



## بررسی مقایسه‌ی عوامل زمینه‌ساز برای تولید افلاتوکسین‌ها

پوهنیار محمدنعیم علی‌زاده

دیپارتمنت پاراکلینیک، پوهنځی علوم وترنری، پوهنتون کابل، کابل، افغانستان  
ایمیل: naiemalizada4455@gmail.com

### چکیده

افلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ی هستند که توسط آسپرگیلوس فلاووس و آسپرگیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند. که تحت شرایط مساعد؛ مانند حرارت، رطوبت، pH و رطوبت نسبی می‌توانند مواد غذایی انسان‌ها و مواد خوراکی حیوانات را قبل و بعد از برداشت آلوده‌کنند. از ۲۰ افلاتوکسین شناسایی شده ۶ نوع آن (B1، B2، G1، G2، M1 و M2) بسیار مهم می‌باشد. اما افلاتوکسین B1 به‌خاطر ارتباط مستقیم با سرطان جگر انسان‌ها مضرترین شکل آن‌ها است. واقعات آلودگی افلاتوکسین در جوار، گندم، برنج و جوارسبز بسیار شایع است. در این مقاله نویسنده تلاش نموده تا عوامل زمینه‌ساز برای تولید افلاتوکسین را که شامل عوامل فزیک، تغذیه‌وی و بیولوژیکی می‌باشد، مورد بحث و بررسی قرار دهد.

اصطلاحات کلیدی: مایکوتوکسین؛ افلاتوکسین؛ آسپرگیلوس؛ محصولات غذایی؛ خوراکی

## Assessment of Comparative Predisposing Factors for the Production of Aflatoxins

Jr. Teaching Asstt. Mohammad Naiem Alizada

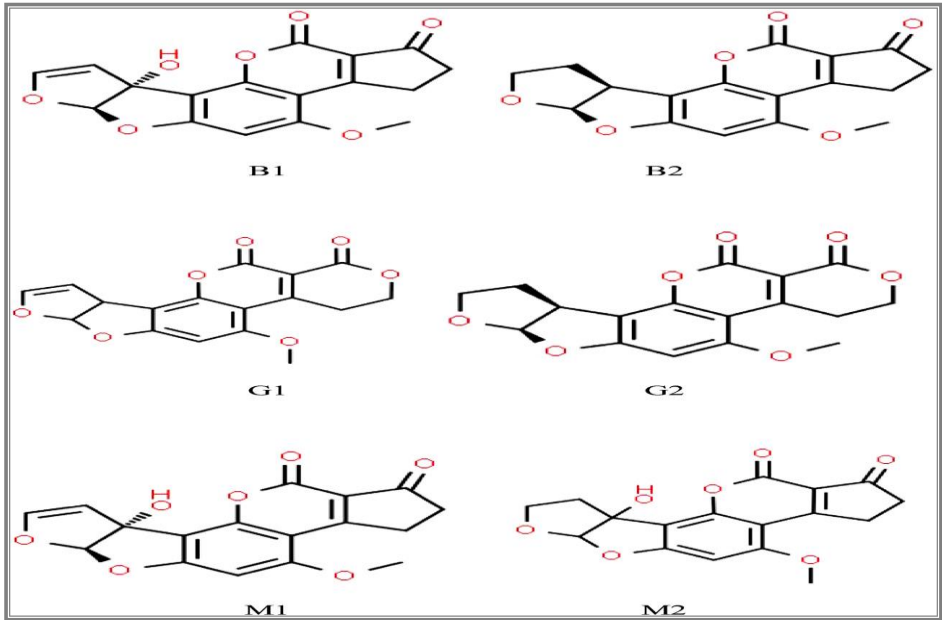
Department of Paraclinic, Faculty of Veterinary Science, Kabul University, Kabul, Afghanistan  
Email: naiemalizada4455@gmail.com

### Abstract

Aflatoxins are secondary metabolites produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Under favorable conditions such as temperature, humidity, pH and relative humidity, they can contaminate human food and animal feed before and after harvest. The 20 aflatoxins that are identified, 6 of them (B1, B2, G1, G2, M1 and M2) are very important. But aflatoxin B1 is the most harmful form due to its direct link to human liver cancer. Occurrence of Aflatoxin contamination is very common in maize, wheat, rice and sorghum. Therefore, the aims of this paper is to review the discuss the underlying factors for the production of aflatoxins, which are include physical, nutritional and biological factors.

Keywords: Mycotoxins; Aflatoxin; *Aspergillus*; Food Production; Feed Crops





شکل ۱: شیماتیک فورمول کیمیاوی افلاتوکسین‌ها (۵).

علی‌رغم تلاش‌های زیاد برای جلوگیری از عفونت قارچی و آلودگی مایکوتوکسین، افلاتوکسین هنوز به‌طور گسترده در غلجیات برداشت شده در کشورهای مختلف معمول است. یک بررسی سه‌ساله مایکوتوکسین نشان داد که اکثر مطالعات در مورد وقوع مایکوتوکسین‌ها در جواری، گندم و برنج انجام شده است که افلاتوکسین B1 شایع‌ترین مایکوتوکسین است که اغلب در سطوح بیش از حد مجاز است (۶). شیوع جهانی آلودگی افلاتوکسین‌ها در غلجیات مختلف (جواری، برنج، گندم، جو) ۳۳،۵۴ فیصد بوده‌اند. مطالعه‌ی مشابهی که داده‌های منتشر شده در مورد آلودگی افلاتوکسین B1 در سراسر جهان را طی یک دوره‌ی ۱۰ ساله (۲۰۰۸-۲۰۱۸) ارزیابی کرد، نشان داد که ۴۴،۸ فیصد گندم، ۵۵،۴ فیصد برنج، ۴۶،۱ فیصد جواری و ۶۷،۳ فیصد جوار سبز برای افلاتوکسین B1 مثبت بوده است (۷). نتایج تحلیل بیشتر از سال (۱۹۸۳-۲۰۱۷) نشان داد که ۳۰ فیصد از محصولات غذایی وابسته به غلجیات به افلاتوکسین آلوده شده بودند. به‌طور کلی، این مطالعات نشان می‌دهد که دانه‌های غلجیات، به‌ویژه جواری، گندم و برنج اغلب توسط افلاتوکسین‌ها آلوده می‌شوند (۸).

به‌دلیل وقوع مکرر افلاتوکسین‌ها در غلجیات و اثرات مضر آن‌ها بر سلامت انسان‌ها و حیوانات، افلاتوکسین‌ها از سال ۱۹۶۹ توسط سازمان غذایی و داروی ایالات متحده (US-FDA) نظارت و تنظیم شده است. علاوه بر این، بیش از ۱۲۰ کشور در حال حاضر حداکثر محدودیت‌ها

Maximum Limits (MLs) را برای افلاتوکسین وضع کرده اند تا از سلامت انسان‌ها و حیوانات محافظت کنند. به طور مثال، در اتحادیه اروپا، حد اکثر محدودیت‌ها ۲-۴ ppb برای مجموع افلاتوکسین‌ها (G1، B2، B1 و G2) در نظر گرفته اند. FDA ایالات متحده محدودیت ۲۰ ppb را برای افلاتوکسین B1 در همه انواع مواد غذایی تعیین کرده است. به طور مشابه، سازمان محافظتی و استانداردهای غذایی هند (Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI) حد اکثر محدودیت ۱۵ میکروگرام بر کیلوگرام را برای تمام افلاتوکسین‌ها و ۱۰ میکروگرام بر کیلوگرام برای افلاتوکسین B1 در غلجات و محصولات غلجات وضع کرده است (۶، ۷).

### عوامل زمینه‌ساز برای آلودگی افلاتوکسین

تولید افلاتوکسین به منبع غذایی، انزیم‌ها و شرایط محیطی مانند خشک‌سالی، حرارت، آسیب رسیدن به محصولات به وسیله بیماری‌های نباتی، حشرات، فعالیت‌های زراعتی در جریان کشت و برداشت محصولات بستگی دارد و در مراحل پس از برداشت به مواردی مانند نامساعد بودن شرایط ذخیره‌ی مانند حرارت و یا رطوبت بالا، وجود حشرات و سپری نمودن مدت طولانی در ذخیره‌گاه بستگی دارد (۵). با این حال، شرایط مساعد برای قارچ‌های افلاتوکسی‌جینیک همیشه برای تولید افلاتوکسین مساعد نیست، با این حال، عوامل به طور خلاصه به شرح زیر است:



شکل ۲: نشان‌دهنده عوامل زمینه‌ساز برای تولید افلاتوکسین‌ها (۹).

## عوامل فیزیکی

افلاتوکسین‌ها اغلب در شرایط آب و هوایی گرم و خشک بر روی محصولات زراعتی در حال رشد در زمین‌های زراعتی و شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب بعد از رسیدن محصولات تولید می‌شوند، به عبارت دیگر، حرارت بالا و خشک‌سالی در مرحله‌ی قبل از گل‌دهی محصولات و رطوبت بالا و بارندگی زیاد در مرحله‌ی برداشت محصولات از عوامل مهم در ایجاد آلودگی‌های افلاتوکسین به‌شمار می‌رود (۵).

تولید افلاتوکسین روی محصولات در مزرعه در شرایط خشک‌سالی افزایش می‌یابد. به‌خاطر آنکه این شرایط باعث ایجاد شکاف روی پوست خارجی و غلاف محصولات زراعتی شده و شرایط را برای نفوذ بیشتر قارچ و تولید بیشتر افلاتوکسین فراهم می‌سازد. هر چه مدت زمان قرار گرفتن محصولات در این شرایط طولانی‌تر باشد، سطح آلودگی به این توکسین‌های قارچی بیشتر است. آسیب به محصولات در اثر پروسه‌های زراعتی (به‌خصوص در مرحله‌ی برداشت) و فعالیت حشرات و جوندگان در کشت‌گاه و ذخیره‌سازی سبب صدمه و ایجاد فضاهای کوچک روی محصولات برای رشد قارچ و تولید توکسین افلاتوکسین می‌شود و به‌همین شکل حشرات می‌توانند به عنوان ناقل عمل کنند و باعث انتقال آلودگی به محصولات زراعتی شوند. طبق تحقیقات انجام‌شده نوع خاک زمین زراعتی هم می‌تواند در آلودگی افلاتوکسینی محصولات زراعتی دخیل باشد به این صورت که خاک‌های رگ‌دار، ظرفیت نگهداری آب کم‌تری نسبت به دیگر خاک‌ها را دارند و این مسئله احتمال خشک‌سالی و در نتیجه، آلودگی محصولات به توکسین قارچی را بیشتر می‌سازد (۸، ۱۰).

عوامل فیزیکی دیگر مانند pH، روشنی، رطوبت، حرارت، آب، رطوبت نسبی و گازهای اتموسفر مسئول آلودگی افلاتوکسین هستند. پوپنک‌ها/قارچ‌های تولیدکننده‌ی افلاتوکسین می‌توانند در محدوده‌ی وسیعی از pH (۳-۹، ۷-۱) رشد کنند، اما محدوده‌ی مطلوب pH (۷-۳) است. PH پایین ( $pH > 3$ ) رشد قارچ را به حداقل می‌رساند و pH کمی بالاتر ( $pH > 3$ ) باعث تولید قارچ و افلاتوکسین می‌شود. pH اولیه ( $pH = 5$ ) باعث افزایش تولید (افلاتوکسین B) می‌شود در حالی که PH بالاتر ( $pH = 7$ ) باعث تولید G (افلاتوکسین G) می‌شود، با این حال، ترکیب محیطی که در آن قارچ‌ها رشد می‌کنند، نیز بر pH تأثیر می‌گذارد. رشد قارچ‌ها و تولید افلاتوکسین نیز تحت تأثیر موجودیت روشنی است. تاریکی تولید افلاتوکسین را افزایش می‌دهد، در حالی که روشنی خورشید آن را مهار می‌کند. رطوبت بالا همیشه به آلودگی افلاتوکسین کمک می‌کند؛ زیرا شرایط مرطوب برای رشد قارچ مساعد است (۱۱).

رطوبت نسبی (۸۵٪) برای تولید افلاتوکسین مطلوب است، در حالی که رطوبت نسبی ۹۵٪ باعث افزایش تولید افلاتوکسین به میزان قابل توجهی می‌شود. با این حال، سطح آب هیچ اثر گزارش‌دهی بر آلودگی افلاتوکسین ندارد. آسپرژیلوس فلاووس قابلیت بقای بسیار خوبی برای رشد در محدوده‌ی وسیع از حرارت از ۱۲-۴۸ درجه سانتی‌گرید دارد، اما ۲۸-۳۷ درجه سانتی‌گرید محدوده‌ی حرارت مطلوب برای رشد افلاتوکسین‌ها است.

تولید افلاتوکسین می‌تواند در محدوده‌ی وسیع از حرارت واقع شود. اما حرارت مطلوب برای تولید افلاتوکسین ۲۵-۳۵ درجه سانتی‌گرید است؛ چون فعالیت جین کودکننده‌ی افلاتوکسین بیشتر می‌شود. معمولاً در حرارت بالا، تولید افلاتوکسین B از افلاتوکسین G زیاد است، اما در حرارت پایین هر دو تولید افلاتوکسین B و افلاتوکسین G مساوی است. در دست‌رس بودن O<sub>2</sub> و CO<sub>2</sub> نیز بر تولید افلاتوکسین تأثیر می‌گذارد. تولید افلاتوکسین و رشد قارچ در سطح بالاتر CO<sub>2</sub> و سطح پایین O<sub>2</sub> مهار می‌شود (۶، ۹).

### عوامل تغذیه‌ی

تولید افلاتوکسین نیز به‌طور گسترده تحت تأثیر مواد غذایی و عوامل مختلف تغذیه‌ی مانند کاربن، امینواسیدها، نایتروجن، لیپیدها و دیگر عناصر کم‌یاب قرار می‌گیرد (۱۲). حتا نوع و مقدار کود مورد استفاده در زمین‌های زراعتی بالای تولید افلاتوکسین نقش دارد. به‌طور مثال، در مورد کودهای عضوی که شامل بقایا و مواد اضافی گیاهی، زراعتی و فارمی که منبع کاربن هستند، استفاده بیش از اندازه‌ی آن‌ها با اثرگذاری بر نسبت کاربن به نایتروجن، شرایط را برای رشد قارچ و تولید افلاتوکسین افزایش می‌دهد. علاوه بر این چون این کودها شامل بقایای گیاهی می‌باشند که احتمال آلودگی آن‌ها به سپور قارچ و یا خود قارچ و افلاتوکسین وجود دارد و از طرفی، به دلیل این‌که این کودها به سرعت تجزیه می‌شوند و باعث افزایش حرارت سطح خاک شده و شرایط را برای رشد قارچ و تولید افلاتوکسین در کشت‌گاه افزایش می‌دهند (۶).

مواد غذایی غنی از کاربوهایدریت در مقایسه با روغن از تولید بیشتر پش‌تیبانی می‌کند؛ زیرا کاربوهایدریت به راحتی کاربن مورد نیاز برای رشد قارچ را فراهم می‌کند. در میان کاربوهایدریت‌ها، گلوکز، رایبوز، سکروز، زایلوز و گلیسرول به‌عنوان ماده‌ی عضوی عمل می‌کنند، در حالی که پپتون، لاکتوز و سوربوز قادر به تولید افلاتوکسین نیستند. نایتروجن به‌شکل نیتريت و نترات نیز سطح تولید افلاتوکسین توسط آسپرژیلوس فلاووس را به‌طرق مختلف افزایش می‌دهد (۱۳).

لیپیدها هم‌چنان نقش مهمی در تولید افلاتوکسین دارند. بایوسنتز افلاتوکسین در قارچ‌های تولیدکننده‌ی توکسین توسط اسیدهای چرب اپوکسی لیپوفیل و تولید افلاتوکسین ناشی از اکسیدیشن ارگوسترول را سبب می‌شود (۱۴).

تولید و تجمع افلاتوکسین در مواد غذایی دارای چربی نسبت به مواد غذایی کم‌چرب افزایش می‌یابد. افزودن روغن جواری در گندم بدون چربی آلوده به آسپرگیلوس فلاووس تولید افلاتوکسین را در مقایسه با محیط‌های بدون افزودن روغن جواری افزایش می‌دهد. ویتامین‌ها، امینواسیدها و آیون‌ها فلزی نیز تولید افلاتوکسین را به صورت ترکیبی افزایش می‌دهند. امینواسیدها مانند گلایسین، گلوتامیت و آلانین به‌همراه برخی از فلزات مانند جست و مگنیزیم تولید افلاتوکسین را افزایش می‌دهند. تولید افلاتوکسین با غلظت ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ (mg/L) جست به ترتیب ۴، ۵ و ۱۹ برابر افزایش یافته است. امینواسید، مانند تایروزین تولید افلاتوکسین را افزایش می‌دهد، در حالی که توسط تریپتوفان مهار می‌شود (۱۱، ۱۳).

### عوامل بیولوژیکی

فکتور بیولوژیکی شامل انواع قارچ‌ها، علف‌های هرزه و آسیب‌های حشرات است. علف‌های هرزه بیشتر به‌عنوان رقیب رشد می‌کنند و باعث ایجاد سترس در نباتات می‌شوند که با تولید افلاتوکسین هم‌راه است. تولید افلاتوکسین عمدتاً به انواع قارچ‌ها بستگی دارد. حشرات با تخریب نباتات باعث ایجاد سترس می‌شوند و زمینه را برای آلودگی قارچ‌های افلاتوکسی‌جنیک فراهم می‌سازند. تولید افلاتوکسین به انواع سترین‌ها نیز بستگی دارد (۱۵).

آسپرگیلوس فلاووس در مقایسه با آسپرگیلوس پارازیتیکوس افلاتوکسین کم‌تری تولید می‌کند. بر علاوه، از عوامل ذکر شده در بالا، آسپرگیلوس فلاووس نوع اصلی است که عمدتاً مسئول تولید افلاتوکسین و آلودگی محصولات می‌باشد؛ زیرا فراوان‌ترین پوپنک موجود در خاک است و دارای ویژگی ساپروبی بوده که آن را قادر می‌سازد بالای بسیاری از مواد غذایی عضوی از جمله آشغالی دانی، بقایای گیاهی، پنبه، حشرات مرده، غلج‌ات ذخیره شده، محصولات زراعتی، اجساد حیوانات و علوفه‌ی حیوانات رشد کنند (۱۱).

آلودگی‌های قبل از برداشت محصولات زراعتی به دلیل موجودیت طبیعی آسپرگیلوس فلاووس در خاک معمول است، در حالی که آلودگی پس از برداشت نیز توسط آسپرگیلوس فلاووس در جریان ذخیره‌سازی نیز رخ می‌دهد؛ زیرا دانه‌های غلج‌ات را خراب می‌کند. به دلیل عدم اختصاصیت میزبان، آسپرگیلوس فلاووس هم دانه‌های یک مشیمه‌یی و هم دو مشیمه‌یی را آلوده می‌کند (۸).

## نتیجه‌گیری

افلاتوکسین‌ها مهم‌ترین مایکوتوکسین بوده که می‌تواند سبب آلودگی در مواد غذایی انسان‌ها و مواد خوراکی حیوانات شوند. افلاتوکسین‌ها بیشتر جواری، گندم، برنج و جوار سبز و هم‌چنان میوه‌جات را قبل و بعد از برداشت آلوده می‌نمایند و سبب آسیب رساند به سلامتی انسان‌ها و حیوانات می‌شوند. آلودگی افلاتوکسین‌ها در محصولات یک تهدید جهانی است که سلامتی مواد غذایی، مواد خوراکی را به خطر می‌اندازد و هم‌چنان بر اقتصاد دهاقین و صنایع کوچک وابسته به محصول تأثیر می‌گذارد. عوامل زمینه‌ساز برای تولید این توکسین عبارت اند از:

عوامل فیزیکی: عوامل فیزیکی نقش اصلی را در تولید افلاتوکسین‌ها بازی می‌کند، زیرا شرایط شامل حرارت، استرس خشک‌سالی، رطوبت بالا و بارندگی زیاد و عمل‌کرهای زراعتی در مراحل کشت و برداشت در مزرعه ولی در مرحله‌ی پس از برداشت، مواردی مانند نامساعد بودن شرایط ذخیره‌وی مانند حرارت، رطوبت، وجود حشرات و سپری نمودن مدت طولانی در انبار بر تولید افلاتوکسین‌ها بستگی دارد. خشک‌سالی سبب تخریب غلاف محصولات شده و زمینه را برای داخل شدن قارچ‌ها و تولید افلاتوکسین مساعد می‌سازد. قارچ‌های تولیدکننده‌ی افلاتوکسین در محدوده‌ی وسیع حرارت از ۱۲-۴۸ درجه‌ی سانتی‌گرید رشد می‌کنند. رطوبت نسبی ۹۵٪ سبب تولید افلاتوکسین‌ها به میزان قابل توجه می‌شود. قابل ذکر است که قارچ‌های تولیدکننده‌ی افلاتوکسین می‌توانند در محدوده‌ی وسیع pH از (۹,۳-۱,۷) رشد کنند. قارچ‌های تولیدکننده‌ی افلاتوکسین می‌توانند در سطح بالایی کاربن‌دای‌اکساید و سطح پائین اوکسیجن نیز رشد کنند.

عوامل تغذیه‌وی: کود عضوی که شامل بقایای و مواد زاید گیاهی، زراعتی و حیوانی منبع کاربن هستند، استفاده بیش از حد از این کود روی نسبت کاربن و نایتروجن اثر گذاشته و شرایط را برای رشد قارچ‌ها و تولید افلاتوکسین‌ها مساعد می‌سازد. بنابراین، کود کیمیاوی و عضوی باید به‌گونه‌ی باشد که نه بر رشد گیاه صدمه‌یی وارد کند و نه رشد قارچ و تولید افلاتوکسین را افزایش دهد. نکته‌ی دیگر این است که وجود مواد مغذی مانند پروتئین، نشایسته و قندها در محصولات زراعتی بر رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین مؤثر است. چربی یکی از مهم‌ترین عوامل برای تولید آفلاتوکسین‌ها است و تحقیقات متعددی نشان‌دهنده‌ی این است که محصولات غذایی غنی از چربی اغلب با آفلاتوکسین B1 آلوده هستند.



عوامل بیولوژیکی: شامل انواع قارچ‌ها، علف‌های هرزه و آسیب‌های حشرات است. علف‌های هرزه بیشتر به‌عنوان رقیب رشد می‌کنند و باعث ایجاد سترس در گیاه می‌شوند که با تولید آفلاتوکسین همراه است. میزان تولید آفلاتوکسین عمدتاً به انواع قارچ‌ها بستگی دارد. حشرات با تخریب نباتات باعث ایجاد سترس می‌شوند و محل آلودگی قارچ‌های آفلاتوکسی‌جنیک را فراهم می‌کنند و فعالیت حشرات و جوندگان در مزرعه و انبار باعث صدمه و ایجاد فضاهای کوچک روی محصولات برای رشد قارچ و تولید توکسین آفلاتوکسین می‌شود و همین‌طور حشرات می‌توانند به‌هیئت ناقل عمل کنند و باعث انتقال آلودگی در محصولات زراعتی شوند.

- (1) Umesha S, Manukumar HM, Chandrasekhar B, Shivakumara P, Shiva Kumar J, Raghava S, et al. Aflatoxins and Food Pathogens: Impact of Biologically Active Aflatoxins and their Control Strategies. *J Organ Behav.* 2007; 28(3), pp. 303–25.
- (2) Nestic K, Habschied K, Mastanjevic K. Possibilities for the Biological Control of Mycotoxins in Food and Feed. *Toxins (Basel).* 2021; 13(3), pp. 1–15.
- (3) Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals.pdf. *J Saudi Chem Soc.* 2010; 15, pp. 129–44.
- (4) Negash E. A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. *J Nutr Heal Food Eng.* 2018; 8(2), pp. 35–43.
- (5) Peles F, Sipos P, Győri Z, Pfliegler WP, Giacometti F, Serraino A, et al. Adverse Effects, Transformation and Channeling of Aflatoxins Into Food Raw Materials in Livestock. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology.* 2019.
- (6) Bhardwaj K, Adunphatcharaphon S, Banerjee K, Elliott C, Petchkongkaew A, Kolawole O. A review of the fundamental factors and processes leading to the accumulation of aflatoxins in cereal crops. 2022, pp. 1–13.
- (7) Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food Chem Toxicol.* 2019; 124, pp. 81–100.
- (8) Khaneghah AM, Es I, Raeisi S, Fakhri Y. Aflatoxins in cereals: State of the art. *J Food Saf.* 2018; 38(6), pp. 12532.
- (9) Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK, Hea C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microb Pathog.* 2020; 144.
- (10) Fouché T, Claassens S, Maboeta M. Aflatoxins in the soil ecosystem: an overview of its occurrence, fate, effects and future perspectives. *Mycotoxin Res.* 2020; 36(3), pp. 303–9.
- (11) Kumar A, Pathak H, Bhadauria S, Sudan J. Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Prod Process Nutr.* 2021; 3(1), pp. 1–9.
- (12) Indranil S. *Micology Veterinary [Internet]. Veterinary Mycology.* 2015, p. 147. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2280-4\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2280-4_3)
- (13) Lai X, Liu R, Ruan C, Zhang H, Liu C. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control.* 2015; 15, pp. 401–4.
- (14) Scarpari M, Punelli M, Scala V, Zaccaria M, Nobili C, Ludovici M, et al. Lipids in *Aspergillus flavus*-maize interaction. *Front Microbiol.* 2014; 5(FEB), pp. 1–9.
- (15) Sowley ENK. Aflatoxins: A silent threat in developing countries. *African J Biotechnol.* 2016; 15(35), pp.1864–70.