoxins: Food safety, human health hazards and their prevention, *Aflatoxins-Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*, IntechOpen2021.
12. W.H. Organization, Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the eighty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), *Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the eighty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, 2019.
13. M. Mohammadi, S.J. Hashemi, S. Rezaei, M. Bayat, Assessment of antifungal activity of Rosemary oil extract and its effect on AFL1 gene expression in *Aspergillus flavus* by Real-Time PCR, *Journal of Microbial World*, 11 (2018) 88–100 (In Persian).
14. M. Piotrowska, Microbiological decontamination of mycotoxins: opportunities and limitations, *Toxins*, 13 (2021) 819.
15. M.A. Klich, *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin, *Molecular plant pathology*, 8 (2007) 713–722.
16. A.M. Fouad, D. Ruan, H.K. El-Senousey, W. Chen, S. Jiang, C. Zheng, Harmful effects and control strategies of aflatoxin b1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry, *Toxins*, 11 (2019) 176.
17. Sayadi, M., & Tajik, H. (2019). Detoxification of aflatoxin b1 by *Lactobacillus rhamnosus* in a simulated model of the human digestive system. *Journal of Microbial World*, 11(37), 380–391 (In Persian).
18. Q. Li, X. Zhu, Vanillin and its derivatives, potential promising antifungal agents, inhibit *Aspergillus flavus* spores via destroying the integrity of cell membrane rather than cell wall, *Grain & oil science and technology*, 4 (2021) 54–61.
19. Z. Peng, L. Chen, Y. Zhu, Y. Huang, X. Hu, Q. Wu, A.K. Nüssler, L. Liu, W. Yang, Current major degradation methods for aflatoxins: A review, *Trends in food science & technology*, 80 (2018) 155–166.
20. S. Gibellato, L. Dalsóquio, I. Do Nascimento, T. Alvarez, Current and promising strategies to prevent and reduce aflatoxin contamination in grains and food matrices, *World Mycotoxin Journal*, 14 (2021) 293–304.
21. B.L. Gonçalves, K. Muaz, C.F.S.C. Coppa, R.E. Rosim, E.S. Kamimura, C.A.F. Oliveira, C.H. Corassin, Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Fres-cal cheese, *Food research international*, 136 (2020) 109604.
22. M. Kozarski, A. Klaus, D. Jakovljević, N. Todorović, W.A.A.Q.I. Wan, M. Nikšić, *Ganoderma lucidum* as a cosmeceutical: Antiradical potential and inhibitory effect on hyperpigmentation and skin extracellular matrix degradation enzymes, *Archives of biological sciences*, 71 (2019) 253–264.
23. K. Hapuarachchi, T. Wen, C. Deng, J. Kang, K. Hyde, *Mycosphere essays 1: Taxonomic confusion in the Ganoderma lucidum species complex*, *Mycosphere*, 6 (2015) 542–559.
24. T. Kohno, T. Hai-Bang, Q. Zhu, Y. Amen, S. Sakamoto, H. Tanaka, S. Morimoto, K. Shimizu, Tubulin polymerization-stimulating activity of *Ganoderma* triterpenoids, *Journal of natural medicines*, 71 (2017) 457–462.
25. F.F. Radwan, J.M. Perez, A. Haque, Apoptotic and immune restoration effects of ganoderic acids define a new prospective for complementary treatment of cancer, *Journal of clinical & cellular immunology*, DOI (2011) 004.
26. B.S. Gill, Navgeet, S. Kumar, Ganoderic acid targeting multiple receptors in cancer: in silico and in vitro study, *Tumor Biology*, 37 (2016) 14271–14290.
27. M.F. Ahmad, *Ganoderma lucidum*: A rational pharmacological approach to surmount cancer, *Journal of ethnopharmacology*, 260 (2020) 113047.

28. S. Gündoğdu, N. Özenver, Anticancer potential of *Ganoderma lucidum* and its underlying mechanisms, Mushrooms with Therapeutic Potentials: Recent Advances in Research and Development, Springer2023, pp. 221–240.
29. N.-Y. Lee, W.-C. Ko, P.-R. Hsueh, Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms, *Frontiers in pharmacology*, 10 (2019) 1153.
30. I. Babushkina, E. Gladkova, S. Belova, I. Norkin, Application of preparations containing copper nanoparticles for the treatment of experimental septic wounds, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 164 (2017) 162–164.
31. Ryu, Da Hye, Jwa Yeong Cho, Muhammad Hamayun, Dong Gyu Lee, and Ho-Youn Kim. "Metabolic modulation of basil (*Ocimum basilicum* L.): An insight into growth, metabolomics and antioxidant activity under varying temperature and light conditions ".*Chemical and Biological Technologies in Agriculture* ,11 no. 1 (2024): 10.
32. P. Kumari, H. Kumar, J. Kumar, M. Sohail, K. Singh, K. Prasad, Biosynthesized Zinc Oxide nanoparticles control the growth of *Aspergillus flavus* and its aflatoxin production, *International Journal of Nano Dimension*, 10 (2019) 320–329.
33. Moradkhah ,Shekoufeh, Mohaddeseh Larypoor, and Abdollah Allahverdi" .Design and Fabrication of a Rapid Detection Biosensor for *Candida albicans* Diagnosis in a Microfluidic Platform ".*Talanta Open* (2025): 100478.
34. Atefi, Aref, et al" .Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of a Sulfonamide-Based Antimicrobial Agent ".*Chemistry Africa* (2025): 1-13.
35. D. Devipriya, S.M. Roopan, Cissus quadrangularis mediated ecofriendly synthesis of copper oxide nanoparticles and its antifungal studies against *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Materials Science and Engineering: C*, 80 (2017) 38–44.
36. S. Maqsood, S. Qadir, A. Hussain, A. Asghar, R. Saleem, S. Zaheer, N. Nayyar, Antifungal properties of copper nanoparticles against *Aspergillus niger*, *Sch. Int. J. Biochem*, 3 (2020) 87–91.
37. Das, Prince Edwin, Imad A. Abu-Yousef, Amin F. Majdalawieh, Srinivasan Narasimhan, and Palmiro Poltronieri. "Green synthesis of encapsulated copper nanoparticles using a hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* leaves and assessment of their antioxidant and antimicrobial activities." *Molecules* 25, no. 3 (2020): 555.
38. Larypoor ,Mohaddeseh, et al. The synergistic effects of chitosan and *Ganoderma Lucidum* nanoparticles on p53 and HER3 gene expression, *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 14.2 (2024): 2061-2071.
39. Prathivadi Bayankaram, Padmaja, and Periyar selvam Sellamuthu. "Antifungal and anti-aflatoxigenic effect of probiotics against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* ".*Toxin Reviews* 35, no. 1-2 (2016): 10-15.