



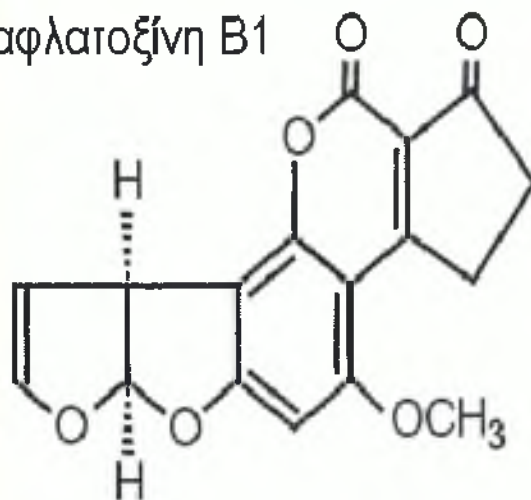
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

Συσχέτιση της παρουσίας αφλατοξινών με την
θρεπτική κατάσταση των ξηρών σύκων



αφλατοξίνη Β1



Πτυχιακή εργασία του
Ζώκου Μάρκου



ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

Συσχέτιση της παρουσίας αφλατοξινών με την θρεπτική
κατάσταση των ξηρών σύκων

Καλαμάτα, Μάιος 2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας κ. Μανωλοπούλου Ε., για την παροχή της εργαστηριακής υποστήριξης, τον Καθηγητή της Εδαφολογίας κ. Πασχαλίδη Χ. καθώς και την επιστημονικό τεχνικό προσωπικό του εργαστηρίου Εδαφολογίας κ. Κορίκη Α., για την βοήθεια που μου προσέφεραν σε θέματα ανάλυσης των θρεπτικών στοιχείων στα ξηρά σύκα. Την κ. Παπαδοπούλου Μ. εργαστηριακό συνεργάτη, για την εύρεση πληροφοριών του μύκητα *Aspergillus*. Επίσης τον κ. Σωτηρόπουλο Σ. επιστημονικό συνεργάτη για την παροχή των δειγμάτων σύκων από τον πειραματικό αγρό. Την Τσιαβτάρη Ε. τελειόφοιτη του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας για τον προσδιορισμό του φωσφόρου και βορίου στα δείγματα ξηρών σύκων της στην μέτρηση των θρεπτικών στοιχείων των ξηρών σύκων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου, στον Καθηγητή μου κ. Δημόπουλο Β. για την άριστη συνεργασία και για τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα _κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας..

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 2 -
1.1 Η ΣΥΚΙΑ.....	- 2 -
1.1.1. Ιστορική αναδρομή.....	- 2 -
1.1.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	- 4 -
1.1.3. Η καλλιέργεια της συκιάς στην Μεσογία.....	- 7 -
1.2. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	- 9 -
1.2.1. Γενικά.....	- 9 -
1.2.2. Φυτικοχημικές ιδιότητες των αφλατοξινών.....	- 11 -
1.2.3. Τοξικότητα των αφλατοξινών.....	- 14 -
1.2.4. Προβλήματα από την παρουσία αφλατοξινών στα γεωργικά προϊόντα.....	- 17 -
1.3. Ο ΜΥΚΗΤΑΣ ASPERGILLUS SP.....	- 21 -
1.3.1. Γενικά.....	- 21 -
1.3.2. Συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξινών από τον <i>Aspergillus sp.</i>	- 25 -
1.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ.....	- 27 -
1.4.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	- 27 -
1.4.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος.....	- 31 -
1.4.3. Ενζυμο-Ανοσοδιαγνωστική μέθοδος.....	- 32 -
2. ΣΚΟΠΟΣ ΑΥΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	- 36 -
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 37 -
3.1. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΞΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΣΥΚΩΝ.....	- 37 -
3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Β ₁ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA.....	- 38 -
3.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΑ ΞΗΡΑ ΣΥΚΑ.....	- 40 -
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 42 -
4.1. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΣΥΚΩΝ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	- 42 -
4.1.1. Ασβέστιο.....	- 43 -
4.1.2. Μαγνήσιο.....	- 44 -
4.1.3. Κάλιο.....	- 45 -
4.1.4. Φώσφορος.....	- 46 -
4.1.5. Σίδηρος.....	- 47 -
4.1.6. Μαγγάνιο.....	- 48 -
4.1.7. Ψευδάργυρος.....	- 49 -
4.1.8. Χαλκός.....	- 50 -
4.1.9. Βόριο.....	- 51 -
4.2. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΣΥΚΩΝ ΣΕ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β ₁	- 53 -
4.2.1. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Ca.....	- 54 -
4.2.2. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Mg.....	- 55 -
4.2.3. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε K.....	- 56 -
4.2.4. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε P.....	- 57 -
4.2.5. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Fe.....	- 58 -
4.2.6. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Mn.....	- 59 -
4.2.7. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Zn.....	- 60 -
4.2.8. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Cu.....	- 61 -
4.2.9. Συσχέτιση της αφλατοξίνης Β ₁ με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε B.....	- 62 -
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	- 63 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	- 67 -
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	- 67 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 71 -

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.

Αρχικά παρουσιάζεται εν συντομία η καλλιέργεια στον ελλαδικό χώρο και κάποια ιστορικά στοιχεία της συκιάς. Αναφέρονται κάποια στοιχεία για τις αφλατοξίνες όπως, οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, η τοξικότητα τους, οι συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγή τους και πως τα γεωργικά προϊόντα επηρεάζονται από αυτές. Περιγράφεται επίσης ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *Aspergillus* ο οποίος είναι ο κατεξοχήν υπεύθυνος για την παραγωγή αφλατοξινών. Επιπλέον γίνεται μια περιγραφή των σημαντικότερων τεχνικών που χρησιμοποιούνται σήμερα για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών με έμφαση στην τεχνική της ELISA, ακολουθεί παράθεση της εκτέλεσης του πειράματος, οι μεθοδολογίες ανάλυσης των ξηρών σύκων, τα αποτελέσματα και η ερμηνεία τους.

1.1 Η Συκιά.

1.1.1. Ιστορική αναδρομή.

Από μαρτυρίες, η ιερή σημασία που ταυτίζεται με αυτό το χρήσιμο καρποφόρο δέντρο, τοποθετείται σε μιαν ευρύτερη περιοχή, που από τον πολιτισμό της Κεντρικής Ασίας φθάνει στον Λατινικό κόσμο, για τον οποίο αρκεί να θυμηθούμε την αξία του *Ficus ruminalis*, το δέντρο του γόνιμου γάλακτος, κάτω από το οποίο η παράδοση τοποθετούσε τους μυθικούς δίδυμους της θεμελίωσης της Ρώμης.

Στην αρχαία Ελλάδα η συκιά ήταν δένδρο ιερό, όπως και η ελιά. Ο Αιλιανός στα "Αποσπάσματά" του γράφει ότι ένας από τους λόγους, που ώθησαν τον Ξέρξη να κατακτήσει την Ελλάδα ήταν τα περίφημα σύκα της χώρας, ιδίως τα "Αττικά σύκα". Ο Όμηρος επίσης αναφέρει για τον Οδυσσέα ότι για να πιστέψει ο πατέρας του Λαέρτης ότι αυτός ήταν πράγματι ο γιος του, του θύμισε ανάμεσα στα άλλα ότι έλαβε από αυτόν "τεσσαράκοντα συκάς".

Η παρουσία μιας συκιάς ικανής να παράγει βρώσιμα σύκα εμφανίζεται στην όαση του Kharga στην Αίγυπτο, σε μια εποχή αναγόμενη στο τέλος της Παλαιολιθικής Εποχής. Έτσι η αρχή ενός γεωργικού βίου φαίνεται ότι μετατίθεται και πέραν από τις ήδη όψιμες περιόδους που συνήθως καταγράφονται, τουλάχιστον, στη λεκάνη της Μεσογείου. Στον Ελλαδικό χώρο το σύκο εμφανίζεται κατά τη Μυκηναϊκή περίοδο μεταξύ των πιο συνηθισμένων τροφών κατά την καθημερινή διατροφή των Μυκηναίων. Ένα ιδεόγραμμα σε πινακίδες που βρέθηκαν στο ανάκτορο του Νέστορος πιστοποιεί την παρουσία της συκιάς στην περιοχή, ενώ το ίδιο το όνομα του βρώσιμου σύκου αναγνωρίζεται σε κείμενα που προέρχονται από τα αρχεία της Κνωσού και της Πύλου. ⁽⁷⁾

Μοσχεύματα της Σμυρναϊκής συκιάς, που καλλιεργείται στη Μεσσηνία μεταφέρθηκαν στην περιοχή σε διάφορες εποχές. Όπως μαρτυρεί η παράδοση, ο Αλήμπης, ένας Τούρκος που καταγόταν από τη Σμύρνη και είχε τσιφλίκι στο Πήδημα της Μεσσηνίας μετέφερε από τη Σμύρνη και τοποθέτησε στο τσιφλίκι του μοσχεύματα συκιάς γύρω στο 1800. Από το τσιφλίκι αυτό πήραν μοσχεύματα οι αγρότες των γύρω χωριών και “κέντρωσαν” τις συκιές τους. Τα σύκα καταναλώνονταν συνήθως νωπά και σπανιότερα αποξηραμένα. Μάλιστα σε μία “βεντέτα” μεταξύ της οικογένειας των Δικαίων και του αγωνιστή του ’21 Αναγνωσταρά, οι Δίκαιοι κνηγώντας τον πατέρα του κατάφεραν να ανακαλύψουν την διαδρομή του από τα αποξηραμένα σύκα που είχαν χυθεί στο δρόμο, γιατί μόνο αυτός είχε πολλές Σμυρναϊκές συκιές και φύλαγε αποξηραμένα σύκα όλο το χρόνο.

Το 1908 η Ελληνική κυβέρνηση παραλαμβάνει πολλές χιλιάδες μοσχεύματα από τη Σμύρνη, που είχαν εξαχθεί όμως παράνομα, διότι τέτοιες εξαγωγές απαγορεύονταν από την Τουρκική κυβέρνηση. Εκατό χιλιάδες από αυτά τα “κεντράδια”, διανέμονται στους αγρότες της Μεσσηνίας και με τον τρόπο αυτό αναπτύσσεται η συκοκαλλιέργεια στην περιοχή. Η ακμή της καλλιέργειας της συκιάς στο νομό τοποθετείται γύρω στο 1930-35, όπου τα αποξηραμένα σύκα εξάγονται σε χώρες της Ευρώπης και στις Η.Π.Α., ο συκοκαφές στη Γερμανία και στις χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, ενώ η συκομαρμελάδα αγοράζεται από τον Ελληνικό Στρατό για να χορηγείται ως πρωινό στους οπλίτες. Την εποχή εκείνη υπήρχαν συκοπαραγωγικά εργοστάσια σε έξι κοινότητες του Νομού Μεσσηνίας. ⁽³⁹⁾

1.1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά.

Η συκιά (*Ficus carica*) κατατάσσεται βοτανικά στην οικογένεια Moraceae και καλλιεργείται στη χώρα μας κυρίως για τα ξηρά σύκα στους Νομούς Μεσσηνίας, Λακωνίας, Εύβοιας και Λέσβου. Για νωπά σύκα καλλιεργείται σε πολλές και διάφορες περιοχές της Ελλάδας, συχνά σε μη οργανωμένους συκεώνες.

Το δέντρο είναι φυλλοβόλο και φτάνει σε ύψος από 7 έως 10 m. Ο κορμός και τα κλαδιά έχουν ανοιχτό γκρι χρώμα, τα φύλλα είναι πολύ μεγάλα, σε σχήμα παλάμης με τραχιά και τριχωτή επιφάνεια. Οι οφθαλμοί είναι ξυλοφόροι στα πλάγια και μικτοί ανθοφόροι στην κορυφή. Την άνοιξη εκπτύσσεται ο μικτός οφθαλμός της κορυφής και δίνει νεαρή βλάστηση στην οποία αναπτύσσονται στα πλάγια, δηλαδή στις μασχάλες των φύλλων, μικρά νεαρά σύκα.

Η συκιά είναι ένα θηλυκοδίοικο είδος που περιλαμβάνει δύο ευκρινείς τύπους δένδρων. Την αρρενοσυκιά ή άγριοσυκιά που είναι μόνουικη, με αρσενικά και θηλυκά άνθη και την ημεροσυκιά ή ήμερη συκιά που έχει μόνο θηλυκά άνθη.

Το σύκο ή πιο σωστά, η ταξιανθία, της ήμερης συκιάς περιέχει πολλά θηλυκά άνθη τα οποία έχουν πολύ μακρύ στύλο και χαρακτηρίζονται σαν “μακρόστουλα”. Μακρόστουλα είναι επίσης και τα άνθη των σύκων της δίφορης συκιάς.

Η άγρια συκιά έχει πολλές καρποφορίες κατά τη διάρκεια του χρόνου. Υπάρχουν τα χειμερινά σύκα που λέγονται **όλυνθοι**, τα οποία παραμένουν στο δέντρο από τον Οκτώβριο έως το Μάρτιο και έχουν μόνο θηλυκά άνθη με βραχύ στύλο και χαρακτηρίζονται σαν “**βραχύστουλα**”. Το Μάρτιο, στο ξύλο της προηγούμενης χρονιάς, εμφανίζονται τα ανοιξιάτικα σύκα, οι “**εριναιοί**” ή “**ορνιοί**”. Αυτά περιέχουν αρσενικά άνθη στο σημείο γύρω από το άνοιγμα του σύκου (**οστιόλη**) και θηλυκά άνθη προς το μέρος του ποδίσκου. Οι εριναιοί παραμένουν πάνω στο δέντρο για 2 μήνες, από τα τέλη Μαρτίου έως το Μάιο. Τον Ιούνιο στην τρυφερή βλάστηση εμφανίζονται τα **θερινά** σύκα, τα οποία έχουν μόνο θηλυκά άνθη και παραμένουν στο δέντρο για 2 περίπου μήνες. Τον Οκτώβριο στον ξυλοποιημένο πλέον βλαστό,

εμφανίζονται πάλι οι όλυνθοι και έτσι κλείνει ο κύκλος. Όλα τα θηλυκά άνθη της άγριας συκιάς (ολύνθων, εριναιών, θερινών) είναι βραχύστυλα. Αρσενικά άνθη και επομένως γύρη έχουν μόνο τα ανοιξιάτικα σύκα της άγριας συκιάς, οι **εριναιοί**. Με τη βοήθεια ενός μικρού εντόμου, του *Blastophaga psenes*, κοινώς ψήνα (ή ψίνα) ο οποίος συμβιώνει με τη συκιά, η γύρη από τα αρσενικά άνθη των εριναιών μεταφέρεται, κατά τα τέλη Μαΐου, μέσω της οστιόλης στα θηλυκά άνθη της ήμερης συκιάς. Γίνεται δηλαδή η επικονίαση και η γονιμοποίησή της.

Ο ψήνας διαχειμάζει στους όλυνθους της άγριας συκιάς στο στάδιο του αυγού. Τον Μάρτιο η πρώτη γενεά επισκέπτεται τους εριναιούς της άγριας συκιάς και την πρώτη σοδειά της ήμερης δίφορης συκιάς.

Στους εριναιούς, ο ψήνας εισέρχεται με ευκολία (βραχύστυλα άνθη) αλλά στα σύκα της ήμερης συκιάς δε μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό διότι τον εμποδίζουν οι μακριοί στύλοι των θηλυκών άνθεων (μακρόστυλα άνθη) και έτσι τα σύκα ωριμάζουν παρθενοκαρπικά χωρίς γονιμοποίηση. Μέσα στους εριναιούς της άγριας συκιάς γεννάει τα αυγά του από τα οποία εκκολάπτεται η δεύτερη γενιά η οποία εξέρχεται κατά τα τέλη Μαΐου, παρασύρει γύρη από τα αρσενικά άνθη και επισκέπτεται τα καλοκαιρινά σύκα της άγριας συκιάς, τα καλοκαιρινά σύκα της ήμερης μονόφορης συκιάς και τη δεύτερη σοδειά της ήμερης δίφορης συκιάς.

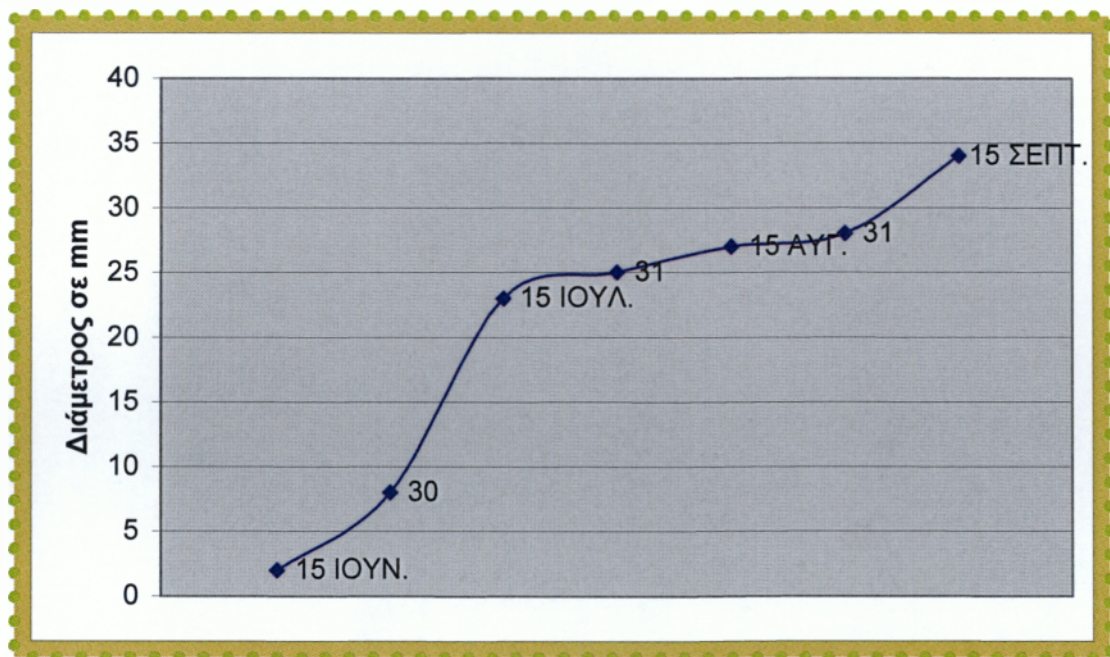
Στα βραχύστυλα σύκα της άγριας συκιάς ο ψήνας εισέρχεται και γεννά αυγά από τα οποία θα προκύψει η τρίτη γενιά ενώ στα μακρόστυλα των ήμερων δεν μπορεί να εισέλθει και αφήνει τη γύρη στην οστιόλη του σύκου. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη διότι τα σύκα της ήμερης συκιάς δεν είναι σε θέση να ωριμάσουν παρθενοκαρπικά. Ο ψήνας μπορεί να ταξιδέψει μέχρι και σε απόσταση 10 Km και εάν στην ακτίνα αυτή δεν υπάρχουν άγριες συκιές τότε για τη γονιμοποίηση των σύκων της δεύτερης εσοδείας της ήμερης συκιάς απαιτείται η διενέργεια της διαδικασίας του ερινεασμού. Κατά τον ερινεασμό, γίνεται ανάρτηση εριναιών από άγριες συκιές, σε επιλεγμένα δέντρα του συκεώνα στο διάστημα από τα τέλη Μαΐου έως τα μέσα Ιουνίου.

Η συκιά μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι και 1.000 m, σε μεγάλη ποικιλία εδαφών από βαριά πηλώδη έως ελαφρά αμμώδη, καθώς και σε εδάφη που δεν έχουν

καλή αποστράγγιση. Εμφανίζει αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι και τους -8°C ενώ σε θερμοκρασίες πάνω από 40°C , κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, υποβαθμίζεται σημαντικά η ποιότητα των σύκων λόγω του σχηματισμού χοντρού φλοιού.

Η συκιά πολλαπλασιάζεται αγενώς, με ξυλοποιημένα και ημιξυλοποιημένα φυλλοφόρα μοσχεύματα, με εναέριες καταβολάδες, με *in vitro* πολλαπλασιασμό και σπάνια με εμβολιασμό

Η αύξηση του καρπού της συκιάς γίνεται σε τρεις περιόδους, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1.1.



Διάγραμμα 1.1: Αύξησης της διαμέτρου του καρπού της συκιάς σε συνάρτηση με το χρόνο (Προσαρμογή από Ποντική, 1999). Η πρώτη περίοδος χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση, η δεύτερη από βραδεία αύξηση και η τρίτη από επίσης ταχεία αύξηση της διαμέτρου του καρπού ⁽²⁾

1.1.3. Η καλλιέργεια της συκιάς στην Μεσσηνία.

Οι σημαντικότερες ελληνικές ποικιλίες της μονόφορης συκιάς είναι:



- **Καλαμών** ή **Τσαπελοσυκιά** που ουσιαστικά ανήκει στην ποικιλία calymima και της οποίας ο καρπός έχει μέτριο μέγεθος, φλοιό ανοικτοπράσινο, κίτρινη σάρκα και τα σύκα της προορίζονται για ξερά.

- **Βασιλικά** ή **Σύκα της Αττικής** της οποίας οι καρποί είναι μεγάλοι, πράσινοι με σκούρες μωβ ραβδώσεις, ωριμάζουν τον Αύγουστο και καταναλώνονται νωποί.
- **Κύμης** της οποίας ο καρπός έχει μέγεθος μέτριο έως μεγάλο, ο φλοιός είναι πράσινος, η σάρκα κόκκινη, ωριμάζουν στα τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτέμβρη και καταναλώνονται είτε ως ξερά είτε ως νωπά. ⁽¹⁾

Η μεσσηνιακή συκιά ή κοινώς τσαπελοσυκιά, καλλιεργείται κυρίως στην κεντρικό και νότιο μέρος της επαρχίας Μεσσήνης και συγκεκριμένα στις περιοχές της Καρποφόρας, Πεταλιδίου, Δάρα, Στρέφι, Μάνεσι, Ανδρούσα και Διαβολίτσι. Στην επαρχία Καλαμάτας καλλιεργείται στις περιοχές Γαρδίκι, Βρωμόβρυση και Σπερχογεία.

Τα δενδρύλλια στην Μεσσηνία φυτεύονται σε αποστάσεις 6 - 8 μέτρων. Η φύτευση γίνεται το Νοέμβριο. Σε συστηματικούς οπωρώνες το έδαφος διατηρείται καθαρό, με ελαφρά οργώματα ή σβαρνίσματα. Η κατεργασία του εδάφους είναι επιφανειακή, διατηρείται καθαρό το έδαφος για την διευκόλυνση της συγκομιδής. Η αζωτούχος λίπανση, σύμφωνα με την ΣΥΚΙΚΗ και η κοπριά βελτιώνουν τις αποδόσεις. Στην Μεσσηνία η συκιά συνήθως δεν αρδεύεται. Η συκιά διαμορφώνεται με κλάδεμα σε ελεύθερο κύπελλο με 5 - 7 βραχίονες. Η συγκομιδή στην Μεσσηνία πραγματοποιείται σε 2 ή 3 χέρια όλο τον Αύγουστο και προς τις αρχές Σεπτέμβρη. Τα σύκα που προορίζονται για αποξήρανση μαζεύονται υπερώριμα με τίναγμα με καλάμια στο έδαφος.

Στις άλλες περιοχές της χώρας η ωρίμανση και η συγκομιδή των σύκων ξεκινά από τα τέλη Ιουλίου και συνεχίζεται μέχρι τα μέσα Οκτωβρίου. Τα σύκα, που προορίζονται

για αποξήρανση συλλέγονται υπερώριμα και αφού πέσουν από το δένδρο. Μετά τη συγκομιδή, τα σύκα ξεραίνονται σε υπαίθρια ξηραντήρια και απεντομώνονται σε ειδικούς κλιβάνους. Μέχρι την απαγόρευση του, η απεντόμωση γινόταν με τη χρήση βρωμιούχου μεθυλίου, σήμερα πραγματοποιείται με φωσφίνη. Στη συνέχεια μεταφέρονται στους χώρους επεξεργασίας, διαλέγονται και συσκευάζονται. Προϊόντα, που προέρχονται από το σύκο είναι η συκόπαστα, ο συκοκαφές (feigen kofte) και το σιρόπι από σύκο. ⁽³⁹⁾

1.2. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

1.2.1. Γενικά.

Οι αφλατοξίνες (aflatoxins) αποτελούν μια ομάδα από τις πιο τοξικές ουσίες που απαντώνται στη φύση και παράγονται κυρίως από μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. και συγκεκριμένα από τους *A. flavus*, *A. parasiticus* και *A. nomius*. Οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα στα αράπικα φιστίκια, στα σύκα και στα αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά και σε τυριά, όταν υπάρξουν κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Επίσης μπορεί να εμφανισθούν στο γάλα ζώων που έχουν τραφεί με ζωοτροφές (καλαμπόκι κ.λπ.), στα οποία είχαν αναπτυχθεί μύκητες (ευρωτίαση, μούχλα) ⁽³⁾

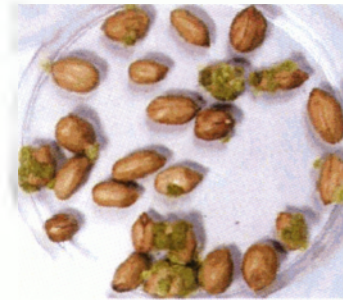
Η ανακάλυψη της υψηλής τοξικότητας των αφλατοξινών ξεκίνησε από την μελέτη της “ασθένειας X της γαλοπούλας” «turkey X disease». Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από απώλεια της όρεξης, λήθαργο και αδυναμία των πτηνών. Για τη διαπίστωση του αιτίου αυτής της αρρώστιας συνεργάστηκαν πολλές ομάδες ειδικών όπως κτηνίατροι, παθολόγοι, μικροβιολόγοι, διαιτολόγοι, χημικοί, βιοχημικοί και άλλοι. Βρέθηκε ότι όλες οι εκτροφές στις οποίες παρουσιάστηκε η ασθένεια, προμηθεύονταν φυράματα από το ίδιο εργοστάσιο ζωοτροφών. Όταν η ασθένεια παρουσιάστηκε και σε εκτροφές που έπαιρναν ζωοτροφές από κάποιο άλλο εργοστάσιο σε άλλη περιοχή διαπιστώθηκε ότι και τα δύο εργοστάσια χρησιμοποιούσαν ένα κοινό συστατικό, και συγκεκριμένα αραχιδόπιτα από τη Βραζιλία, για την παρασκευή των ζωοτροφών.



(α)



(β)



(γ)

(α) Το φυτό αραχίδας. (β) Ο καρπός της αραχίδας. (γ) Φιστίκια αράπικα στα οποία έχει αναπτυχθεί ευρωτίαση (μούχλα).

Από αυτή τη Βραζιλιάνικη αραχιδόπιτα απομονώθηκε ο μύκητας *A. flavus* και η υπόθεση ότι η ασθένεια μπορεί να προήλθε από αυτόν επιβεβαιώθηκε όταν απομονώθηκε ο ίδιος μύκητας από αραχίδες εξαιρετικά τοξικές και από την Ουγκάντα.

Διαπιστώθηκε ότι ο μύκητας παράγαγε μια τοξίνη η οποία ονομάστηκε **αφλατοξίνη** από το όνομα του μύκητα που την παράγαγε. ⁽⁴⁾

***Aspergillus flavus* + toxin = Aflatoxin**

1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των αφλατοξινών.

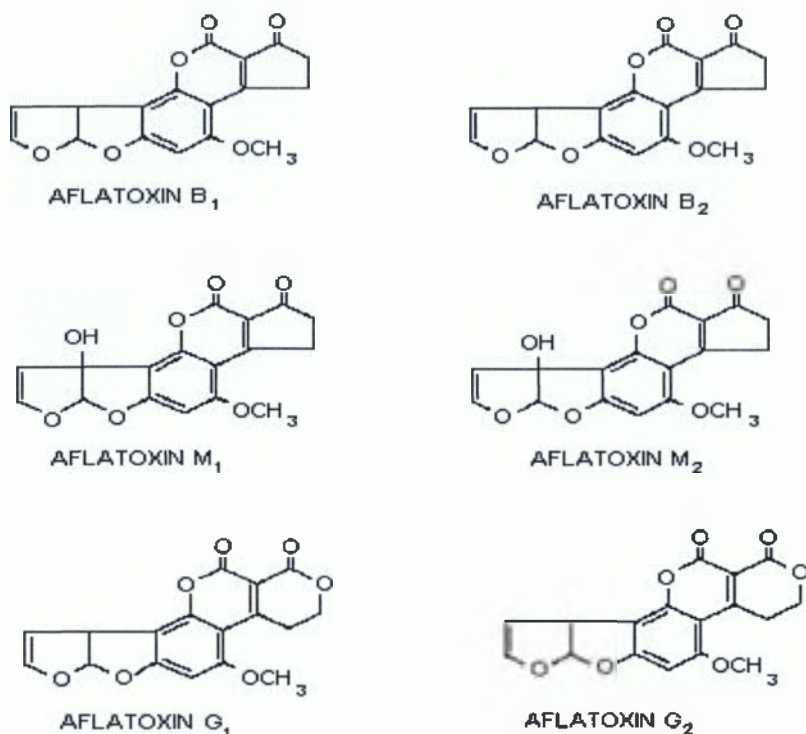
Χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα των αφλατοξινών είναι ο έντονος φθορισμός των διαλυμάτων τους υπό την επίδραση ακτινοβολίας στην περιοχή της υπεριώδους. Από την ιδιότητα αυτή προκύπτει το γράμμα που χαρακτηρίζει τις αφλατοξίνες των ομάδων Β και Γ. Οι αφλατοξίνες της ομάδας Β (B1, B2, B2a) χαρακτηρίζονται από έντονο κυανό (B, Blue) φθορισμό ($\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$), ενώ οι αφλατοξίνες της ομάδας Γ (G1, G2, G2a) από έντονο πράσινο (G, Green) φθορισμό ($\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$). Οι αφλατοξίνες M1 και M2 είναι μεταβολίτες των αφλατοξινών B1 και B2 και βρίσκονται στο γάλα (M, Milk) ανθρώπων και θηλαστικών ζώων που έχουν τραφεί με τροφές μολυσμένες με αφλατοξίνες. ⁽³⁵⁾ Οι συντακτικοί τύποι των μορίων παραπάνω αφλατοξινών δίνονται στο Σχήμα 1.2.

Η επίδραση διάφορων φυσικών και χημικών παραγόντων στις αφλατοξίνες έχει εξετασθεί αρκετά ώστε να διαπιστωθεί το κατά πόσο είναι δυνατόν να απαλλαγθούν οι τροφές από αυτές με κάποια φυσική ή χημική διαδικασία. Συνοπτικά η επίδραση των παραγόντων αυτών έχει ως εξής:

Θερμότητα: Σε ξηρή κατάσταση είναι σταθερές μέχρι το σημείο τήξης τους. Αντίθετα, παρουσία υγρασίας σύντομα καταστρέφονται, πιθανώς με υδρόλυση της λακτονικής ομάδας και στη συνέχεια με αποκαρβοξυλίωση.

Αλκάλια: Καταστρέφουν τις αφλατοξίνες με υδρόλυση του λακτονικού δακτυλίου. Ωστόσο φαίνεται, ότι η υδρόλυση αυτή είναι αντιστρεπτή. Παρουσία οξέος επανασχηματίζεται ο λακτονικός δακτύλιος. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα αλκάλια αποσπών τη μεθοξυλική ομάδα ($\text{CH}_3\text{O}-$) από τον αρωματικό δακτύλιο.

Οξέα: Ισχυρά ανόργανα οξέα μετατρέπουν τις αφλατοξίνες B1 και G1 στις B2a και G2a, αντιστοίχως, με υδρόλυση του διπλού δεσμού του ακραίου φουρανικού δακτυλίου.



Σχήμα 1.2. Οι συντακτικοί τύποι των μορίων των αφλατοξινών των ομάδων B, G και M. (Προσαρμογή από www.food-info.net/images/aflatoxins.jpg).

Οξειδωτικά μέσα: Οξειδωτικά μέσα όπως υποχλωριώδες νάτριο, υπερμαγγανικό κάλιο, χλώριο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπερβορικό νάτριο φαίνεται ότι αλλοιώνουν τα μόρια, γεγονός που καταφαίνεται από τον εξαφανισμό του χαρακτηριστικού φθορισμού τους. Τα προϊόντα οξείδωσης δεν έχουν απόλυτα ταυτοποιηθεί.

Αναγωγικά μέσα: Με υδρογόνωση οι αφλατοξίνες B1 και G1 μετατρέπονται στις αφλατοξίνες B2 και G2, αντιστοίχως. Με ισχυρότερα αναγωγικά μέσα, όπως το τετραϋδροβορικό νάτριο (NaBH₄) ανάγεται η κετονική ομάδα (-CO-) του κυκλοπεντενικού δακτυλίου των αφλατοξινών B1 και B2 (προς -CH₂-) σχηματίζοντας τις αφλατοξίνες RB1 και RB2 (Reduced B1, B2) ⁽⁴¹⁾

Οι βασικές ιδιότητες των διαφόρων αφλατοξινών δίνονται στον Πίνακα 1.2. που ακολουθεί.

Πίνακας 1.2. Βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες των αφλατοξινών (Προσαρμογή από www.icrisat.org/aflatoxin/).

Αφλατοξίνη	Μοριακός τύπος	Σημείο τήξης (°C)	Πηγές και Ιδιότητες
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	268 - 269	Παράγεται από τον <i>Aspergillus flavus</i> και τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm). Θεωρείται ως η ισχυρότερη καρκινογόνος ουσία για το ήπαρ.
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286 - 289	Παράγεται από τον <i>Aspergillus flavus</i> και τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm).
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	244 - 246	Παράγεται από τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	237 - 240	Παράγεται από τον <i>Aspergillus parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	299	Μεταβολίτης της B ₁ στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο μητρικό γάλα σε ποσότητες ng.
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	293	Μεταβολίτης της B ₂ στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο γάλα (και σε γαλακτοκομικά προϊόντα) βοοειδών που τρέφονται με τροφές μολυσμένες με B ₂ .

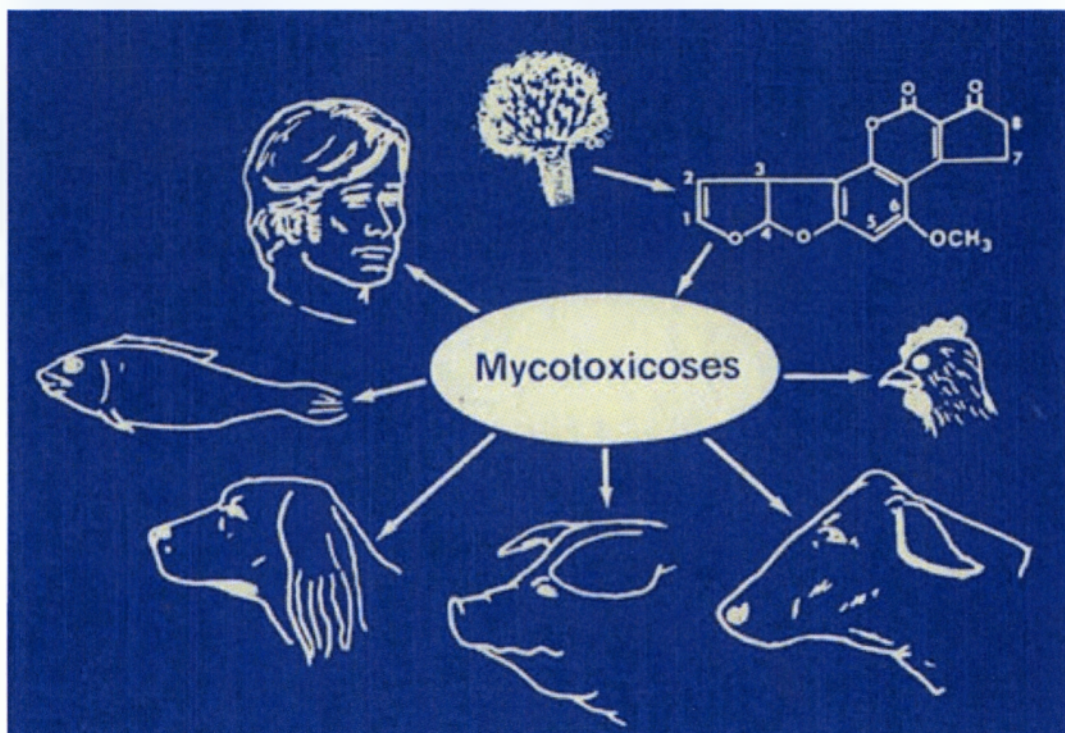
1.2.3. Τοξικότητα των αφλατοξινών.

Η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων στις αφλατοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε **αφλατοξίκωση (aflatoxicosis)**, μια παθολογική κατάσταση που εκδηλώνεται με μια μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων όπως:

- Δυσκολία στην κατάποση, αίσθημα πνιγμού, βλεννώδη πτύελα.
- Υψηλή πίεση, ρινορραγίες.
- Κάψιμο στο λάρυγγα και στους πνεύμονες.
- Έντονη εφίδρωση κατά τον ύπνο.
- Ναυτία, διάρροια, οξείς κοιλιακοί πόνοι.
- Καρδιακή αρρυθμία .
- Πόνοι στη κύστη, στο ήπαρ, στο σπλήνα ή στα νεφρά.
- Χρόνια κόπωση.
- Οδυνηρή ούρηση, σκοτεινόχρωμα ούρα.
- Προβλήματα όρασης.
- Ασθματικές καταστάσεις.
- Βοή στα αυτιά, προβλήματα ισορροπίας, βαρηκοΐα.
- Άσχημη γεύση στο στόμα.
- Πνευμονίες, πνευμονικά οιδήματα.
- Πρησμένοι λεμφαδένες.
- Απότομες μεταβολές σωματικού βάρους.
- Προβλήματα θυρεοειδούς.
- Απώλεια τριχοφυΐας, εύθραυστα νύχια.
- Αναφυλαξία, αλλεργίες κάθε είδους.
- Αστάθεια στη βάδιση.
- Πονοκέφαλοι.
- Προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα - Αποβολές - Δυσκολία στην ομιλία, άνοια .
- Μυϊκή δυσκαμψία.
- Απώλεια μνήμης.
- Καρκίνοι.
- Άγχος, κατάθλιψη, ταχυκαρδία, σύγχυση, κόπωση.

- Θάνατος σε ακραίες περιπτώσεις.

Η μεγάλη αυτή ποικιλία των συμπτωμάτων καθιστά δύσκολη τη διάγνωση της αφλατοξίκωσης.⁽³⁵⁾

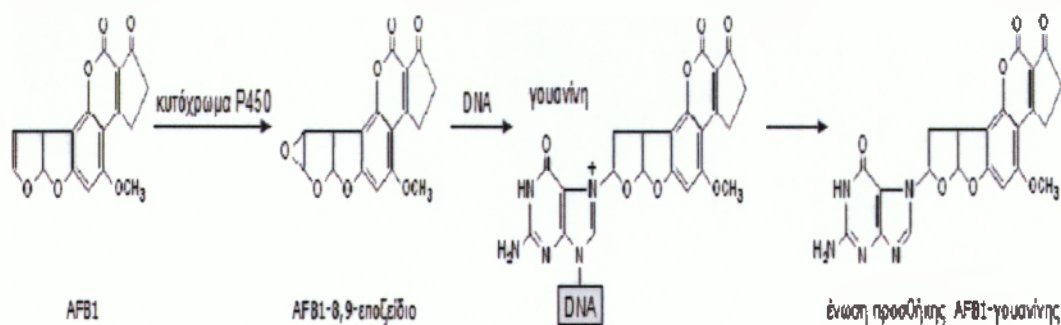


Σχήμα 1.2.1. Έκθεση του ανθρώπου και των ζώων στις αφλατοξίνες (Προσαρμογή από www.chem.uoa.gr).

Γενικά οι αφλατοξίνες έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά καρκινογόνες, μεταλλαξιόνες και ανοσοκατασταλτικές ουσίες. Η αφλατοξίνη B1 θεωρείται ως το **ισχυρότερο γνωστό καρκινογόνο του ήπατος** με αποδεδειγμένη γονοτοξικότητα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η καρκινογόνος δράση του είναι περίπου 1.000 φορές ισχυρότερη του βενζοπυρενίου, ενός πολυκυρηνικού υδρογονάνθρακα που αποτελεί το δραστικότερο μεταλλαξιγόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων⁽³⁴⁾

Συνοπτικά, ο μηχανισμός της τοξικής δράσης των αφλατοξινών έχει ως εξής: Οι αφλατοξίνες στον οργανισμό με την επίδραση των ενζύμων της ομάδας του κυτοχρώματος P-450 μεταβολίζονται στο ήπαρ προς διάφορα προϊόντα μεταξύ των οποίων βρίσκεται και μια εποξειδική ένωση. Ο μεταβολίτης αυτός σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με τη γουανίνη (G) του DNA και του RNA, γεγονός που οδηγεί

σε αποπουρίνωση και θραύση της αλυσίδας των νουκλεϊνικών οξέων με αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνθεσης των απαραίτητων πρωτεϊνών και του DNA σε ιστούς ζωτικών οργάνων, όπως του ήπατος, του εντέρου και του μυελού των οστών. ⁽³⁵⁾ Σχηματικά ο μηχανισμός αυτός δίνεται στο Σχήμα 1.2.2.



Σχήμα 1.2.2. Σχηματισμός ένωσης-προσθήκης αφλατοξίνης B₁ – γουανίνης (Προσαρμογή από www.pnas.org).

Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από ηπατικές νόσους. Έρευνες έδειξαν ότι κατά τη μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας B (Hepatitis B Virus, HBV), η έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο (Hepatocellular Carcinoma, HCC). Ο ιός HBV καθιστά δύσκολο τον μεταβολισμό των αφλατοξινών από τα ηπατοκύτταρα και έτσι η ένωση προσθήκης της αφλατοξίνης M₁ με το DNA παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ήπαρ, αυξάνοντας την πιθανότητα βλάβης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Θεωρείται ότι ο εμβολιασμός κατά της ηπατίτιδας των κατοίκων περιοχών της Ασίας και της Αφρικής όπου ενδημεί ο ιός HBV, θα μειώσει σημαντικά τις ηπατικές βλάβες σε πληθυσμούς που συχνά τρέφονται με μουχλιασμένα τρόφιμα.

Ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στον άνθρωπο γίνεται με δύο τεχνικές. Στην πρώτη ανιχνεύεται η ένωση προσθήκης της αφλατοξίνης M₁ με τη γουανίνη (AFM₁) στα ούρα. Η παρουσία αυτού του προϊόντος μεταβολισμού δείχνει έκθεση σε αφλατοξίνες κατά τις προηγούμενες 24 ώρες. Παρόλα αυτά δεν είναι αρκετά καλή

μέθοδος λόγω της διάσπασης της ένωσης προσθήκης με το χρόνο. Η δεύτερη τεχνική στηρίζεται στον προσδιορισμό της ένωσης προσθήκης αφλατοξίνης B1 με την αλβουμίνη (AFB₁) στο πλάσμα του αίματος. Ο προσδιορισμός αυτός είναι ακριβέστερος και είναι αξιόπιστος κατά 90% στα θετικά δείγματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μακροχρόνιες εκθέσεις, αφού παραμένει θετικός για 2-3 μήνες μετά την έκθεση του οργανισμού σε αφλατοξίνες. ⁽³⁵⁾

1.2.4. Προβλήματα από την παρουσία αφλατοξινών στα γεωργικά προϊόντα.

Η εμφάνιση αφλατοξινών στα γεωργικά προϊόντα προκαλεί σε ετησία βάση σημαντική ζημιά στους παραγωγούς. Σύμφωνα με την FAO (Food Agricultural Organization) το 25% των φυτικών γεωργικών προϊόντων σε παγκόσμια κλίμακα παρουσιάζει μόλυνση από μυκοτοξίνες.

Καθημερινά σε πολλά σημεία εισόδου των κρατών – μελών της Ε.Ε πραγματοποιούνται έλεγχοι για την ποιότητα των εισαγόμενων τροφίμων. Σε τακτά χρονικά διαστήματα δημοσιοποιούνται από τους αρμοδίους ελεγκτικούς φορείς τα αποτελέσματα των ελέγχων που πραγματοποιηθήκαν σε τρόφιμα ύποπτα για την παρουσία αφλατοξινών.

Μόνο στις Η.Π.Α., υπολογίζεται ότι οι μολύνσεις των γεωργικών προϊόντων με αφλατοξίνες έχουν σαν αποτέλεσμα ζημιές ύψους περίπου 100 εκατομμύρια δολαρίων ετησίως . Μόνο από τις αφλατοξίνες στα αράπικα φιστίκια, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις Η.Π.Α. για την παρασκευή φυστικοβούτυρου, οι ετήσιες ζημιές ανέρχονται σε 26 εκατομμύρια δολάρια.

Στην Ελλάδα το πρόβλημα παρουσίας αφλατοξινών στα ελληνικά γεωργικά προϊόντα δεν είναι έντονο, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχει εφησυχασμός. Κατά

καιρούς δε, έχουν ελεγχθεί αρκετά φορτία και έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα με προέλευση κυρίως από χώρες της Ασίας .

Το 2004 έγιναν δεκάδες έλεγχοι σε εισαγόμενα γεωργικά προϊόντα τα οποία προέρχονταν κυρίως από χώρες της Ασίας. Οι έλεγχοι αυτοί, είχαν σαν αποτέλεσμα την κατάσχεση και την καταστροφή 212 τόνων γεωργικών προϊόντων, μεταξύ των οποίων ξηρά σύκα και φιστίκια προέλευσης Τουρκίας και αραχίδες από την Κίνα και την Ινδία .

Τον Απρίλιο του 2008 απαγορεύτηκε η εισαγωγή και διάθεση στην ελληνική και ευρωπαϊκή αγορά από την νομαρχία Θεσσαλονίκης, φορτιού με 19 τόνους φιστικιών χωρίς κέλυφος, προέλευσης Κίνας, επειδή, σύμφωνα με την ανακοίνωση, προέκυψε ότι η περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνες ήταν πάνω από τα επιτρεπτά όρια.

Το 2006 ελεγχθήκαν και αποσυρθήκαν από την γερμανική αγορά 10 τόνοι ξερών σύκων, με αποτέλεσμα την ζημιά συνεταιριστικών οργανώσεων και παραγωγών.

Λόγω του μεγάλου κινδύνου των αφλατοξινών για την υγεία του ανθρώπου επιστήμονες εξετάζουν εδώ και δεκαετίες τις σωστές πρακτικές για την αποφυγή της μόλυνσης, ωστόσο διαφορές χώρες έχουν καθιερώσει ανώτατο επιτρεπόμενο όριο παρουσίας αφλατοξίνης στα διάφορα γεωργικά προϊόντα. Έτσι για την αφλατοξίνη B₁ που είναι και η περισσότερο τοξική , η Φιλανδία και το Βέλγιο έχουν καθιερώσει την εξέταση όλων των τροφίμων με μέγιστο όριο τα 2 και 5 mg/kg τροφίμου αντίστοιχα. Στην Γερμανία μέχρι πρόσφατα, το όριο για το σύνολο των αφλατοξινών (B₁, B₂, G₁, G₂) ήταν 4 mg /kg και στην Γαλλία 10 mg/kg.

Οι χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης έχουν ορίσει ανώτερο επιτρεπόμενο όριο για το σύνολο των αφλατοξινών στα 4 mg/kg. Στις Η.Π.Α. το όριο είναι 20 mg/kg για σιτηρά και καλαμπόκι που προορίζονται για ζωοτροφές σε νεαρά ζώα και ιδιαίτερα σε κοτόπουλα, ενώ το όριο μπορεί να φθάσει τα 200-300 mg/kg για ζωοτροφές που προορίζονται για μεγάλα ζώα (αγελάδες, χοίρους).

Μελέτη διαφόρων στελεχών του *A. flavus* και του *A. parasiticus* που έγιναν με τη μέθοδο της συνεχούς καλλιέργειας, έδειξε ότι οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν και να παράγουν αφλατοξίνες ακόμη και όταν το οξυγόνο το οποίο βρίσκεται στο υπόστρωμα είναι ελάχιστο. Ωστόσο, αυξημένες ποσότητες CO₂ αναστέλλουν την

ανάπτυξή τους. Επίσης το μυρμηκικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως σαν μυκητοκτόνο σε αποθηκευμένες ζωοτροφές, όχι μόνο δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του *A. flavus* αλλά την ευνοεί ακόμη και όταν το CO₂ στο περιβάλλον ανάπτυξής του είναι αυξημένο.

Στον πίνακα 1.2.1. που ακολουθεί δίνονται τα όρια της αφλατοξίνης στα γεωργικά προϊόντα, πάνω από τα οποία κρίνονται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση.

Πίνακας 1.2.1. Ανώτατα επιτρεπτά όρια παρουσίας αφλατοξινών σε διάφορα προϊόντα στην Ε.Ε.

προϊόν	μέγιστη επιτρεπτή περιεκτικότητα (μg/Kg)		
	Αφλατοξίνη B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
φιστίκια, καρποί με κέλυφος, ξηροί καρποί και παράγωγα προϊόντα μεταποίησης τους προοριζόμενα για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή ως συστατικά τροφίμων	2	4	-
φιστίκια προοριζόμενα να υποστούν επεξεργασία διαλογής ή άλλες φυσικές μεθόδους πριν την ανθρώπινη κατανάλωσή τους ή τη χρησιμοποίησή τους ως συστατικά τροφίμων	8	15	-
καρποί με κέλυφος και ξηροί καρποί προοριζόμενοι να υποστούν επεξεργασία διαλογής ή άλλες φυσικές μεθόδους πριν την ανθρώπινη κατανάλωσή τους ή τη χρησιμοποίησή τους ως συστατικά τροφίμων	5	10	-
σιτηρά και προϊόντα μεταποίησης τους προοριζόμενα για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή ως συστατικά τροφίμων	2	4	-
γάλα ωμό, ή το οποίο προορίζεται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων ή υφίσταται θερμική επεξεργασία	-	-	0,05

(Προσαρμογή από www.agratech.gr/kanonismos.html)

1.3. Ο μύκητας *Aspergillus sp.*

1.3.1. Γενικά.

Αριθμεί πάνω από 100 είδη τα οποία συνδέονται με 11 διαφορετικές τέλειες μορφές. Πολλά όμως είδη του γένους δεν διαθέτουν τέλεια μορφή γι' αυτό είναι δύσκολη η αναγνώριση τους και επομένως και η καταπολέμηση τους . Τα πιο συνηθισμένα αντιπροσωπευτικά φυτοπαθογόνα είδη είναι τα *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. Fumigatus*, *A.parasiticus*.

Τα περισσότερα είδη είναι σαπρόφυτα αποθηκευμένων υλικών, όπως δέρμα, χαρτί, ξύλο και φυτικά προϊόντα. Προκαλούν σήψη σπορίων, έχουν μορφή μαύρης μούχλας και παράγουν τοξίνες. Τα είδη *Aspergillus niger* και *carbonarium* είναι από τα σοβαρότερα φυτοπαθογόνα λόγω της συνθέσεως της μυκοτοξίνης ωχρατοξίνης που υποβαθμίζει την ποιότητα των παραγομένων αμπελοκομικών προϊόντων και το είδος *A. flavus* λόγω της παραγωγής της μυκοτοξίνης αφλατοξίνης. Προσβολές ξηρών καρπών όπως της αραχίδας από μύκητες του είδους *A. flavus* κυρίως στην Αφρική οδηγούν στην παραγωγή της μυκοτοξίνης πατουλίνης, καρκινογόνου ουσίας, που προκαλεί κύρωση του ήπατος. Ανάλογη προσβολή των σταφίδων από τους μύκητες *A. carbonarium* και *A. flavus* που παράγουν τη μυκοτοξίνη ωχρατοξίνη Α, μια νεφροτοξική και καρκινογόνο ουσία.

Σύμφωνα με τους Hawksworth et.al 1983, η ατελής μορφή, του μύκητα *Aspergillus* ταξινομείται ως εξής:

Βασίλειο: FUNGI

Διαίρεση: EUMYKOTA

Υποδιαίρεση: Deuteromykotina

Κλάση: Hyphomycetes

Τάξη: Moniliales

Οικογένεια: Moniliaceae

Γένος: *Aspergillus*

Η τέλεια μορφή ανήκει στο γένος *Eurotium* και ταξινομείται:

Βασίλειο: FUNGI

Διαίρεση: EUMYKOTA

Υποδιαίρεση: Ascomycotina

Κλάση: Plectomycetes

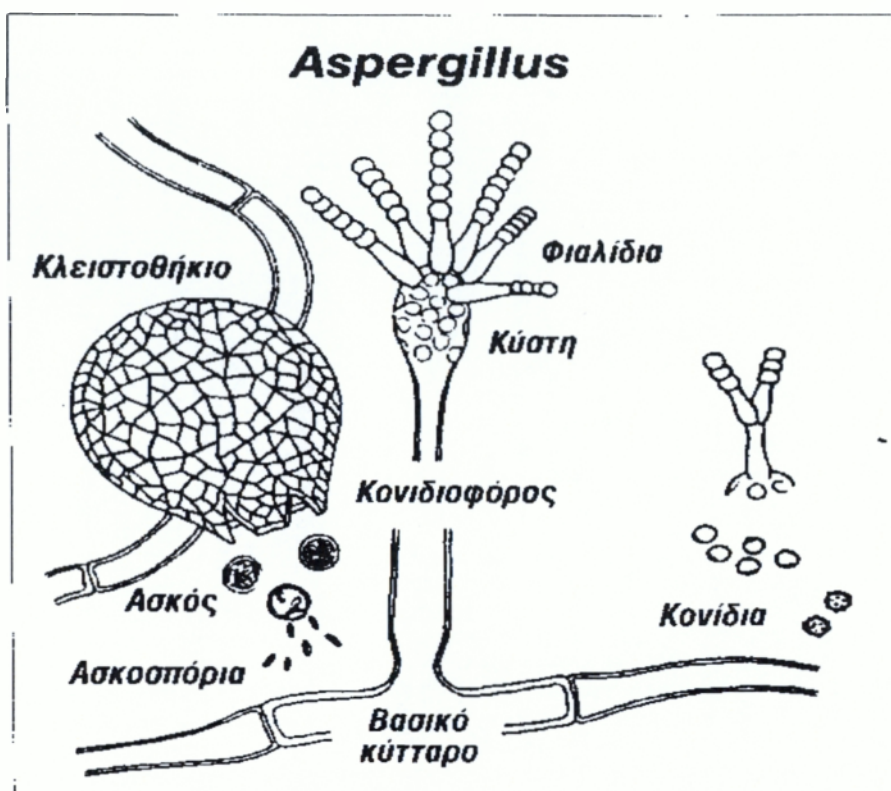
Τάξη: Eurotiales

Οικογένεια: Eurotiaceae

Γένος: *Eurotium*

Ο μύκητας σχηματίζει κονιδιοφόρους μήκους 1-2 mm που καταλήγουν σε σφαιροειδή διογκωμένη βάση, διαμέτρου 80 mm, στην οποία προσφύονται στηρίγματα που φέρνουν κονίδια σε αλυσίδες. Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα σφαιροειδή, με επιφάνεια λεία ή με δακτυλιοειδής προεξοχές χρώματος σκούρου καστανού ή μαύρου και διαμέτρου 2,5 - 4,5 mm. Διαχειμάζει είτε ως μυκήλιο είτε με την μορφή σκληρωτίων (*sclerotia*) σε νεκρή οργανική ύλη στο έδαφος.

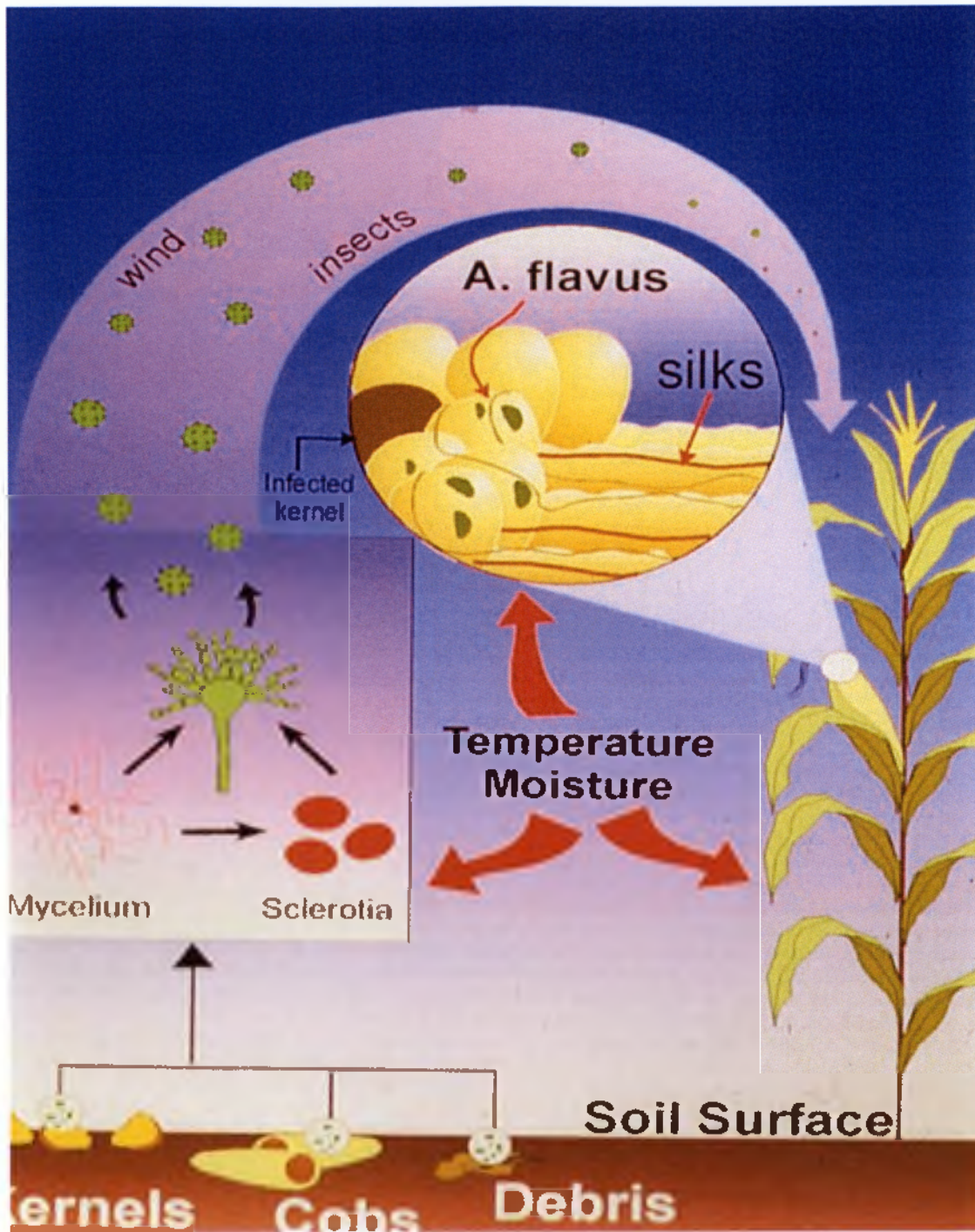
Έχουν καλά αναπτυγμένο μυκήλιο με υφές που διακλαδίζονται έντονα και φέρουν απλά διαφράγματα. Οι κονιδιοφόροι παράγονται απευθείας από το μυκήλιο σαν πλευρικές διακλαδώσεις ειδικών κυττάρων τα οποία είναι γνωστά σαν βασικά κύτταρα. Είναι σχετικά μακριές και καταλήγουν σε μια κύστη. Από την επιφάνεια της ώριμης κύστης εκφύονται ειδικά καρποφόρα φιαλοειδή κύτταρα γνωστά σαν φιαλίδια, τα οποία παράγουν κονίδια σε αλυσίδες. Τα φιαλίδια μπορεί να είναι σε μια σειρά οπότε το είδος αυτής της διάταξης ονομάζεται μονοστοιβαδικό ή σε δύο σειρές η μια πάνω στην άλλη. Το δεύτερο είδος διάταξης των φιαλιδίων ονομάζεται διστοιβαδικό. Στο διστοιβαδικό είδος τα κονίδια παράγονται από την δεύτερη στοιβάδα φιαλιδίων.



Εικόνα 1.3. Το γένος *Aspergillus*. Σχηματική παράσταση που δείχνει το βασικό κύτταρο, κονιδιοφόρο που καταλήγει σε κύστη, φιαλίδια και αλυσίδες κονιδίων, κλειστοθήκιο με ασκούς και ασκοσπόρια (Funder, 1953) Προσαρμογή από Χ. Χριστιάς, Μυκητολογία. Εκδ. ΑγροΤύπος, Αθήνα 1999

Μετά την απόσπαση τους από του κονιδιοφόρους, τα κονίδια, μεταφέρονται με τον άνεμο και τα έντομα. Στα σύκα η μόλυνση πραγματοποιείται από τα έντομα *Blastophaga psenes* (ψήνας), *Carpophilus hemipterus*, κ.α.

Αντίθετα από τους περισσότερους μύκητες, ο *A. flavus* ευνοείται σε ξηροθερμικό περιβάλλον. Η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του είναι οι 37° C. Ωστόσο μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα μεταξύ των θερμοκρασιών 25 έως 42° C και σε ειδικές περιπτώσεις από 12 έως 48° C.



Εικόνα 1.3.1. Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα. (Προσαρμογή από: www.aspergillusflavus.org/aflavus/)

1.3.2. Συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξινών από τον *Aspergillus sp.*

Πολλά στελέχη του μύκητα έχουν την ιδιότητα να παράγουν αφλατοξίνες στα πλαίσια μάλλον του ανταγωνισμού τους με άλλους σαπροφυτικούς ή παρασιτικούς μικροοργανισμούς. Η παρουσία των αφλατοξινών παρατηρείται τόσο στη νεκρή οργανική ύλη όσο και στους ζωντανούς ιστούς. Η παραγωγή αφλατοξινών, επηρεάζεται τόσο από γονοτυπικά χαρακτηριστικά του μύκητα όσο και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία, pH).⁽³⁴⁾

Στην περίπτωση της συκιάς, πριν τη συγκομιδή, το στρεσάρισμα των φυτών από παρατεταμένες συνθήκες ξηρασίας ή υψηλές θερμοκρασίες καθώς και οι βλάβες από έντομα, πουλιά και τρωκτικά είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που ευνοούν τον παρασιτισμό των μυκήτων και την παραγωγή αφλατοξινών. Η φτωχή λίπανση, η υψηλή πυκνότητα φύτευσης της καλλιέργειας και ο ανταγωνισμός των ζιζανίων συνδέονται με την αυξημένη ανάπτυξη μυκήτων και το σχηματισμό αφλατοξινών.⁽¹⁶⁾

Η σχετική υγρασία είναι από τους πιο σπουδαίους παράγοντες για την ανάπτυξη του *A. flavus* και την παραγωγή αφλατοξινών. Ελάχιστοι μύκητες αναπτύσσονται σε σχετική υγρασία μικρότερη από 70%. Για τον *A. flavus*, σε εργαστηριακές συνθήκες η ελάχιστη σχετική υγρασία για την παραγωγή κονιδίων είναι 85% και για τη βλάστηση και την ανάπτυξή τους 80%. Τα ποσοστά αυτά μπορεί να μεταβάλλονται ανάλογα με το υπόστρωμα και τη θερμοκρασία.⁽⁴⁾

Μετά τη συγκομιδή, ο σχηματισμός των αφλατοξινών ευνοείται από υψηλές θερμοκρασίες και υψηλά ποσοστά υγρασίας στο χώρο αποθήκευσης. Οι Davis και Diener (1970) προσδιόρισαν το κατώτατο όριο σχετικής υγρασίας που απαιτείται προκειμένου ο *A. flavus* να παράξει αφλατοξίνες. Για τα αμυλούχα δημητριακά, το κατώτατο όριο σχετικής υγρασίας σύμφωνα με τα ευρήματα των ερευνητών αυτών είναι 18,3-18,5%. Για τους ελαιούχους καρπούς, όπως τα φιστίκια και οι ηλιόσποροι, κατώτατο όριο σχετικής υγρασίας για την ανάπτυξη των αφλατοξινοπαραγωγών

στελεχών του *A. flavus* είναι 9-10%. Τα κατώτατα και ανώτατα όρια θερμοκρασίας για την παραγωγή αφλατοξινών είναι 12-27 °C, και 40-42 °C αντίστοιχα. ⁽¹⁹⁾

Μελέτη διαφόρων στελεχών του *A. flavus* και του *A. parasiticus* που έγιναν με τη μέθοδο της συνεχούς καλλιέργειας, έδειξε ότι οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν και να παράξουν αφλατοξίνες ακόμη και όταν το οξυγόνο το οποίο βρίσκεται στο υπόστρωμα είναι ελάχιστο. Ωστόσο, αυξημένες ποσότητες CO₂ αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Επίσης το μυρμηκικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως σαν μυκητοκτόνο σε αποθηκευμένες ζωοτροφές, όχι μόνο δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του *A. flavus* αλλά την ευνοεί ακόμη και όταν το CO₂ στο περιβάλλον ανάπτυξής του είναι αυξημένο.

1.4. Μέθοδοι προσδιορισμού των αφλατοξινών.

Για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών σήμερα, εφαρμόζονται πολλές και διάφορες τεχνικές. Οι τεχνικές αυτές, μπορούν να διακριθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: Στις ποιοτικές, οι οποίες ανιχνεύουν την παρουσία ή απουσία αφλατοξινών χωρίς όμως να υπολογίζουν τη συγκέντρωσή τους στο δείγμα. Είναι τεχνικές με χαμηλό κόστος, γρήγορες, και δεν απαιτούν την παρουσία εξειδικευμένου επιστημονικού προσωπικού. Στις ημιποσοτικές, οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τις αφλατοξίνες και ταυτόχρονα να υπολογίζουν τη συγκέντρωσή τους με μια μικρή απόκλιση και τέλος στις ποσοτικές τεχνικές, με τις οποίες είναι δυνατός ο υπολογισμός της ακριβής ποσότητας των αφλατοξινών στο δείγμα. Οι μέθοδοι αυτές, είναι χρονοβόρες, απαιτούν εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό και προσωπικό και έχουν αυξημένο κόστος.

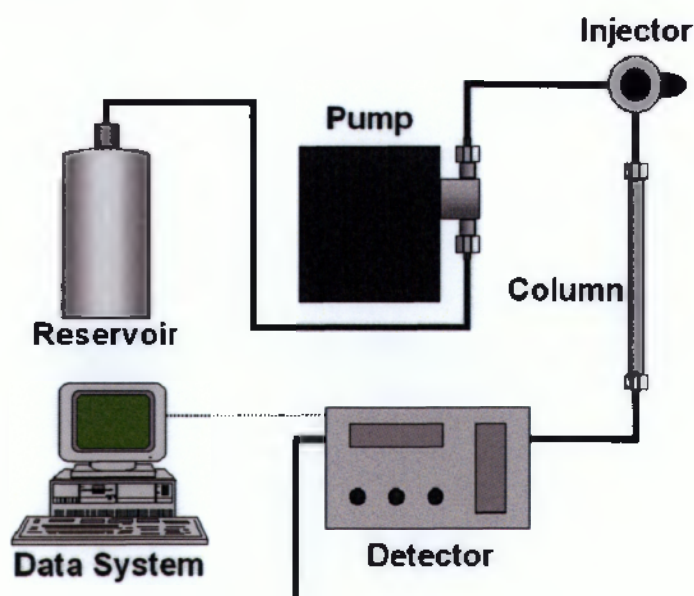
Οι τρεις επικρατέστερες μέθοδοι προσδιορισμού των αφλατοξινών που χρησιμοποιούνται σήμερα κατά κύριο λόγο, είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (Thin Layer Chromatography, TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης / απόδοσης (High Pressure / Performance Liquid Chromatography, HPLC) και η ενζυμο-ανοσοδιαγνωστική μέθοδος (Enzymelinked Immuno Sorbent Assay, ELISA).

1.4.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια μορφή χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται συχνά στη βιοχημεία και την αναλυτική χημεία για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων χημικών ουσιών. Σε γενικές γραμμές, η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορετική ταχύτητα με την οποία τα μόρια των διαφόρων ουσιών διατρέχουν μια χρωματογραφική στήλη υπό την πίεση ενός κατάλληλου υγρού διαλύτη. Το όλο σύστημα αποτελείται από μια αντλία υψηλής πίεσης η οποία σπρώχνει ένα διαλύτη ή μίγμα διαλυτών, που χαρακτηρίζεται σαν κινητή φάση (mobile phase) μέσα από μια μεταλλική στήλη που περιέχει κατάλληλο

χρωματογραφικό υλικό και που χαρακτηρίζεται σαν σταθερή φάση (stationary phase). Μεταξύ της αντλίας και της στήλης παρεμβάλλεται το σύστημα εισόδου του δείγματος (injector) και μετά τη στήλη ο ανιχνευτής (detector) και το σύστημα καταγραφής των δεδομένων (Data System). Ο χρόνος εξόδου (Retention Time) των διαφόρων ουσιών από τη στήλη ποικίλλει ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων των διαφόρων χημικών ενώσεων και της στάσιμης και κινητής φάσης. Ο χρόνος αυτός είναι σταθερός για κάθε ουσία και για συγκεκριμένες σταθερές συνθήκες ανάλυσης. Η HPLC είναι μια μέθοδος ταυτοποίησης και στηρίζεται στη σύγκριση του χρόνου εξόδου από τη στήλη των διαφόρων αγνώστων ουσιών με αυτόν προτύπων ουσιών (standards) σε καθαρή μορφή στις ίδιες συνθήκες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με σύγκριση της ανταπόκρισης του ανιχνευτή μεταξύ, του άγνωστης συγκέντρωσης δείγματος και γνωστής συγκέντρωσης της πρότυπης ουσίας. Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας δίνεται στο Σχήμα 1.4.1.

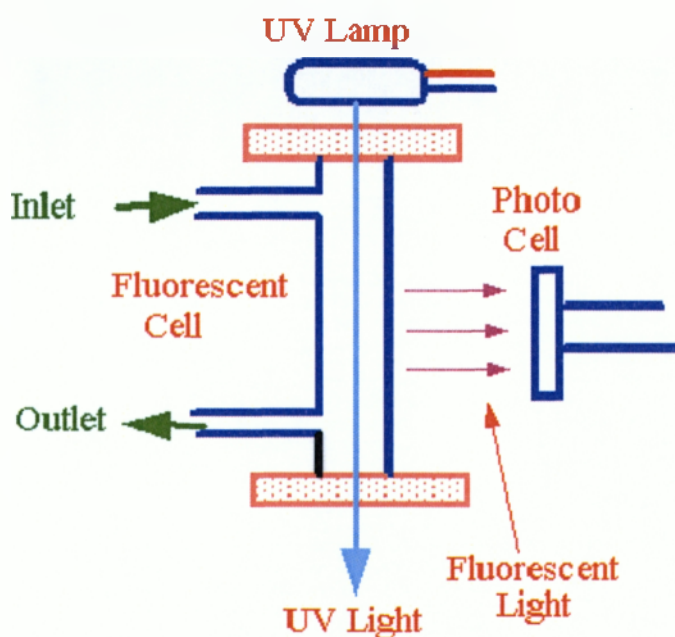
Υπάρχουν διάφορα συστήματα υγρής χρωματογραφίας. Τα πιο συνηθισμένα είναι αυτά της Υγρής Χρωματογραφίας Κανονικής Φάσης (Normal Phase HPLC, NP-HPLC), που χρησιμοποιεί μια πολική στάσιμη και μια μη πολική κινητή φάση και της Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase HPLC, RP-HPLC ή RPC) η οποία χαρακτηρίζεται από μια μη πολική στάσιμη φάση και από μια υδάτινη και συνάμα πολική κινητή φάση. ⁽³⁷⁾



Σχήμα 1.4.1. Τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας (Προσαρμογή από <http://en.wikipedia.org/wiki/HPLC>)

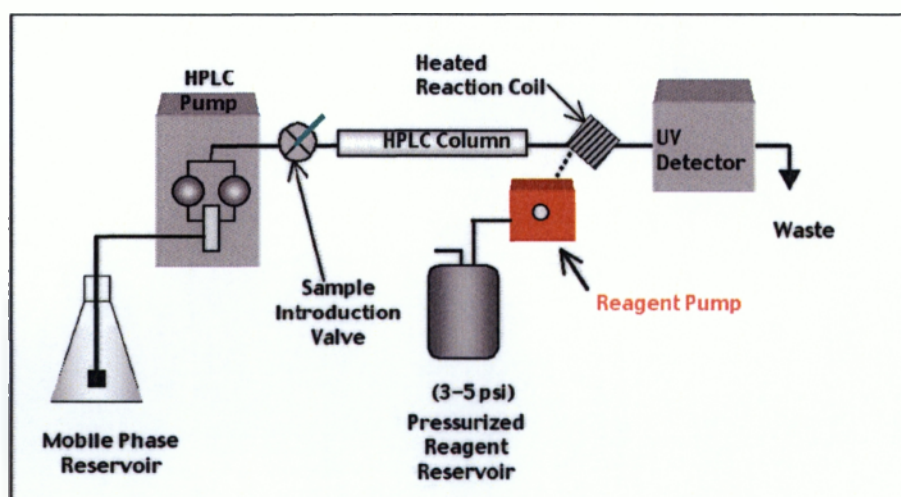
Μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα κάθε εφαρμογής έχει η επιλογή του κατάλληλου κατά περίπτωση, ανιχνευτή που διαφέρει ανάλογα με το είδος των ουσιών που πρόκειται να προσδιορισθούν. Ο πιο συνηθισμένος ανιχνευτής είναι αυτός του υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) που στηρίζεται στην απορρόφηση που εμφανίζει η συγκεκριμένη ουσία σε κάποιο ή κάποια επιλεγμένα μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους – ορατού φωτός.

Στην περίπτωση του προσδιορισμού των αφλατοξινών, καταλληλότερος θεωρείται ο ανιχνευτής φθορισμού (fluorescence detector). Η αρχή της λειτουργίας του ανιχνευτή αυτού στηρίζεται στο γεγονός ότι κάποιες ουσίες, όπως οι αφλατοξίνες, φθορίζουν υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας και αυτός ο φθορισμός μπορεί να μετρηθεί από ένα κατάλληλο φωτοκύτταρο (photo cell). Ο τρόπος λειτουργίας αυτού του ανιχνευτή δίνεται στο Σχήμα 1.4.2.



Σχήμα 1.4.2. Ο ανιχνευτής φθορισμού (Προσαρμογή από [www.chromatography online .org/HPLC/Fluorescence/rs32.html](http://www.chromatography.org/HPLC/Fluorescence/rs32.html))

Για την επίτευξη όμως καλύτερου φθορισμού των αφλατοξινών και κατά συνέπεια καλύτερης ανταπόκρισης του ανιχνευτή, συχνά προηγείται μια εξειδικευμένη διαδικασία που χαρακτηρίζεται σαν “παραγωγοποίηση μετά τη στήλη” (post column derivatization). Η όλη τεχνική αφορά την προσθήκη μιας δεύτερης αντλίας μετά τη στήλη για την προσθήκη κατάλληλων ουσιών που αντιδρούν με τα μόρια των αφλατοξινών με αποτέλεσμα το σχηματισμό παράγωγων ουσιών με αυξημένη δυνατότητα φθορισμού στο υπεριώδες. ⁽³⁷⁾ Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη δίνεται στο Σχήμα 1.4.3.



Σχήμα 1.4.3. Διάταξη των τμημάτων της συσκευής HPLC με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη (Προσαρμογή από <http://en.wikipedia.org/wiki/HPLC>).

1.4.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), αποτελεί σήμερα μέθοδο ρουτίνας για τον εντοπισμό των αφλατοξινών. Εντάσσεται στις ημιποσοτικές μεθόδους και είναι γρήγορη, απλή, αρκετά ευαίσθητη και με σχετικά μικρό κόστος. Αρχικά η TLC χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για την ανίχνευση των αφλατοξινών, ενώ σήμερα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ωχρατοξινών, τριχοθηκινών, ζεαραλενόνης και σιτρινίνης.

Μια στρώση από ένα απορροφητικό υλικό, όπως πήγμα πυριτίου (silica gel), οξείδιο του αλουμινίου (aluminium oxide), ή κυτταρίνη (cellulose) τοποθετείται σε μια γυάλινη, αλουμινένια, ή από ειδικό πλαστικό πλάκα (plate). Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα και επιλέγεται ο κατάλληλος διαλύτης ανάπτυξης. Ο πιο διαδεδομένος διαλύτης ανάπτυξης σε πλάκα TLC, είναι ακετόνη : χλωροφόρμιο 1:9, ο οποίος δίνει τον καλύτερο διαχωρισμό της αφλατοξίνης B1 από τις άλλες. Η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει όταν ο διαλύτης φτάσει στην κορυφή. Οι κηλίδες ανιχνεύονται με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, υπό την επίδραση της οποίας οι αφλατοξίνες φθορίζουν και η ποσότητά τους υπολογίζεται μετά από σύγκριση με αντίστοιχες γνωστής συγκέντρωσης προτύπων αφλατοξινών.

Εκτός από το διαχωρισμό των τεσσάρων κύριων αφλατοξινών, υπάρχει επίσης η δυνατότητα διαχωρισμού με TLC και δευτερογενών αφλατοξινών που είναι μεταβολίτες των τεσσάρων πρώτων, όπως για παράδειγμα ο διαχωρισμός των B1 και G1 από τις B2a και G2a χρησιμοποιώντας τριφλουροξικό οξύ (trifluoroacetic acid, TFA). (5, 23)

1.4.3. Ενζυμο-Ανοσοδιαγνωστική μέθοδος.

Η ενζυμο-ανοσοδιαγνωστική μέθοδος (Enzyme Linked ImmunoSorbent, ELISA) είναι μια βιοχημική μέθοδος ημιποσοτικού προσδιορισμού τοξικών ουσιών που χαρακτηρίζονται σαν αντιγόνα (antigens) και στηρίζεται στη δέσμευσή τους σε εξειδικευμένα κατά περίπτωση αντισώματα (antibodies) και το σχηματισμό συμπλόκων που μπορούν με την επίδραση κατάλληλων αντιδραστηρίων να δώσουν χρωμογόνα παράγωγα μετρήσιμα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στην περιοχή του υπεριώδους – ορατού φωτός.

Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από τα λευκά αιμοσφαίρια στο αίμα των θηλαστικών και χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την ανίχνευση και την εξουδετέρωση ξένων προς τον οργανισμό παραγόντων όπως τα βακτήρια και οι ιοί. Παρ' ότι η γενική δομή τους είναι ίδια, μικροδιαφορές σε ορισμένα σημεία του μορίου τους οδηγούν στο σχηματισμό μεγάλης ποικιλίας αντισωμάτων, εξειδικευμένων να σχηματίζουν σύμπλοκα με έναν εξίσου μεγάλο αριθμό διαφορετικών αντιγόνων. Η σχέση των διαφόρων αντισωμάτων με τα διάφορα αντιγόνα είναι απόλυτα εξειδικευμένη και κάθε αντίσωμα μπορεί να ενωθεί μόνο με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, ακόμα και αν αυτό βρίσκεται ανάμεσα σε εκατομμύρια διαφορετικών μορίων. ⁽³¹⁾

Σε γενικές γραμμές, κατά την εφαρμογή της μεθόδου της ELISA, για τον προσδιορισμό μιας άγνωστης ποσότητας ενός αντιγόνου (για παράδειγμα μια αφλατοξίνη), αυτό αρχικά προσαρμόζεται σε μια επιφάνεια (συνήθως βοθρία μιας πλάκας πολυστυρενίου), στη συνέχεια προστίθεται ένα εξειδικευμένο αντίσωμα, το οποίο είναι ενωμένο με μια πρωτεΐνη και το οποίο ενώνεται με το αντιγόνο. Ακολουθεί προσθήκη εξειδικευμένων αντιδραστηρίων που επιδρώντας στην πρωτεΐνη του αντισώματος τη μετατρέπουν σε ένα χρωμογόνο παράγωγο το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Κατά συνέπεια μπορεί να μετρηθεί και η ποσότητα του συμπλόκου αντιγόνου – αντισώματος και τελικά της ποσότητας του αντιγόνου (αφλατοξίνη).

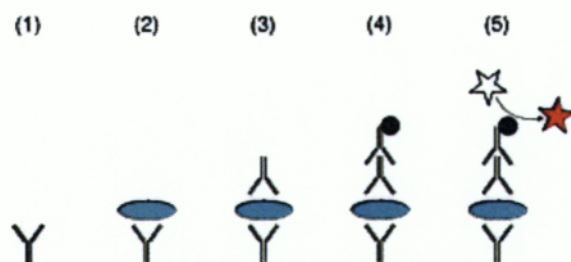
Υπάρχουν τρεις διαφοροποιήσεις της μεθόδου της ELISA. Η Άμεση (Direct ή Sandwich), η Έμμεση (Indirect) και η Ανταγωνιστική (Competitive). Σ' όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιούνται πλάκες πολυστυρενίου με ενσωματωμένα βοθρία στα οποία λαμβάνουν χώρα όλες οι αντιδράσεις.

Στην περίπτωση της Άμεσης ELISA η τεχνική έχει ως εξής:

- Στον πυθμένα του κάθε βοθρίου βρίσκεται τοποθετημένο ένα αντίσωμα, εξειδικευμένο για το προς μελέτη αντιγόνο (π.χ. αφλατοξίνη) που χαρακτηρίζεται σαν “αντίσωμα σύλληψης” (capture antibody).
- Με την προσθήκη του δείγματος (ή προτύπου διαλύματος), όλη η ποσότητα του αντιγόνου που υπάρχει, δεσμεύεται από το αντίσωμα σύλληψης.
- Ακολουθεί προσθήκη ενός άλλου αντισώματος, που χαρακτηρίζεται σαν “αντίσωμα προσδιορισμού” (detecting antibody) και το οποίο ενώνεται με το αντιγόνο.
- Κατόπιν, προστίθεται ένα τρίτο αντίσωμα, γνωστό σαν “σημασμένο με πρωτεΐνη δευτερεύον αντίσωμα” (enzyme-linked secondary antibody) και το οποίο συνενώνεται με το όλο σύμπλοκο των αντισωμάτων και του αντιγόνου.

Η αντίδραση ολοκληρώνεται με την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου το οποίο μετατρέπεται με την επίδραση της πρωτεΐνης του δευτερεύοντος αντισώματος σε ανιχνεύσιμη και φωτομετρικά μετρήσιμη μορφή (αλλαγή χρώματος αντιδραστηρίου).

⁽³¹⁾ Η όλη διαδικασία δίνεται στο Σχήμα 1.4.4.



Σχήμα 1.4.4. :Σχηματική απεικόνιση της Άμεσης ELISA (Προσαρμογή από <http://en-wikipedia.org/wiki/ELISA>).

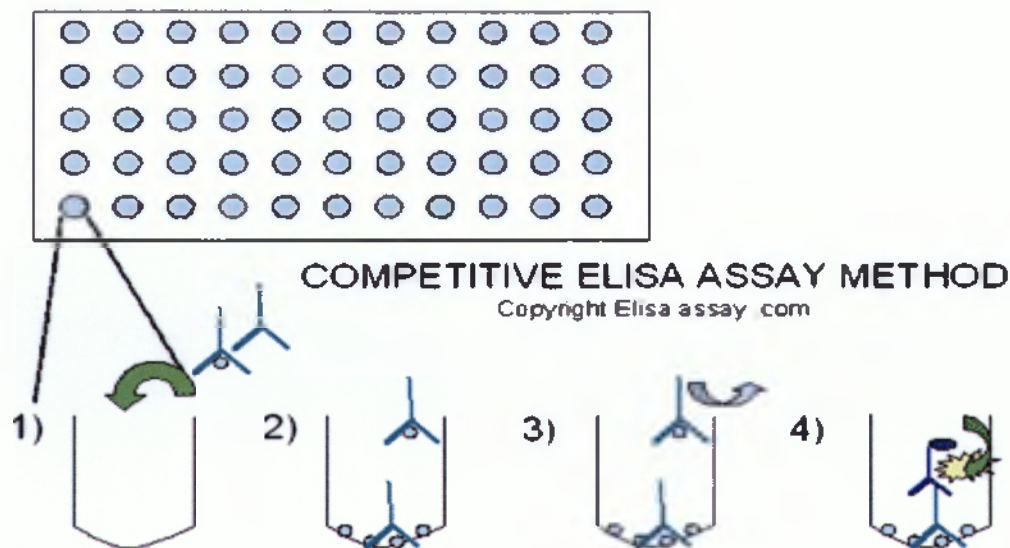
Η τεχνική της Έμμεσης ELISA είναι εξειδικευμένη για τον προσδιορισμό αντιγόνων πρωτεϊνικής φύσης, και σε γενικές γραμμές έχει ως εξής:

- Με την προσθήκη του δείγματος (ή του προτύπου διαλύματος) το προς μελέτη αντιγόνο, σταθεροποιείται στον πυθμένα του βοθρίου συνήθως με απλή προσρόφηση στην πλαστική επιφάνεια.
- Ακολουθεί προσθήκη πυκνού διαλύματος μιας “αδρανούς” πρωτεΐνης συνήθως αλβουμίνης ή καζεΐνης, με σκοπό την παρεμπόδιση (blocking) της απορρόφησης των άλλων μη επιθυμητών προς μέτρηση πρωτεϊνών στον πυθμένα του βοθρίου.
- Τα βοθρία ξεπλένονται και προστίθεται ένα εξειδικευμένο “αντίσωμα προσδιορισμού” (detecting antibody), το οποίο θα ενωθεί μόνο με το σταθεροποιημένο στον πυθμένα του βοθρίου αντιγόνο και όχι με άλλες πρωτεΐνες που πιθανά υπάρχουν.
- Ακολουθεί πλύσιμο των βοθρίων και προσθήκη του κατάλληλου αντιδραστηρίου για το σχηματισμό ενός χρωμογόνου προϊόντος, του οποίου η ένταση του χρωματισμού μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά.

Στην περίπτωση της Ανταγωνιστικής ELISA, η τεχνική έχει ως εξής:

- Πριν την τοποθέτηση του δείγματος (ή του προτύπου διαλύματος) στα βοθρία, το προς μελέτη αντιγόνο, επωάζεται μαζί με ένα “αντίσωμα προσδιορισμού” (detecting antibody).
- Το σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου που δημιουργείται, προστίθεται στη συνέχεια σε άλλα βοθρία που περιέχουν στον πυθμένα τους ένα εξειδικευμένο “αντίσωμα σύλληψης” (capture antibody).
- Τα βοθρία ξεπλένονται, έτσι ώστε όσα αδέσμευτα αντισώματα υπάρχουν να απομακρυνθούν. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα των αντιγόνων στο δείγμα, τόσο το λιγότερο το αντίσωμα θα είναι σε θέση να δεσμεύσει το αντιγόνο καλά, εξ ου και ο όρος “ανταγωνισμός”.
- Ένα αντίσωμα, γνωστό σαν “σημασμένο με πρωτεΐνη δευτερεύον αντίσωμα” (enzyme-linked secondary antibody), προστίθεται στα βοθρία.
- Η αντίδραση ολοκληρώνεται με την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου για το σχηματισμό ενός χρωμογόνου προϊόντος, του οποίου η ένταση του χρωματισμού μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά.

Να σημειωθεί ότι σε ορισμένους τύπους της ανταγωνιστικής ELISA, το “σημασμένο με πρωτεΐνη δευτερεύον αντίσωμα” αντικαθίσταται από ένα “σημασμένο με πρωτεΐνη δευτερεύον αντιγόνο” (enzyme-linked secondary antigene). Τα αντιγόνα αυτά, ανταγωνίζονται για τις θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων προσδιορισμού με τα αντιγόνα του προς ανάλυση δείγματος. Έτσι, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των αντιγόνων στο δείγμα, τόσο ασθενέστερη είναι η αλλαγή του χρώματος των αντιδραστηρίων εντός των βοθρίων. Αυτό συμβαίνει επειδή οι θέσεις σύνδεσης του αντισώματος προσδιορισμού, καταλαμβάνονται από το περιεχόμενο στο δείγμα αντιγόνο και έτσι δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός του χρωμογόνου συμπλόκου. ⁽³¹⁾ Η όλη διαδικασία δίνεται στο Σχήμα 1.4.5.



Σχήμα 1.4.5. Σχηματική απεικόνιση της “Ανταγωνιστικής ELISA” (Προσαρμογή από <http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>).

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

2. Σκοπός αυτής της μελέτης.

Στην σημερινή εποχή που ομάδες ειδικών κτηνιάτρων, παθολόγων, μικροβιολόγων, χημικών, βιοχημικών κ.α προσπαθούν να διαπιστώσουν τα αιτία της αρρώστιας που ονομάζεται αφλατοξίκωση προσπαθήσαμε και εμείς να δώσουμε στον επιστημονικό κόσμο κάποια χρήσιμα συμπεράσματα για τα επίπεδα αφλατοξίνης που μπορεί να παρουσιάζονται μέσα στα ξηρά σύκα.

Σε πολλές περιπτώσεις τα σύκα έχουν βρεθεί θετικά σε παρουσία αφλατοξίνης ακόμα και παραπάνω από τα επιτρεπτά όρια.

Σκοπός δηλαδή, της μελέτης αυτής, ήταν η προσαρμογή της μεθόδου ELISA για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών στην περίπτωση των ξηρών σύκων καθώς επίσης και η συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της θρεπτικής κατάστασης των ξηρών σύκων με τα επίπεδα αφλατοξίνης μέσα σε αυτά.

3. Υλικά και μέθοδοι.

3.1. Συγκομιδή και ξήρανση των ξηρών σύκων.

Από πειραματικό αγρό της κοινότητας Νεοχωρίου του Ν. Μεσσηνίας με συκόδεντρα ποικιλίας 'Καλαμών' από 72 δέντρα συγκομισθήκαν τα καλύτερα, από πλευράς εμπορικότητας σύκα.

Η συγκομιδή των σύκων πραγματοποιήθηκε σε δυο (2) χέρια, και σε ημερομηνίες κατά τις οποίες τα σύκα βρίσκονταν στο στάδιο εμπορικής ωριμότητας. Η πρώτη συγκομιδή έγινε στις 20-8-2009 και συλλέχθηκαν μόνο τα ώριμα σύκα που ήταν πεσμένα κάτω από τα δένδρα και σύμφωνα με την επικρατούσα τεχνική για την περιοχή της Μεσσηνίας. Η δεύτερη συγκομιδή πραγματοποιήθηκε στις 29-8-2009 και αφορούσε ώριμα σύκα εξ ίσου από το έδαφος και πάνω από τα δένδρα.

Η πρώτη συγκομιδή ήταν η καλύτερη από πλευράς ποσότητας και ποιότητας των σύκων. Στη δεύτερη τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα ήταν μειωμένη αλλά πάντα σε εμπορικά αποδεκτά επίπεδα. Τα σύκα μεταφέρονταν αυθημερόν στο εργαστήριο και τοποθετήθηκαν σε ξύλινα τελάρα και στην συνέχεια σε ξηραντήριο ξηρής θερμότητας τύπου Labware KE 120 AS. Τα σύκα των υποδειγμάτων τοποθετούνταν σε αλουμινένια ταψάκια και παρέμεναν στο θάλαμο ξηρής θερμότητας στους 60 °C για 5 έως 8 h και μετά την ολοκλήρωση της ξήραυσής τους τοποθετούνταν σε χαρτοσακούλες.

Μετά τη ξήραυσή τους τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας για απεντόμωση με φωσφίνη σε ειδικούς κλιβάνους.

3.2. Μέτρηση της αφλατοξίνης B₁ με τη μέθοδο ELISA.

Για την εκχύλιση της αφλατοξίνης B₁ από τα ξηρά σύκα, εφαρμόστηκε η προσαρμοσμένη μέθοδος του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.

Συγκεκριμένα:

- Ζυγίζονταν 30 gr ξηρών σύκων.
- Προστίθεντο 150 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 70 % - 30 % απεσταγμένο νερό.
- Ακολουθούσε ομογενοποίηση του μείγματος σε ομογενοποιητή τύπου Multi Warring Commercial για 1 min., διήθηση μέσω φίλτρου Whatman N ° 40 και παραλαβή του διηθήματος σε γυάλινη κωνική φιάλη των 100 ml.
- Ποσότητα περίπου 1,5 ml από το διήθημα τοποθετείτε σε ependorph. και αποθηκεύονται σε καταψύκτη τύπου Sanyo MDF-U331 στους -20 °C για διάστημα όχι περισσότερο από 48 h, μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής του.

Για τη μέτρηση της αφλατοξίνης B₁ χρησιμοποιήθηκε το Cat.No.:AB1-E01 της εταιρείας “Immunolab GmbH ” σύμφωνα με τη συνιστώμενη διαδικασία η οποία είχε ως εξής:

- Αρχικά, όλα τα αντιδραστήρια έρχονταν σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 °C) από τους 8 °C όπου ήταν αποθηκευμένο το Kit και ανακινούνταν καλά.
- Ο επιθυμητός αριθμός βοθρίων (wells) τοποθετείτε στην κατάλληλη πλάκα συγκράτησης (plate).
- Ανάλογα με τον αριθμό των προς μέτρηση δειγμάτων, κατάλληλες ποσότητες από το πυκνό “ρυθμιστικό διάλυμα ξεπλύματος” (rinsing buffer) αραιώνονταν με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:10.
- Για την παρασκευή των “προτύπων διαλυμάτων” (standard solutions), γνωστής συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα του Kit που περιέχει aflatoxin B₁ συγκεντρώσεις 0, 10, 40, 100, 400, 1000 pg/ml. με την διαδικασία της αραιώσης 1:10

Για τη μέτρηση της αφλατοξίνης B₁

- 100 μl από τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα τοποθετούνται στα βοθρία της πλάκας συγκράτησης.
- Ακολουθούσε προσθήκη 50 μl από τα αντισώματα της αφλατοξίνης B₁ (antibody solution) σε κάθε βοθρίο, η πλάκα καλύπτετο με πλαστικό κάλυμμα και ανακινείτο για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα τύπου Gallenkamp της εταιρίας CFC FREE.
- Το περιεχόμενο των βοθρίων απερρίπτετο και τα βοθρία ξεπλένονταν 3 φορές με 300 μl. αραιωμένου υδατικό διάλυμα ξεπλύματος.
- Στα βοθρία προστίθεντο 100 μl. διάλυμα σύζευξης (conjugate), η πλάκα καλύπτετο με πλαστικό κάλυμμα και ακολουθούσε ανάδευση για 60 min.
- Το περιεχόμενο των βοθρίων απερρίπτετο εκ' νέου και ξεπλένονταν 3 φορές με τον ίδιο τρόπο όπως παραπάνω.
- Ακολουθούσε προσθήκη σε κάθε βοθρίο 100 μl. διαλύματος υποστρώματος (substrate).
- Η πλάκα συγκράτησης τοποθετείτο στο σκοτάδι για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούσε σε κάθε βοθρίο προσθήκη 100 ml. διαλύματος τερματισμού (stop solution).

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B₁ γινόταν στα 450 nm με κατάλληλο φωτόμετρο σύστημα τύπου ASYS Hitech Expert Plus Biochrom.

3.3. Μέτρηση των θρεπτικών στοιχείων στα ξηρά σύκα.

Για τη μέτρηση των θρεπτικών στοιχείων, ποσότητα ξηρών σύκων περίπου 40 g τοποθετούνται σε χάρτινες σακούλες και ξηραίνονται σε ξηραντήριο τύπου punve FN500 με ρεύμα αέρα σε θερμοκρασία 65° C – 67° C για 48 ώρες ή μέχρι σταθεροποίησης του ξηρού βάρους. Επειδή τα σύκα έχουν στο εσωτερικό τους την κολλώδη ουσία, η σταθεροποίηση του ξηρού βάρους άργησε να ολοκληρωθεί με αποτέλεσμα τα σύκα να παραμείνουν στο ξηραντήριο για περισσότερες από τρεις (3) ημέρες.

Στην συνέχεια τα 40 g. των σύκων κόβονται σε μικρά κομμάτια με ένα ειδικό ψαλίδι κ τοποθετούνται σε ειδικό μύλο, ώστε ο χώρος άλεσης να είναι από ανοξειδωτο υλικό. Επειδή ενδιαφερόμασταν και για ιχνοστοιχεία Fe και Ca, χρησιμοποιήσαμε πλαστικά δοχεία, αποφεύγοντας έτσι τις τυχόν μολύνσεις των δειγμάτων με βαρέα μέταλλα που προέρχονται από τα δοχεία άλεσης.

Να σημειωθεί ότι μια άλεση λεπτή και ομαλή είναι μια συνθήκη απαραίτητη, ίσως και η κυριότερη για να επιτύχει κάνεις αποτελέσματα ικανοποιητικά επαναλήψιμα.

Στο τέλος τα δείγματα τοποθετούνται μέσα σε πλαστικά δοχεία και φυλάσσονται σε δροσερό μέρος για να ακολουθήσουν οι μετρήσεις του κάθε στοιχείου ξεχωριστά.

Για την αποτέφρωση των δειγμάτων (ξηρή καύση)

1. Ζυγίζονται 1g. από τα αλεσμένα σύκα και τοποθετούνται σε χωνευτήρες από πορσελάνη για την ξηρή καύση σε φούρνο υψηλής θερμοκρασίας.
2. Οι χωνευτήρες σκεπάζονται με τα καπάκια και τοποθετούνται στο φούρνο αποτέφρωσης τύπου punve MF120.
3. Προσθέτουμε 1 – 2 ml νερό και 3 -4 ml διαλύματος HCL 1:1 κατ'ογκο.
4. Καλύπτουμε το χωνευτήρι με ωρολογίου και τοποθετούμε σε ατμόλουτρο για 15 min. Όταν το περιεχόμενο των χωνευτήρων αρχίσει να βράζει λίγο, τις απομακρύνουμε από την πλάκα.
5. Διηθούμε με ηθμό στις ίδιες ογκομετρικές φιάλες ξεπλένοντας καλά τις κάψες με απεσταγμένο νερό. Συμπληρώνουμε τις ογκομετρικές φιάλες μέχρι 50 ml. με απεσταγμένο νερό.

Αφού έχουμε προετοιμάσει τα δείγματα μας στην υγρή τους μορφή και τα έχουμε τοποθετήσει σε μπουκαλάκια των 50 ml., ακολουθούν οι μετρήσεις των θρεπτικών στοιχείων με διαφορές μεθόδους.

Ο φώσφορος (P) και το βόριο (B) προσδιορίστηκαν φωτομετρικά με την προσαρμοσμένη μέθοδο του Αγροτικού Ινστιτούτου Καλαμάτας.

Το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) και το μαγγάνιο (Mn) μετρήθηκαν στην ατομική απορρόφηση μονοχρωματικής δέσμης φωτός από ατμούς ατόμων με την προσαρμοσμένη μέθοδο του εργαστηρίου Εδαφολογίας του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.

4. Αποτελέσματα – Συζήτηση.

Από τα αποτελέσματα προέκυψαν σημαντικά στοιχεία για:

- την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε μακροστοιχεία (P, K, Ca, Mg,) και ιχνοστοιχεία (Fe, Mn, Zn, Cu, B),
- την παρουσία και τη συγκέντρωση της, κύριας και περισσότερο τοξικής, αφλατοξίνης B1, και
- τη σχέση που υπάρχει μεταξύ των θρεπτικών στοιχείων στα ξηρά σύκα και της παρουσία της αφλατοξίνης B1.

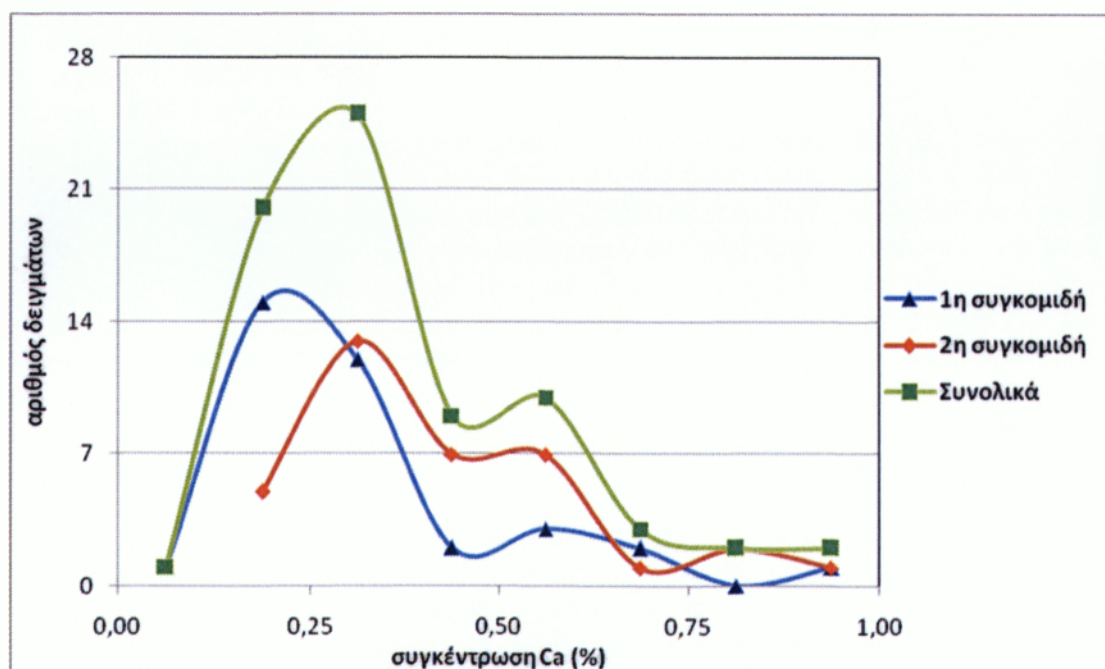
4.1. Περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε θρεπτικά στοιχεία.

Από την επεξεργασία των μετρήσεων προέκυψαν σημαντικές πληροφορίες για το επίπεδο και τη διακύμανση της συγκέντρωσης των θρεπτικών στοιχείων στα ξηρά σύκα αλλά και ενδιαφέρουσες διαφορές μεταξύ της 1^η και της 2^η συγκομιδής. Για την καλύτερη προσέγγιση της κατανομής της συγκέντρωσης των θρεπτικών στοιχείων έγινε ταξινόμηση των μετρήσεων σε οκτώ επίπεδα. Η κατανομή αυτή έγινε τόσο για το σύνολο των μετρήσεων όσο και χωριστά για την 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

Για τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων εφαρμόστηκε η μέθοδος Dunkan με επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

4.1.1. Ασβέστιο.

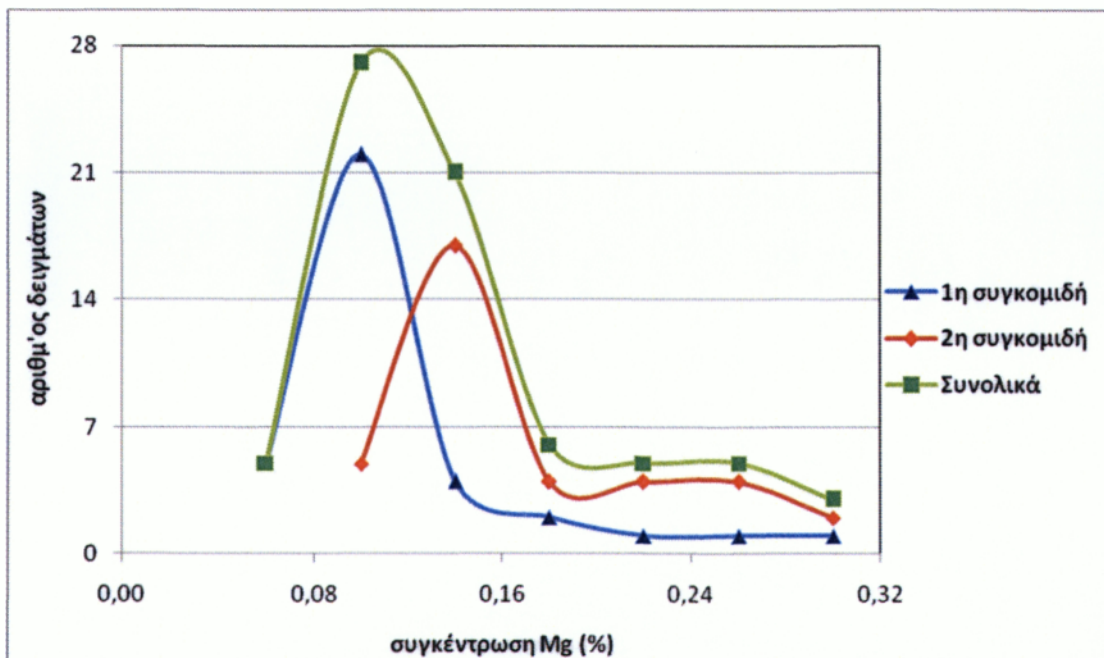
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Ca κυμάνθηκε σε παρόμοιο εύρος τιμών και στις δύο συγκομιδές και συγκεκριμένα από 0,12 έως 0,88 % στην 1^η και από 0,16 έως 0,91 % στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 0,33 και 0,42 % αντίστοιχα και με βάση τη δοκιμή Dunkan εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.1., απ' όπου προκύπτει ότι το 75% των μετρήσεων βρίσκεται στην περιοχή από 0,125 έως 0,375 % για την 1^η συγκομιδή και στην περιοχή από 0,250 έως 0,625 % για τη 2^η συγκομιδή. Φαίνεται δηλαδή να υπάρχει μια μετατόπιση της συγκέντρωσης του Ca προς ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής. Στο συνολικό αριθμό των δειγμάτων, περίπου το 89 % των τιμών της συγκέντρωσης του Ca βρίσκεται στην περιοχή από 0,250 έως 0,625 %.



Διάγραμμα 4.1. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Ca.

4.1.2. Μαγνήσιο.

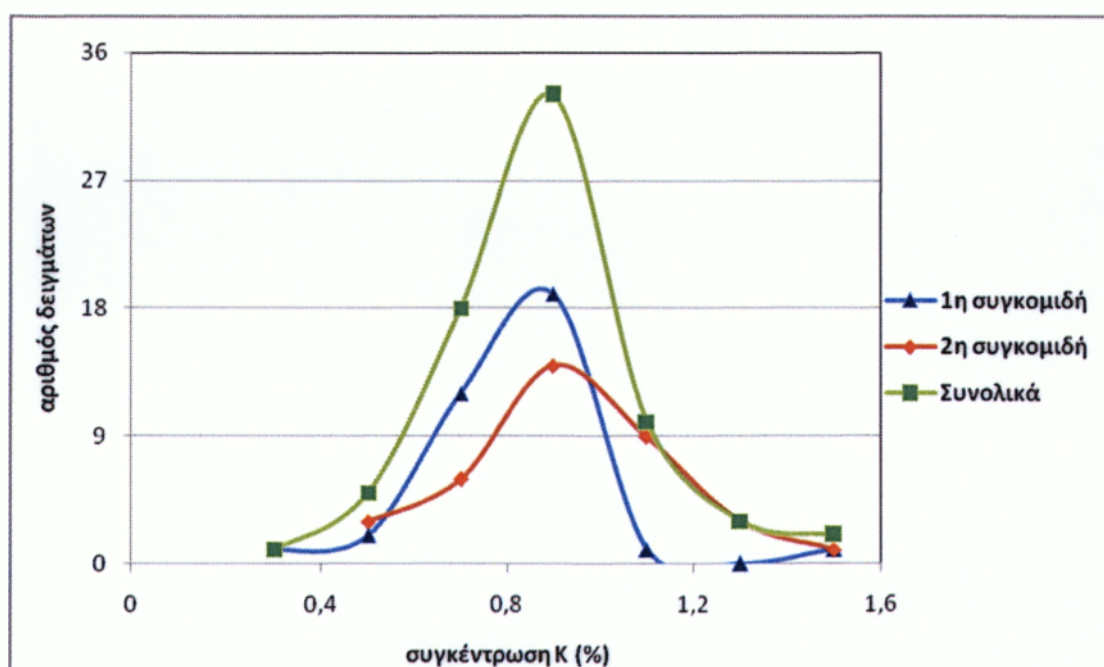
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Mg κυμάνθηκε σε από 0,05 έως 0,31 % στην 1^η και από 0,09 έως 0,30 % στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 0,12 και 0,17 % αντίστοιχα που με βάση τη δοκιμή Dunkan εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.2., απ' όπου προκύπτει ότι το 86 % των μετρήσεων βρίσκεται στην περιοχή από 0,04 έως 0,12 % για την 1^η συγκομιδή και το 72 % στην περιοχή από 0,08 έως 0,16 % για τη 2^η συγκομιδή. Φαίνεται δηλαδή να υπάρχει μια μετατόπιση της συγκέντρωσης του Mg σε σαφώς υψηλότερες τιμές στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής συγκριτικά με την 1^η. Στο συνολικό αριθμό των δειγμάτων, περίπου το 67 % των τιμών της συγκέντρωσης του Mg βρίσκεται στην περιοχή από 0,08 έως 0,16 %.



Διάγραμμα 4.2. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Mg.

4.1.3. Κάλιο.

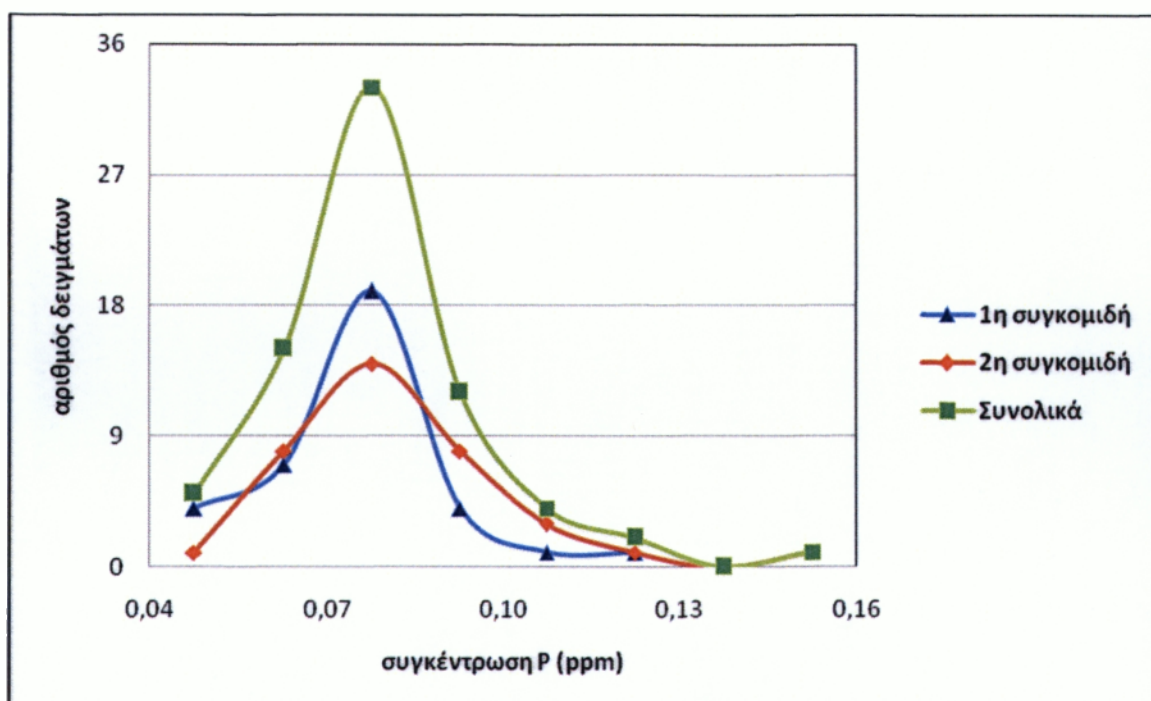
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Κ κυμάνθηκε σε από 0,32 έως 1,59 % στην 1^η και από 0,43 έως 1,45 % στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 0,81 και 0,93 % αντίστοιχα που με βάση τη δοκιμή Dunckan εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.3., απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 86 % των μετρήσεων, βρίσκεται στην περιοχή από 0,6 έως 1,0 % για την 1^η συγκομιδή και περίπου το 64 % στην περιοχή από 0,8 έως 1,2 % για τη 2^η συγκομιδή. Φαίνεται δηλαδή να υπάρχει μια μικρή μετατόπιση της συγκέντρωσης του Κ σε ελαφρώς υψηλότερες τιμές στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής συγκριτικά με την 1^η. Στο συνολικό αριθμό των δειγμάτων, περίπου το 85 % των τιμών της συγκέντρωσης του Κ βρίσκεται στην περιοχή από 0,6 έως 1,2 %.



Διάγραμμα 4.3. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Κ.

4.1.4. Φώσφορος.

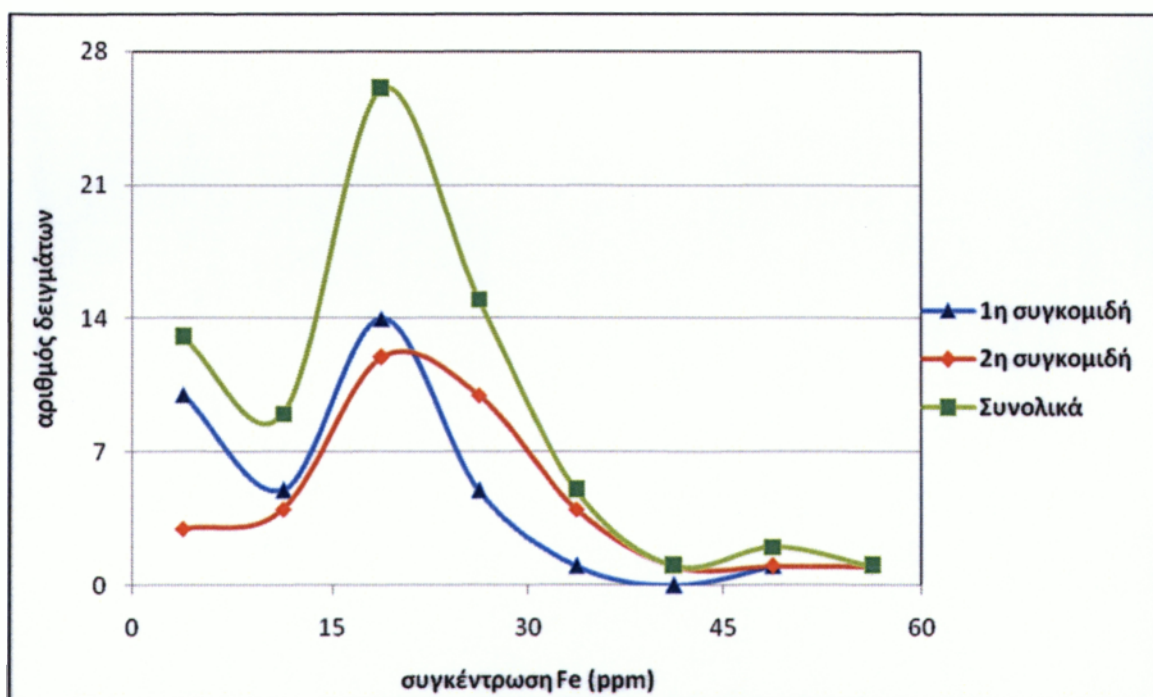
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε P κυμάνθηκε σε από 0,043 έως 0,120 % στην 1^η και από 0,043 έως 0,152 % στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 0,075 και 0,082 % αντίστοιχα που με βάση τη στατιστική δοκιμή Dunckan δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.4. απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 83 % των μετρήσεων βρίσκεται στην περιοχή από 0,055 έως 0,100 % τόσο για την 1^η όσο και για τη 2^η συγκομιδή. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται και περίπου το 92 % του συνόλου των τιμών της συγκέντρωσης του P.



Διάγραμμα 4.4. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του P.

4.1.5. Σίδηρος.

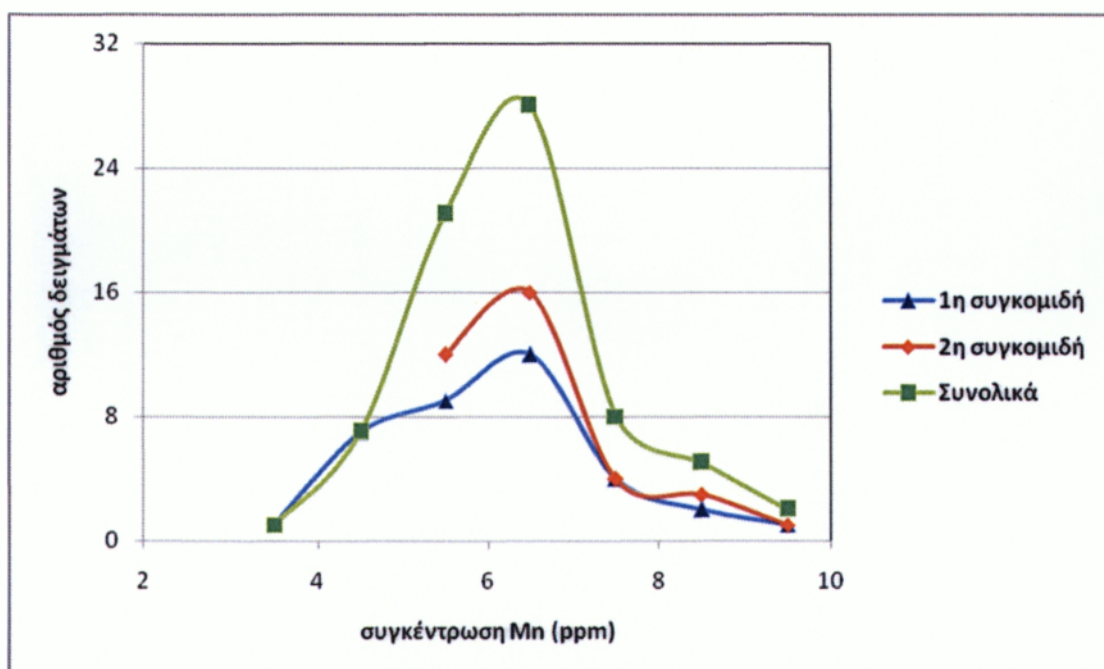
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Fe κυμάνθηκε σε από 1,25 έως 45,15 ppm στην 1^η και από 3,15 έως 51,10 ppm στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 15,83 και 22,37 ppm αντίστοιχα που με βάση τη δοκιμή Dunkan εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.5. απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 67 % των μετρήσεων για την 1^η και το 72 % για τη 2^η συγκομιδή βρίσκεται στην περιοχή από 7,50 έως 30,00 ppm. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται και περίπου το 70 % του συνόλου των τιμών της συγκέντρωσης του Fe. Σ' ένα σχετικά μεγάλο αριθμό δειγμάτων, περίπου 18 % του συνόλου και κυρίως στην 1^η συγκομιδή, παρατηρήθηκαν συγκεντρώσεις Fe μικρότερες από 7,5 ppm.



Διάγραμμα 4.5. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Fe.

4.1.6. Μαγγάνιο.

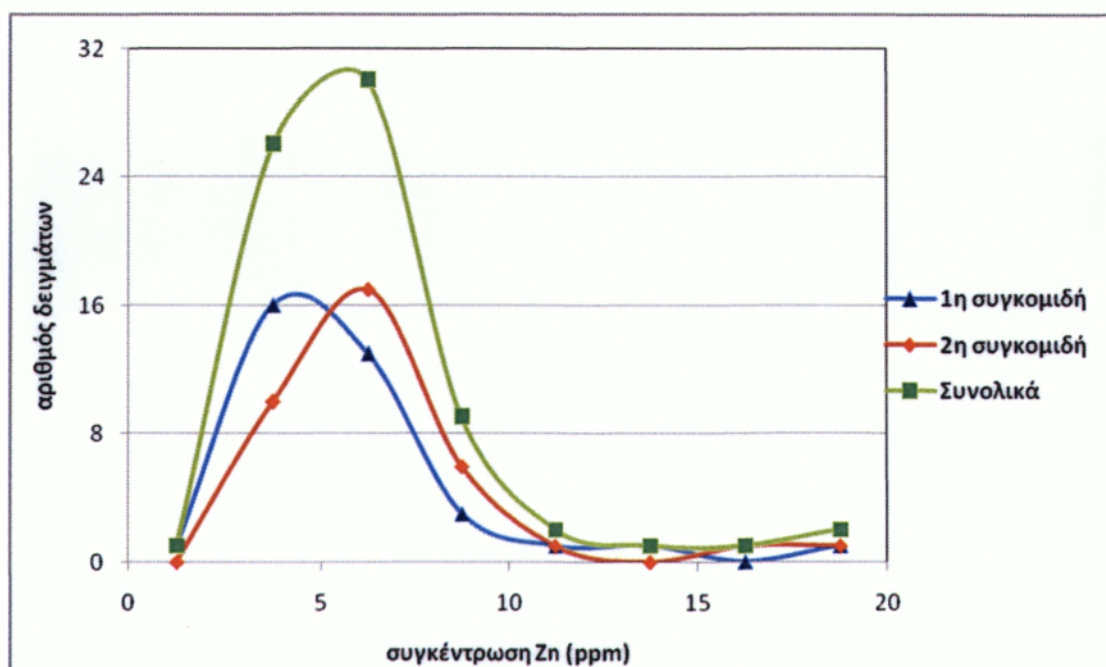
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Mn κυμάνθηκε σε από 3,85 έως 9,90 ppm στην 1^η και από 5,10 έως 9,50 ppm στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 6,08 και 6,55 ppm αντίστοιχα που με βάση τη στατιστική δοκιμή Duncan δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.6., απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 78 % των μετρήσεων βρίσκεται στην περιοχή από 4,00 έως 7,00 ppm και από 5,00 έως 7,00 ppm για την 1^η και για τη 2^η συγκομιδή αντίστοιχα. Φαίνεται δηλαδή να υπάρχει μια μικρή μετατόπιση της συγκέντρωσης του Mn σε ελαφρώς υψηλότερες τιμές στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής συγκριτικά με την 1^η. Στο συνολικό αριθμό των δειγμάτων, περίπου το 89 % των τιμών της συγκέντρωσης του Mn βρίσκεται στην περιοχή από 4,00 έως 8,00 ppm.



Διάγραμμα 4.6. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Mn.

4.1.7. Ψευδάργυρος.

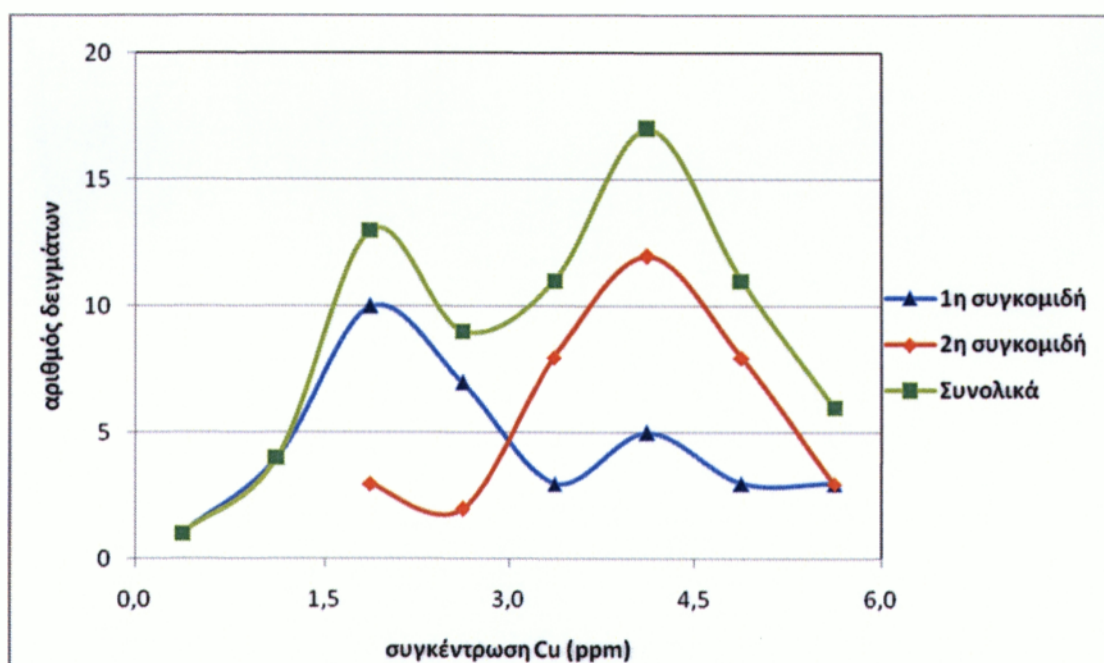
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Zn κυμάνθηκε σε από 2,15 έως 17,55 ppm στην 1^η και από 3,05 έως 19,80 ppm στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 6,04 και 6,78 ppm αντίστοιχα που με βάση τη στατιστική δοκιμή Dunnett δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.7., απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 80 % των μετρήσεων για την 1^η και το 75 % για τη 2^η συγκομιδή βρίσκεται στην περιοχή από 2,5 έως 7,5 ppm αλλά φαίνεται να υπάρχει μια μικρή μετατόπιση προς ελαφρώς υψηλότερες τιμές στη 2^η συγκομιδή. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται και περίπου το 77 % του συνόλου των τιμών της συγκέντρωσης του Zn.



Διάγραμμα 4.7. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Zn.

4.1.8. Χαλκός.

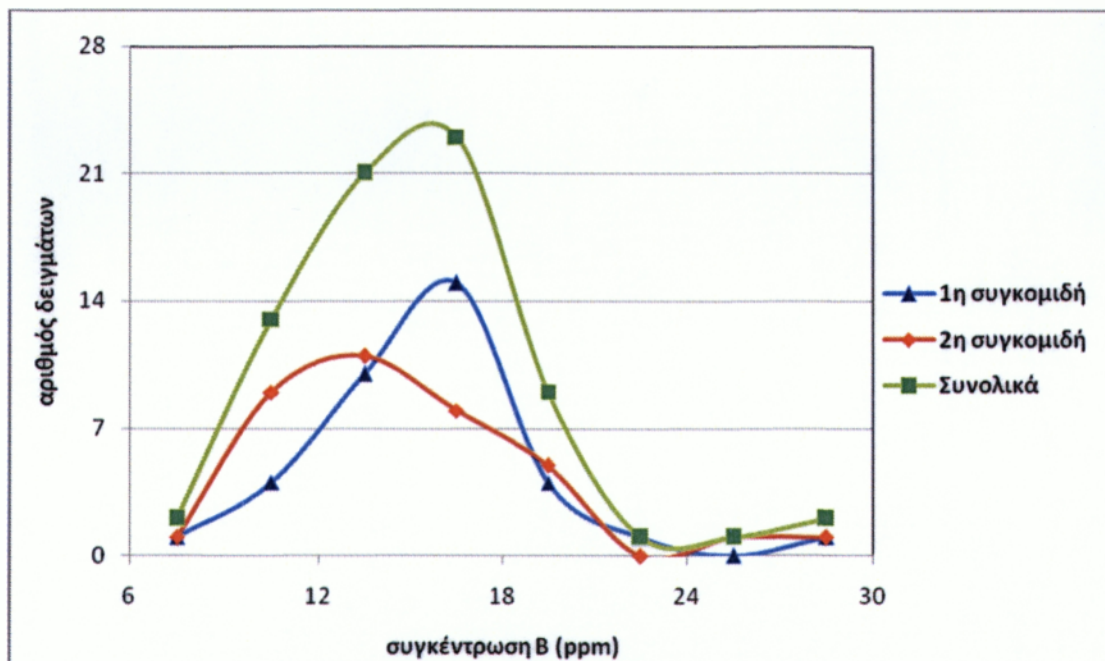
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Cu κυμάνθηκε σε από 0,75 έως 5,55 ppm στην 1^η και από 1,60 έως 5,90 ppm στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 2,95 και 4,03 ppm αντίστοιχα που με βάση τη δοκιμή Dunkan εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.8., απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 58 % των μετρήσεων βρίσκεται στην περιοχή από 0,75 έως 3,00 % για την 1^η συγκομιδή και το 78 % στην περιοχή από 3,00 έως 5,25 % για τη 2^η συγκομιδή. Υπάρχει δηλαδή μια σαφής μετατόπιση της συγκέντρωσης του Cu σε σαφώς υψηλότερες τιμές στην περίπτωση της 2^{ης} συγκριτικά με την 1^η συγκομιδή. Στο συνολικό αριθμό των δειγμάτων παρατηρείται μια αυξημένη κατανομή τους γύρω από δύο μέγιστα στην περιοχή των 2,00 και 4,00 ppm που ουσιαστικά αντιπροσωπεύουν τα μέγιστα της 1^{ης} και της 2^{ης} συγκομιδής αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.8. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Cu.

4.1.9. Βόριο.

Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Β κυμάνθηκε σε από 7,53 έως 27,38 ppm στην 1^η και από 8,55 έως 27,79 ppm στη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι ήταν 15,55 και 15,02 ppm αντίστοιχα που με βάση τη στατιστική δοκιμή Dunckan δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.9., απ' όπου προκύπτει ότι περίπου το 92 % των μετρήσεων τόσο για την 1^η όσο και για τη 2^η συγκομιδή βρίσκεται στην περιοχή από 9,00 έως 21,00 ppm αλλά φαίνεται να υπάρχει μια μικρή μετατόπιση προς ελαφρώς χαμηλότερες τιμές στη 2^η συγκομιδή. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται και περίπου το 92 % του συνόλου των τιμών της συγκέντρωσης του Β.



Διάγραμμα 4.9. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση τη συγκέντρωση του Β.

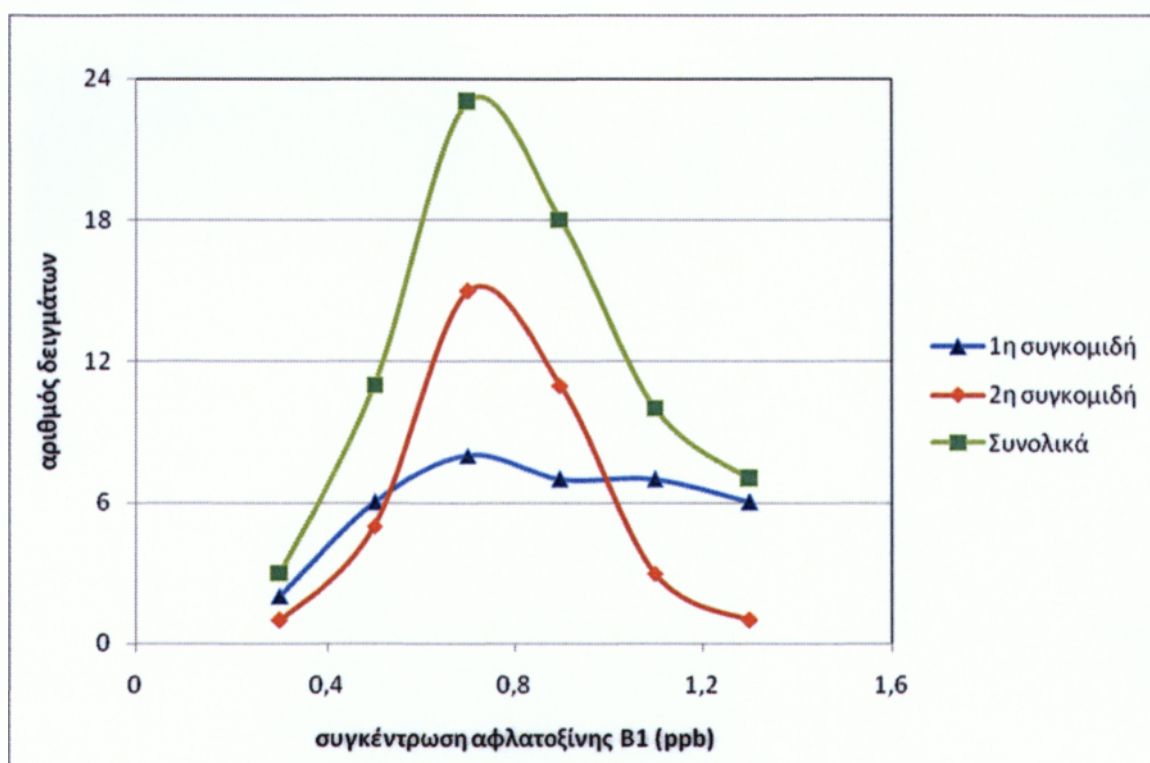
Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των θρεπτικών στοιχείων στους καρπούς των ξηρών σύκων δίδονται συνοπτικά στο πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Συγκεντρωτικός πίνακας του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης της συγκέντρωσης των θρεπτικών στοιχείων στα ξηρά σύκα.

συγκομιδή	1 ^η συγκομιδή	2 ^η συγκομιδή	συνολικά
στοιχείο			
Ca (%)	0,329 ± 0,177	0,423 ± 0,176	0,376 ± 0,182
Mg (%)	0,117 ± 0,053	0,169 ± 0,056	0,143 ± 0,060
K (%)	0,806 ± 0,192	0,926 ± 0,230	0,866 ± 0,219
P (%)	0,0751 ± 0,0156	0,0824 ± 0,0189	0,0787 ± 0,0176
Fe (ppm)	15,83 ± 9,72	22,37 ± 10,54	19,10 ± 10,59
Mn (ppm)	6,08 ± 1,32	6,55 ± 1,09	6,31 ± 1,22
Zn (ppm)	6,04 ± 2,88	6,78 ± 3,24	6,41 ± 3,06
Cu (ppm)	2,95 ± 1,38	4,03 ± 1,02	3,49 ± 1,32
B (ppm)	15,55 ± 3,60	15,02 ± 4,19	15,28 ± 3,89

4.2. Περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε αφλατοξίνη B1.

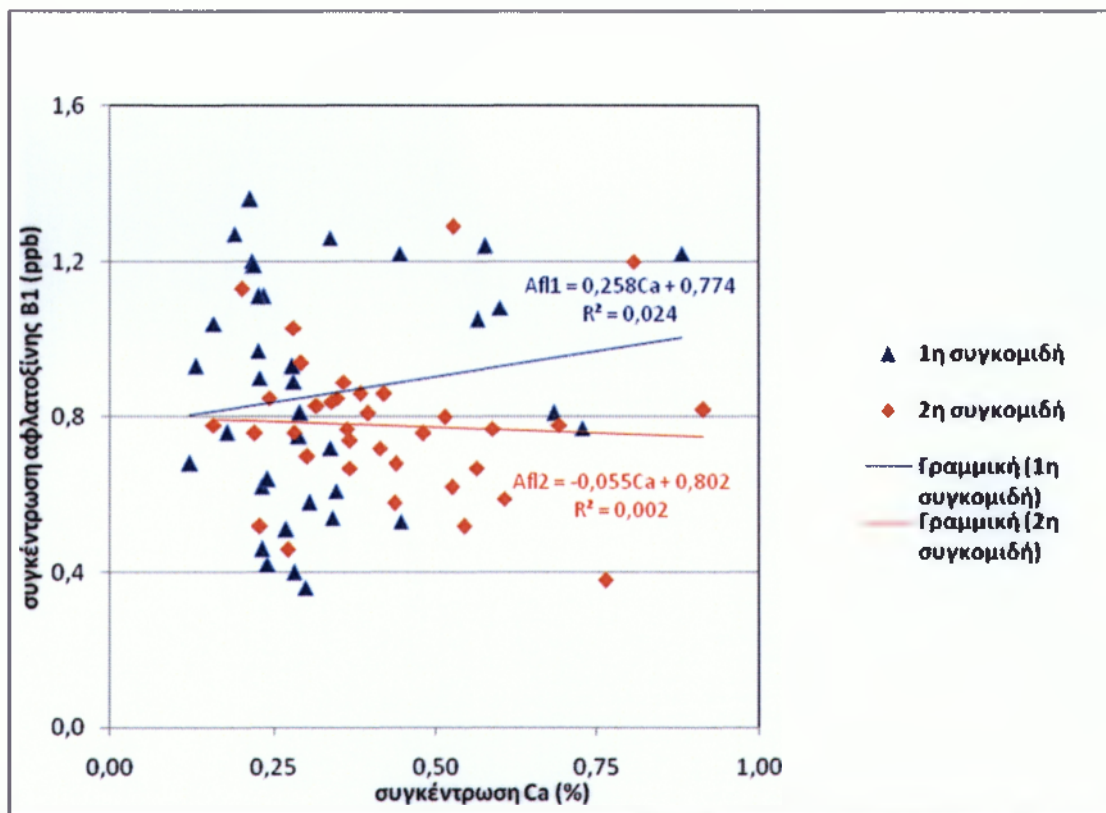
Η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε αφλατοξίνη B1 κυμάνθηκε σε παρόμοιο εύρος τιμών και στις δύο συγκομιδές και συγκεκριμένα από 0,36 έως 1,36 ppb για την 1^η και από 0,38 έως 1,29 ppb για τη 2^η συγκομιδή. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις ήταν $0,859 \pm 0,291$ για την 1^η, $0,779 \pm 0,188$ για τη 2^η συγκομιδή και $0,819 \pm 0,246$ ppb για το σύνολο των δειγμάτων που με βάση τη στατιστική δοκιμή Dunkan δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η κατανομή των μετρήσεων δίδεται στο διάγραμμα 4.10. απ' όπου προκύπτει ότι στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής περισσότερο από 94 % των μετρήσεων κατανέμεται σχεδόν ομοιόμορφα στην περιοχή από 0,40 έως 1,40 ppb ενώ στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής περισσότερο από 77 % των μετρήσεων συγκεντρώνεται στην περιοχή από 0,60 έως 1,00 ppb. Αποτέλεσμα της ομοιόμορφης κατανομής των μετρήσεων στην 1^η συγκομιδή είναι, το σύνολο των μετρήσεων να εμφανίζει μια κατανομή παρόμοια με αυτή της 2^{ης} συγκομιδής με περίπου το 57 % των μετρήσεων να συγκεντρώνεται στην περιοχή από 0,60 έως 1,00 ppb.



Διάγραμμα 4.10. Κατανομή των δειγμάτων ξηρών σύκων της 1^{ης}, 2^{ης} αλλά και του συνόλου της συγκομιδής με βάση την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνη B1.

4.2.1. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Ca.

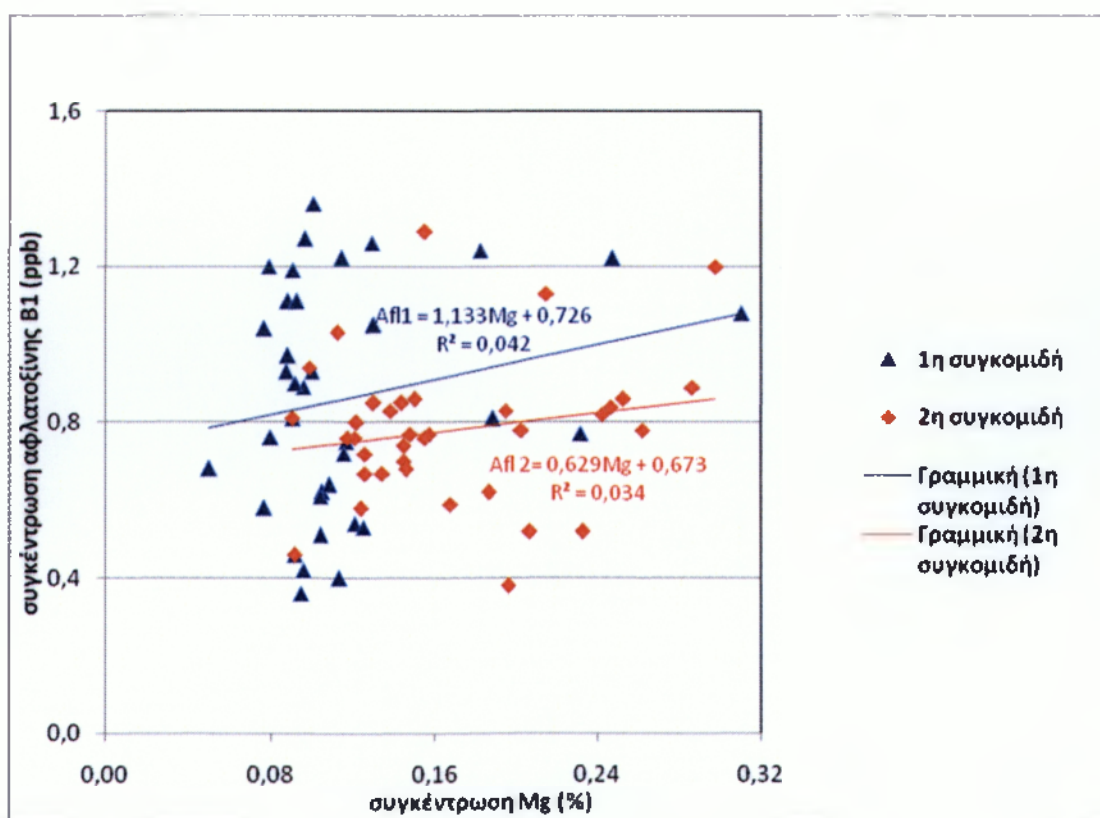
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Ca στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.1. Η γραμμή τάσης (Afl1(Ca)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής είναι σ' όλες τις περιπτώσεις σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 2^{ης} συγκομιδής (Afl2(Ca)). Ταυτόχρονα, στην 1^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του Ca ενώ στην περίπτωση της 2^{ης} φαίνεται να μην επηρεάζεται.



Διάγραμμα 4.2.1 Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Ca στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.2. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Mg.

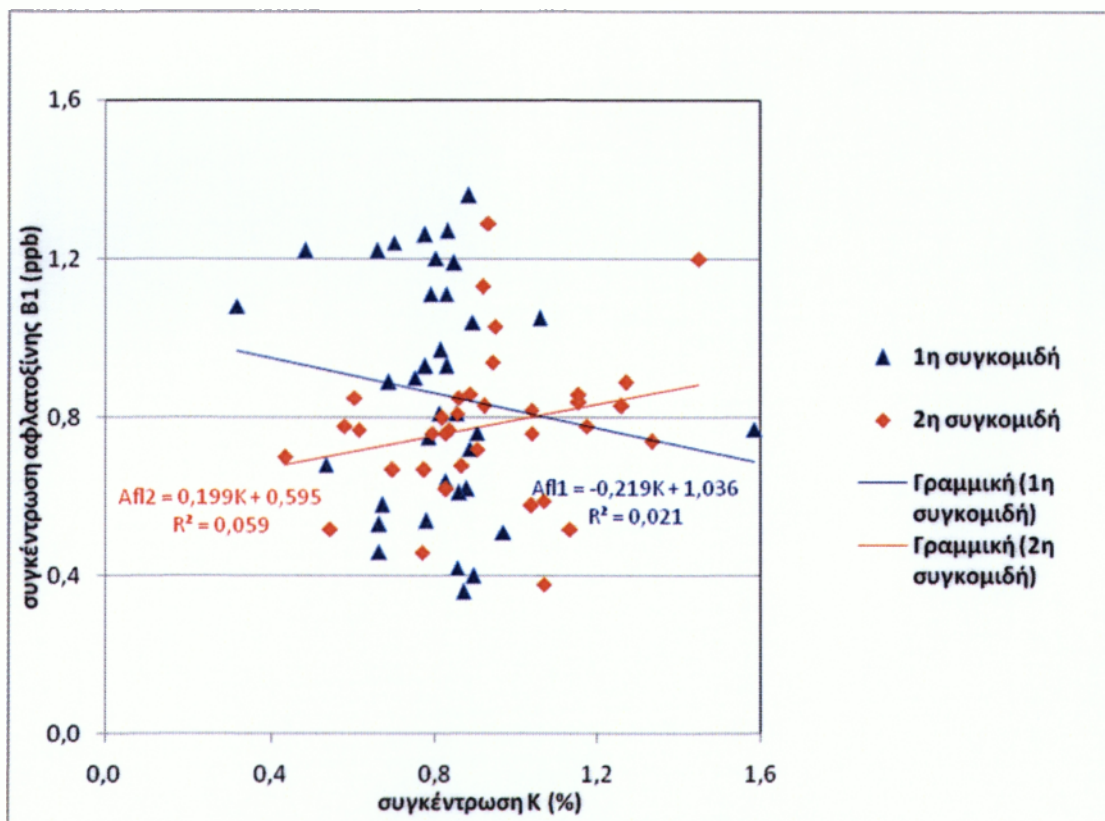
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Mg στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.2. Η γραμμή τάσης (Afl1(Mg)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής είναι σ' όλες τις περιπτώσεις σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 2^{ης} συγκομιδής (Afl2(Mg)). Ταυτόχρονα τόσο στην 1^η όσο και στη 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να αυξάνει ελαφρά με την αύξηση της συγκέντρωσης του Mg.



Διάγραμμα 4.2.2. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Mg στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.3. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε K.

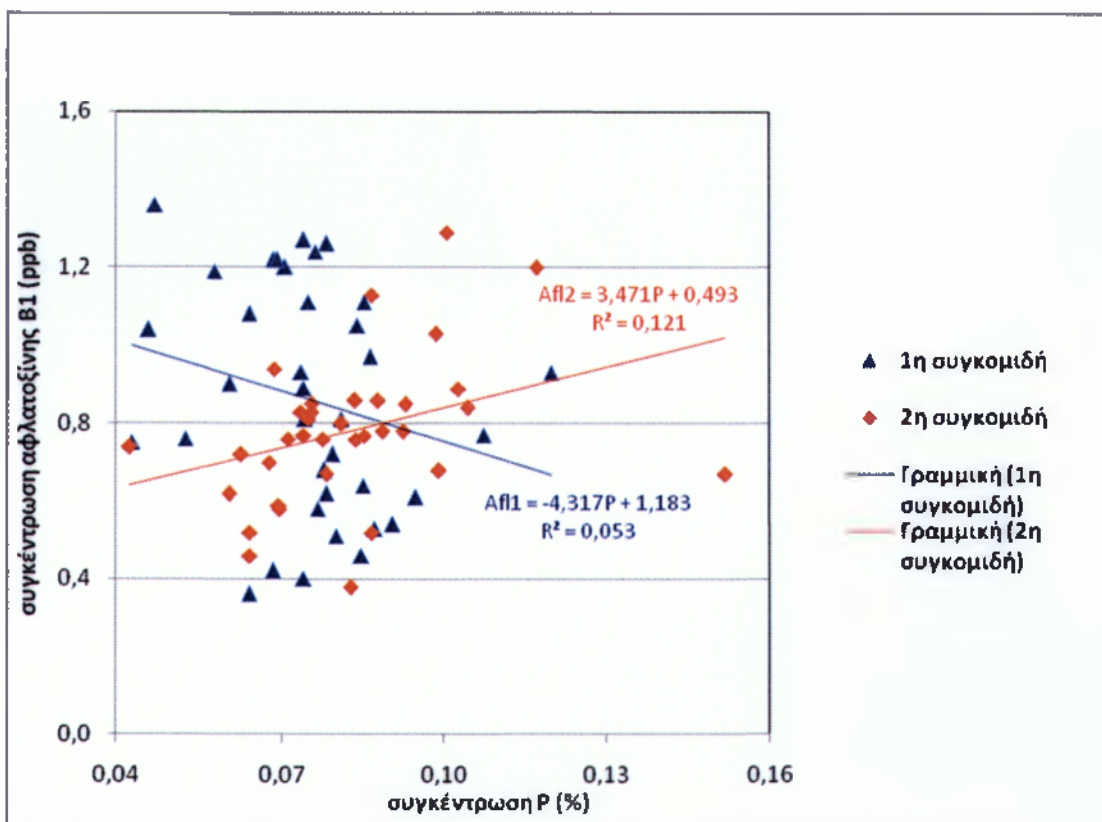
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του K στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.3. Η γραμμή τάσης (Afl2(K)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 1^{ης} συγκομιδής (Afl1(K)) σε χαμηλές και μέσες συγκεντρώσεις K. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις K η γραμμή τάσης της 2^{ης} συγκομιδής φαίνεται να προσεγγίζει και τελικά να υπερβαίνει την αντίστοιχη της 1^{ης} συγκομιδής. Ταυτόχρονα, στην 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του K. Αντίθετα, στην 1^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του K.



Διάγραμμα 4.2.3.Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του K στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.4. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε P.

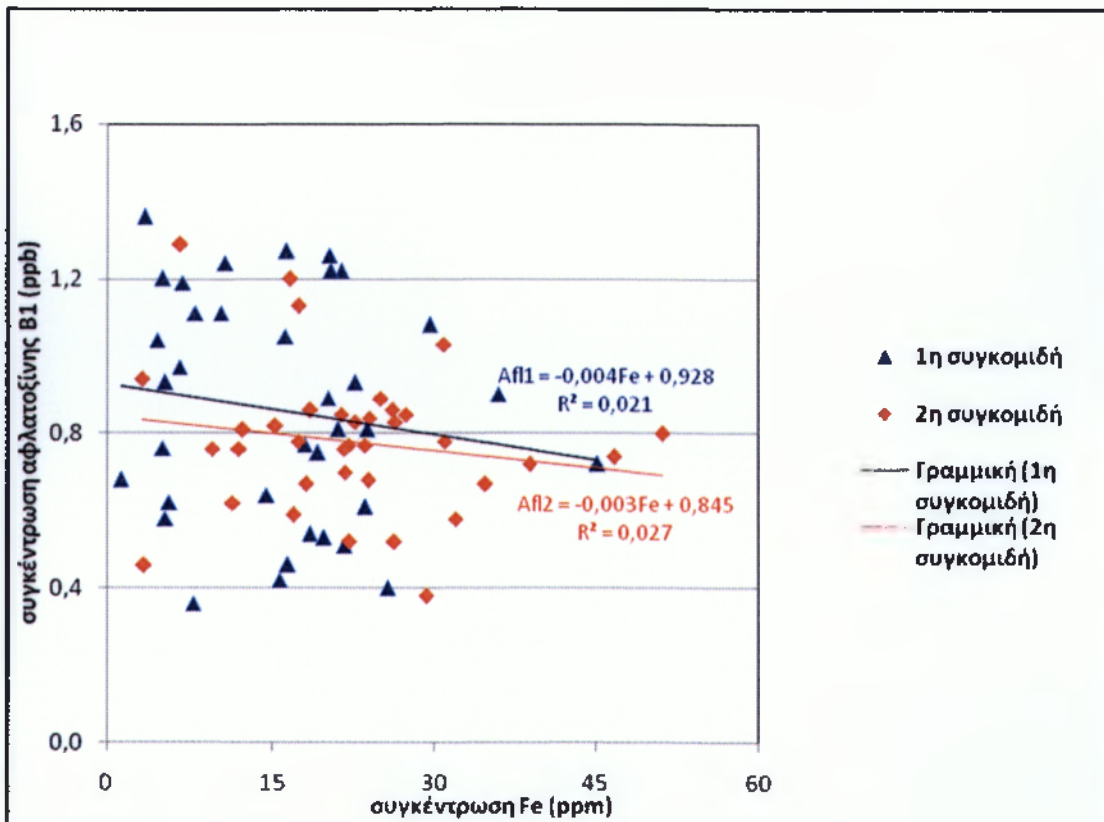
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του P στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.4. Η γραμμή τάσης (Afl2(P)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 1^{ης} συγκομιδής (Afl1(P)) σε χαμηλές και μέσες συγκεντρώσεις P. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις P η γραμμή τάσης της 2^{ης} συγκομιδής φαίνεται να προσεγγίζει και τελικά να υπερβαίνει την αντίστοιχη της 1^{ης} συγκομιδής. Ταυτόχρονα, στην 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του P. Αντίθετα, στην 1^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του P.



Διάγραμμα 4.2.4. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του P στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.5. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Fe.

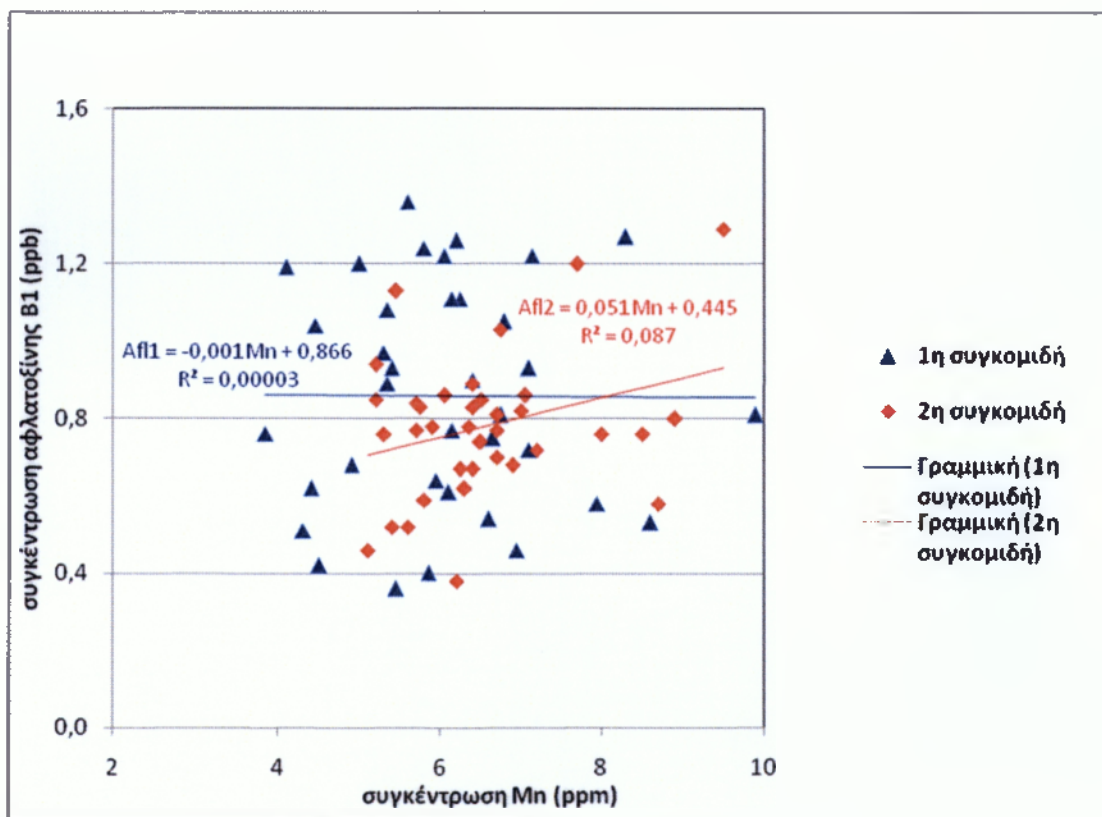
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Fe στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.5. Η γραμμή τάσης (Afl1(Fe)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής είναι σ' όλες τις περιπτώσεις σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 2^{ης} συγκομιδής (Afl2(Fe)). Ταυτόχρονα τόσο στην 1^η όσο και στη 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να μειώνεται ελαφρά με την αύξηση της συγκέντρωσης του Fe.



Διάγραμμα 4.2.5. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Fe στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.6.. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Mn.

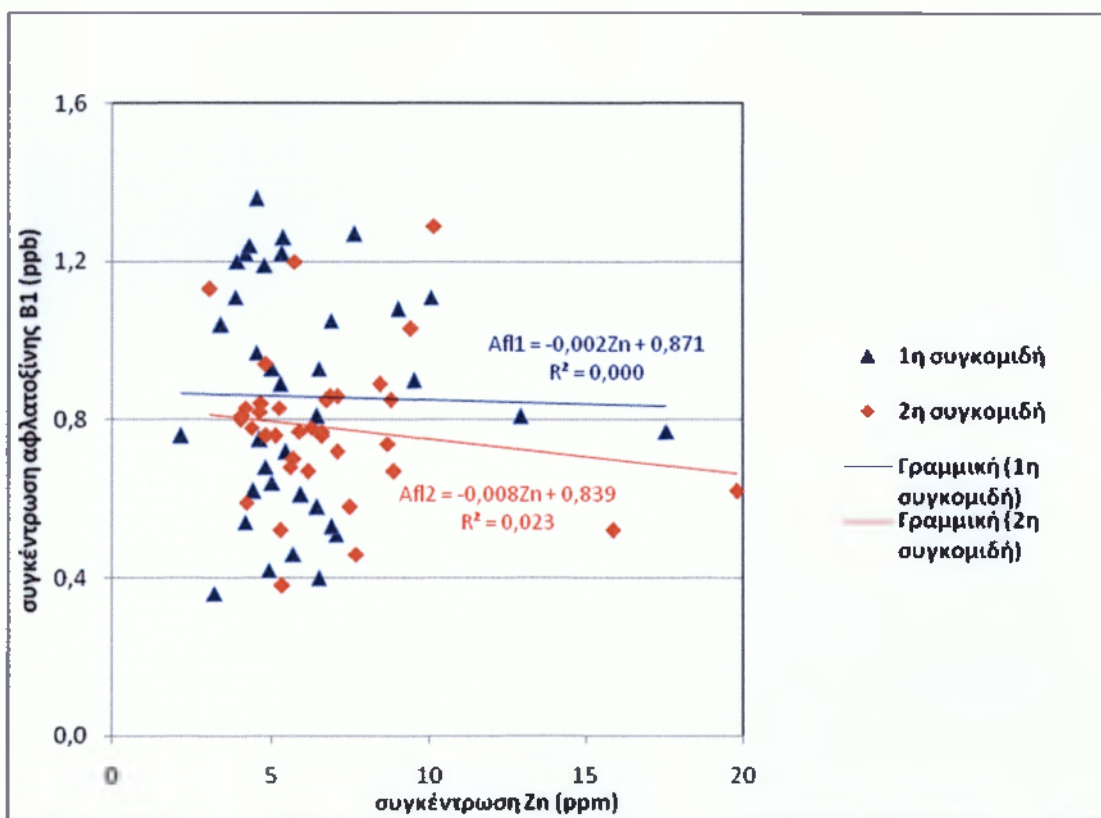
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Mn στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.6. Η γραμμή τάσης (Afl2(Mn)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 1^{ης} συγκομιδής (Afl1(Mn)) σε χαμηλές και μέσες συγκεντρώσεις Mn. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις Mn η γραμμή τάσης της 2^{ης} συγκομιδής φαίνεται να προσεγγίζει και τελικά να υπερβαίνει την αντίστοιχη της 1^{ης} συγκομιδής. Ταυτόχρονα, στη 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 φαίνεται να αυξάνει ελαφρά με την αύξηση της συγκέντρωσης του Mn ενώ στην περίπτωση της 1^{ης} φαίνεται να μην επηρεάζεται.



Διάγραμμα 4.2.6. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Mn στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.7. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Zn.

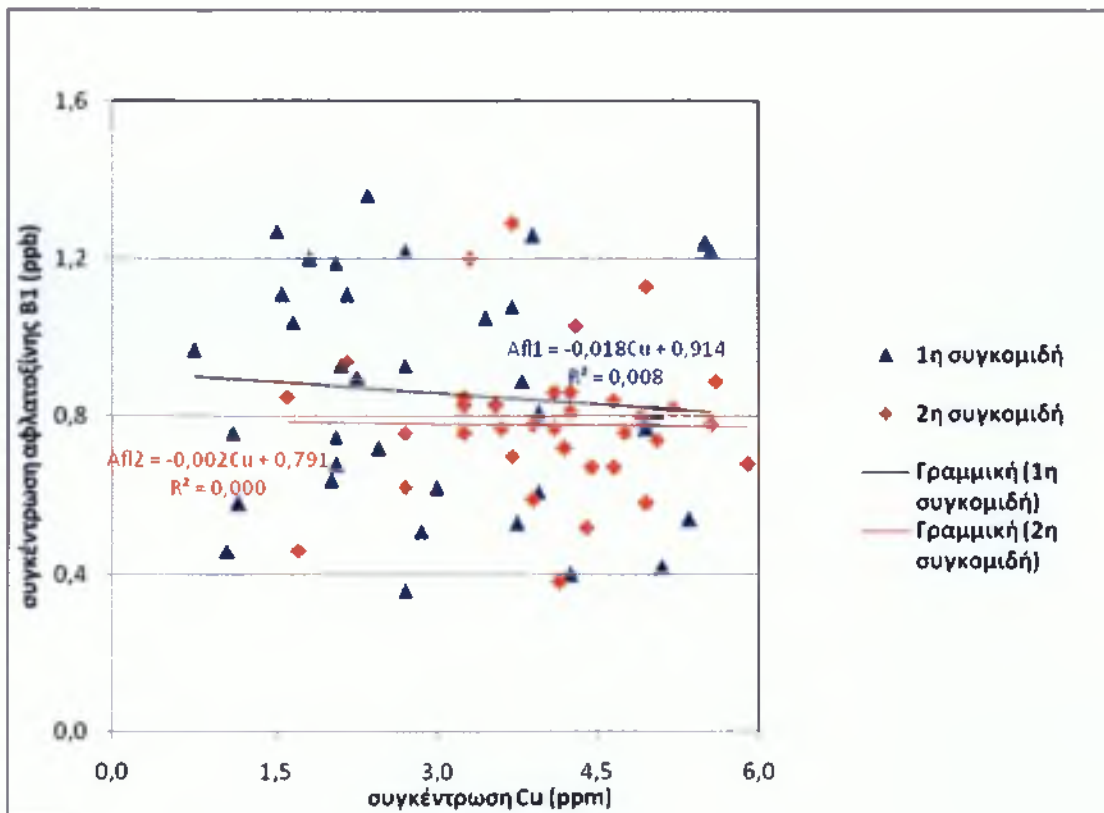
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Zn στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.7. Η γραμμή τάσης (Afl1(Zn)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής είναι σ' όλες τις περιπτώσεις σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 2^{ης} συγκομιδής (Afl2(Zn)). Ταυτόχρονα τόσο στην 1^η όσο και στη 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 δεν επηρεάζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του Zn.



Διάγραμμα 4.2.7. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Zn στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.8. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε Cu.

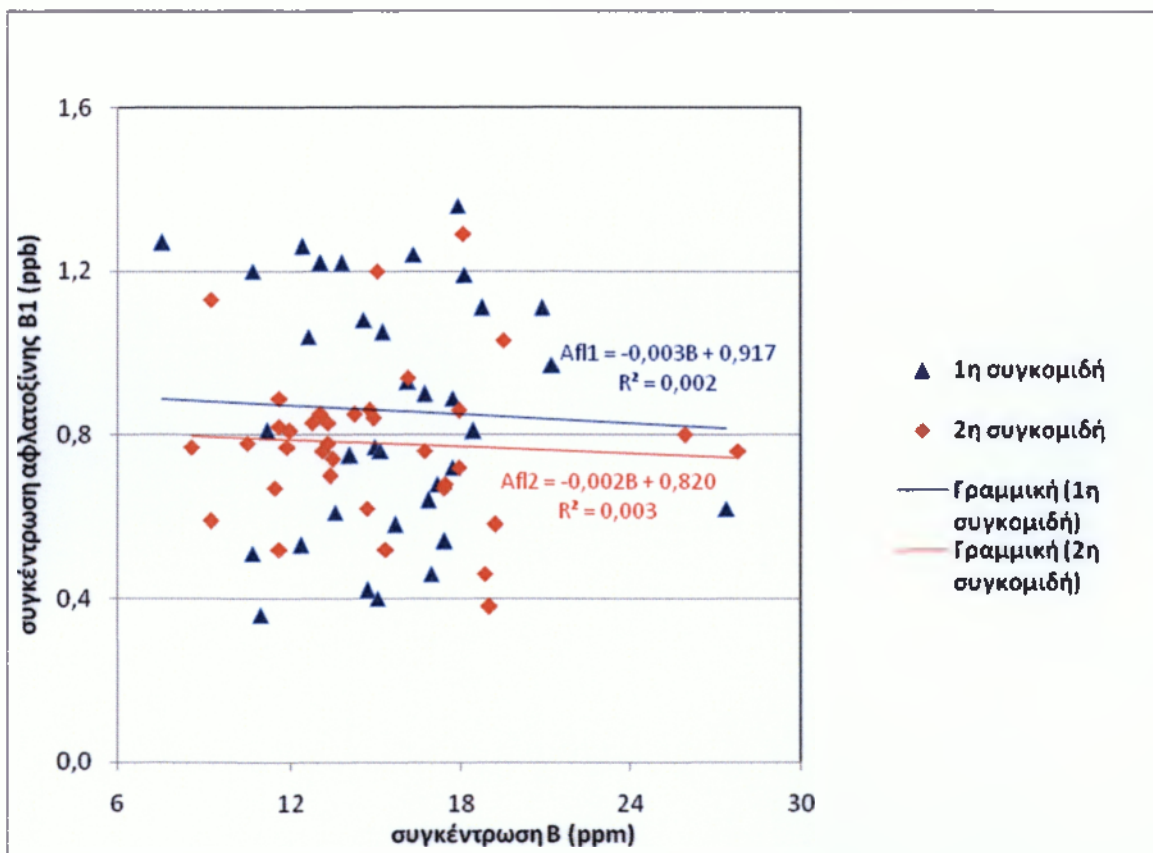
Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Cu στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.8. Η γραμμή τάσης (Afl1(Cu)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής είναι σ' όλες τις περιπτώσεις σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 2^{ης} συγκομιδής (Afl2(Cu)). Ταυτόχρονα τόσο στην 1^η όσο και στη 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 δεν επηρεάζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του Cu.



Διάγραμμα 4.2.8. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του Cu στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

4.2.9. Συσχέτιση της αφλατοξίνης B1 με την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε B.

Η κατανομή της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του B στα ξηρά σύκα δίνεται στο Διάγραμμα 4.2.9. Η γραμμή τάσης (Afl1(B)) που εκφράζει την κατανομή στην περίπτωση της 1^{ης} συγκομιδής είναι σ' όλες τις περιπτώσεις σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη της 2^{ης} συγκομιδής (Afl2(B)). Ταυτόχρονα τόσο στην 1^η όσο και στη 2^η συγκομιδή η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 δεν επηρεάζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του B.



Διάγραμμα 4.2.9. Κατανομή των μετρήσεων και γραμμή τάσης της αφλατοξίνης B1 σε σχέση με τη συγκέντρωση του B στα ξηρά σύκα στην 1^η και τη 2^η συγκομιδή.

5. Συμπεράσματα.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε μια πλήρης και καθαρή εικόνα για την περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε θρεπτικά στοιχεία της ποικιλίας “καλαμών” τόσο συνολικά όσο και στα διάφορα “χέρια” συγκομιδής. Στον Πίνακα 5.1. που ακολουθεί, αντιπαρατίθενται τα διαθέσιμα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας για την περιεκτικότητα των σύκων σε θρεπτικά στοιχεία που αναφέρονται στην ποικιλία “calimyna” (sarilor), με αυτά που μετρήθηκαν στην ποικιλία “καλαμών” απ’ όπου προκύπτουν ομοιότητες και διαφορές ως προς τα όρια και το εύρος των τιμών και συγκεκριμένα:

Πίνακας 5.1. Περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε θρεπτικά στοιχεία όπως αναφέρονται από τους ερευνητές Aksoy et al, και Ozer et al για την ποικιλία “calimyna” και για την ποικιλία “καλαμών” που προέκυψαν από την παρούσα εργασία

ποικιλία στοιχείο	ποικιλία “calimyna”		ποικιλία “καλαμών” παρούσα εργασία
	Aksoy et al	Ozer et al	
N (%)	0,52 – 0,84	1,01 – 2,56	-
Ca (%)	0,17 – 0,33	0,24 – 1,16	0,12 – 0,91
Mg (%)	0,01 – 0,11	0,08 – 0,90	0,05 – 0,31
K (%)	0,68 – 1,05	0,30 – 1,32	0,32 – 1,59
P (%)	0,084 – 0,125	0,010 – 0,960	0,043 – 0,152
Fe (ppm)	165 - 720	56 - 640	1,25 – 51,10
Mn (ppm)	8 - 20	8 - 49	3,85 – 9,90
Zn (ppm)	(24,6)	18 - 134	2,15 – 19,80
Cu (ppm)	6 - 18	0,01 - 64	0,75 – 5,90
B (ppm)	-	-	7,53 – 27,79

- Τα βασικά μακροστοιχεία, Ca, Mg, K και P φαίνεται να κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα και στις δύο ποικιλίες.

- Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στην περίπτωση των ιχνοστοιχείων Fe, Mn, Zn και Cu, όπου οι συγκεντρώσεις τους στα ξηρά σύκα της ποικιλίας “καλαμών” φαίνεται να είναι σημαντικά μικρότερες.

Για το N δεν προέκυψαν στοιχεία στην παρούσα εργασία και για το B δεν αναφέρονται δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία, γι αυτό και δεν μπόρεσε να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο ποικιλιών. Ιδιαίτερα για το N είναι κάτι που πρέπει οπωσδήποτε να συμπληρωθεί με παραπέρα έρευνα του Εργαστηρίου Εδαφολογίας και να αποτελέσει αναπόσπαστο κομμάτι της παρούσας εργασίας.

Ενδιαφέροντα είναι και τα στοιχεία που προέκυψαν για τη συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων μεταξύ της 1^{ης} και της 2^{ης} συγκομιδής και συγκεκριμένα:

- Στις περιπτώσεις των μακροστοιχείων Ca, Mg, K και των ιχνοστοιχείων Fe και Cu, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής τους στη 2^η συγκριτικά με την 1^η συγκομιδή.
- Για το μακροστοιχείο P και τα ιχνοστοιχεία Mn, Zn και B δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο συγκομιδών.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών καθώς και η αναζήτηση των βιοχημικών μηχανισμών που προκαλούν τις διαφορές αυτές ξεφεύγουν από το επίπεδο αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αφλατοξίνης B1 προέκυψαν ενδιαφέροντα στοιχεία τόσο για την παρουσία της στα ξηρά σύκα λόγω της φυσικής μόλυνσής τους από στελέχη του μύκητα *Aspergillus* spp. που ενδημούν στην περιοχή της Μεσσηνίας.

Παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη της περιοχής παράγουν την πολύ τοξική αφλατοξίνη B1. Το ποσοστό της στο σύνολο των παραγομένων αφλατοξινών δεν προσδιορίστηκε αλλά με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία θα πρέπει να είναι η κυρίαρχη αφλατοξίνη. Το εξειδικευμένο kit προσδιορισμού έδειξε να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο

με ελάχιστο όριο ανίχνευσης τα 5 pg/ml κάτι που το καθιστά κατάλληλο για τον γρήγορο προσδιορισμό της αφλατοξίνης B1 στα ξηρά σύκα.

Σ' όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν, ανιχνεύθηκε η αφλατοξίνη B1 αλλά σε επίπεδα κάτω από το όριο ασφαλείας των 2 ppb που έχει θεσπίσει η Ε.Ε.. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν δείγματα με μηδενικό επίπεδο αφλατοξίνης είναι κάτι που θα πρέπει να αποδοθεί στις ιδιαιτερότητες της μεθόδου προσδιορισμού.

Είναι γνωστό ότι η ELISA είναι ουσιαστικά μια ποιοτική και ημιποσοτική μέθοδος. Έχει την ιδιαιτερότητα να δίνει σε ορισμένες περιπτώσεις ψευδώς θετικά αποτελέσματα αλλά ποτέ ψευδώς αρνητικά. Αυτό σημαίνει ότι μέρος των δειγμάτων που αναλύθηκαν μπορεί να μην περιέχουν την αφλατοξίνη B1 και η ανίχνευσή της να οφείλεται στις ιδιαιτερότητες της μεθόδου. Ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό, πρόσφατη συγκριτική μελέτη στην περίπτωση του προσδιορισμού των φουμαρισινών, έδειξε ότι η μέθοδος ELISA δίνει σε γενικές γραμμές υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την επίσημη μέθοδο προσδιορισμού με HPLC ⁽¹⁴⁾. Αν αυτό ισχύει και στην περίπτωση των αφλατοξινών τότε οι πραγματική επιβάρυνση των ξηρών σύκων σε αφλατοξίνη θα πρέπει να είναι πολύ χαμηλότερη.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στο σύνολο των 72 δειγμάτων ξηρών σύκων που μελετήθηκαν σε καμιά περίπτωση η επιβάρυνση με αφλατοξίνη B1 δεν βρέθηκε να υπερβαίνει τα ανώτατα επιτρεπτά όρια της Ε.Ε. Αν δε θεωρήσουμε ότι οι τιμές που δίνει η μέθοδος προσδιορισμού είναι σχετικά αυξημένες, τότε η κατάσταση των ελληνικών ξηρών σύκων ως προς την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνες είναι σχετικά καλή. Από την άλλη μεριά, ακόμα και αν σε κάποιο ικανό αριθμό δειγμάτων η αφλατοξίνη είναι μηδενική, η ανίχνευσή της στο σύνολο των δειγμάτων δημιουργεί προβληματισμούς, και αναδεικνύει την αναγκαιότητα ανάπτυξης εκτεταμένου ποιοτικού ελέγχου. Η μέθοδος ELISA παρ' ότι δεν δίνει πάντα ακριβή αποτελέσματα είναι η καταλληλότερη για γρήγορες και χαμηλού κόστους αναλύσεις ρουτίνας σε βιομηχανικό επίπεδο.

Ενδιαφέρουσα φαίνεται η πιθανότητα, η περιεκτικότητα των ξηρών σύκων σε θρεπτικά στοιχεία να επηρεάζει την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus* sp. και κατά συνέπεια την παραγωγή της αφλατοξίνης.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε μια μικρή θετική συσχέτιση της παρουσίας της αφλατοξίνης και της συγκέντρωσης του Ca μόνο στην 1^η συγκομιδή ενώ δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής. Η παρατήρηση αυτή έρχεται να επιβεβαιώσει τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών που έχουν αναφέρει παρόμοια θετική συσχέτιση μεταξύ της αφλατοξίνης και του Ca στα ξηρά σύκα της ποικιλίας “calimyna”. Παρ’ όλα αυτά υπάρχουν και παλαιότερες αναφορές⁽¹⁴⁾ που υποστηρίζουν ότι η παρουσία ασβεστίου συμβάλλει στη μείωση της παρουσίας της αφλατοξίνης στα φιστίκια ⁽²⁵⁾. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι το θέμα της επίδρασης του ασβεστίου στην παρουσία της αφλατοξίνης χρήζει περισσότερης διερεύνησης.

Μικρή θετική συσχέτιση της παρουσίας της αφλατοξίνης και της συγκέντρωσης του Mg παρατηρήθηκε τόσο στην 1^η όσο και στη 2^η συγκομιδή. Στην περίπτωση του K και του P παρατηρήθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας της αφλατοξίνης και της συγκέντρωσής τους στην 1^η συγκομιδή και αντιστρόφως ισχυρή αρνητική συσχέτιση στην περίπτωση της 2^{ης} συγκομιδής. Τα αποτελέσματα αυτά, λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν απαιτούν οπωσδήποτε επιβεβαίωση με παραπέρα πειραματισμό.

Από τα ιχνοστοιχεία, το Mn δείχνει μια σχετικά μικρή θετική συσχέτιση με την παρουσία της αφλατοξίνης κατά την 2^η συγκομιδή κάτι που δεν παρατηρείται και στην 1^η. Ο Fe αντίθετα εμφανίζει μια μικρή αρνητική συσχέτιση και στις δύο συγκομιδές ενώ η διακύμανση της συγκέντρωσης των ιχνοστοιχείων Zn, B και Cu δεν φαίνεται να επηρεάζει την παρουσία των αφλατοξινών στα ξηρά σύκα. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του Cu δεν επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών ότι η αύξηση της συγκέντρωσής του επηρεάζει αρνητικά την παρουσία της αφλατοξίνης στην περίπτωση της ποικιλίας “calimyna”.

Για την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων απαιτείται παραπέρα πειραματισμός και πιθανότατα εργαστηριακές μελέτες των στελεχών του *Aspergillus* sp. προκειμένου να διερευνηθούν οι τροφικές απαιτήσεις τους τόσο σε συνθήκες εργαστηρίου όσο και σε συνθήκες αγρού.

Παράρτημα Ι

Φωτογραφικό Υλικό



Εικόνα 1.

Ακμαίο του εντόμου *Blastophaga psenes*, που είναι το βασικό έντομο για την επικονίαση της συκιάς. (Προσαρμογή από <http://waynesword.palomar.edu/pljune99.htm>)



Εικόνα 2 και 3.

Ζύγισμα των σύκων, προσθήκη υδατικού διαλύματος μεθανόλης (προσωπικό αρχείο).



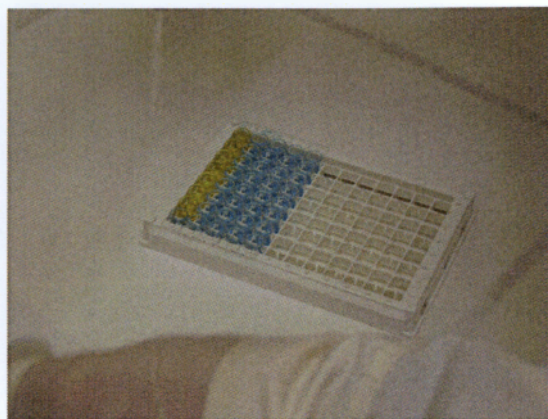
Εικόνα 4 και 5.

Παραλαβή και ανάδευση του ομογενοποιημένου δείγματος (προσωπικό αρχείο).

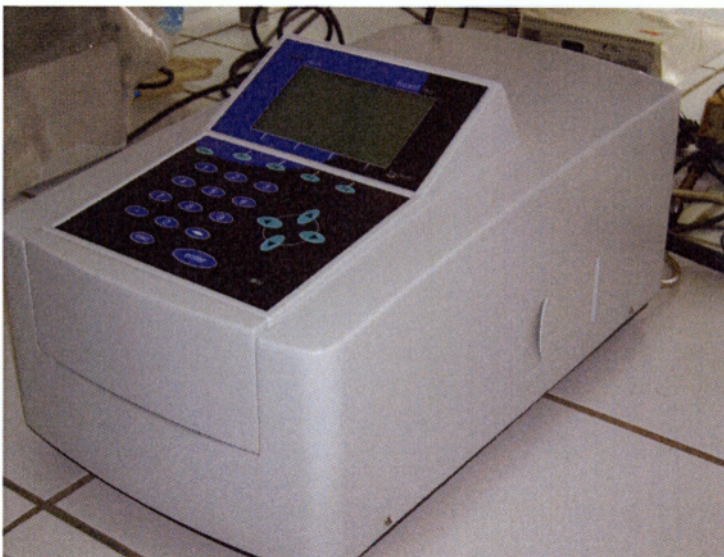


Εικόνα 6 και 7.

Διήθηση και τοποθέτηση του διηθήματος σε ερευνοτήρη (προσωπικό αρχείο).



Εικόνα 8 και 9.
Προσθήκη αντιδραστηρίων και μεταχρωματισμός των βοθρίων της ELISA
(προσωπικό αρχείο).



Εικόνα 10.
Τελικό στάδιο
προσδιορισμού
αφλατοξινών με την χρήση
του φωτόμετρου του
συστήματος ELISA
(προσωπικό αρχείο).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Τζαμουράνης Κωσταντίνος, Φυλλοβόλλα Καρποφόρα Δέντρα, Εργαστηριακές Ασκήσεις, Καλαμάτα 2006.
2. Ποντίκης Κωνσταντίνος, Ειδική Δενδροκομία, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 2009.
3. Γαλανοπούλου Ν, Ζαμπετάκης Γ, Μαυρή Μ, Σιαφάκα Α: "Διατροφή και Χημεία Τροφίμων", Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 2007.
4. Ζερφειρίδης Γρ.(1982), «Μυκοτοξίνες», Εκδ. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 1-54.
5. Τζατζαράκης Ε. Ν. & Τσατσάκης Α. Μ., Μύκητες και Μυκοτοξίνες, ΓΕΩΡΓΙΑ – Κτηνοτροφία 8, 1997.
6. Πασχαλίδης Χρήστος, Λιπασματολογία, Εργαστηριακές Ασκήσεις, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Καλαμάτα Οκτώβριος 2006.
7. Λαμπροπούλου Βούλα (2009), Εφημερίδα "Το Θάρρος", Φύλλο της 16 Δεκεμβρίου 2009.
8. Κουράκος Παναγιώτης, Μελέτη της επίδρασης της Ν-Ρ-Κ λίπανσης στην απόδοση και θρεπτική κατάσταση της συκιάς ποικιλίας Καλαμών στο νομό Μεσσηνίας, Πτυχιακή εργασία , Καλαμάτα Οκτώμβριος 2007.
9. Μπουρίκας Παναγιώτης, Η καλλιέργεια της συκιάς στο νομό Μεσσηνίας, Πτυχιακή εργασία, Καλαμάτα 2004.
10. Θανασόπουλος Κώστας, Μυκητολογικές Ασθένειες Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 1995.
11. Ηλιόπουλος Αναστάσιος Γ. , Γενική Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αθήνα 2004.
12. Μόνας Αναστάσιος & Σουλιώτης Ευθύμιος, Προσδιορισμός της αφλατοξινών με την μέθοδο ELISA. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου μόλυνσης και των ιόντων χαλκού στην παραγωγή αφλατοξινών απο τον μύκητα *Aspergillus Flavus* σε ξηρά σύκα. Πτυχιακή εργασία, Καλαματα, Μάιος 2008

13. Ποντίκης Κωνσταντίνος Α., ΓΕΝΙΚΗ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑ, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα 1997.
14. K.B. Ozzer, B. Dericci, 1998. A research on the relationship between aflatoxin and ochratoxin A formation and plant nutrients. Proceedings of the First International symposium on Fig.
15. Berg T., Gitte R., Thorup I., 1995, Mycotoxins in Danish Foods. National Food Agency of Health, Denmark.
16. Bullerman, L, B, Schtoeder, II, and park, K.Y. (1984), Formation and control of mycotoxins in food. J. Food Port 47 : 637 – 647.
17. Commission Regulation (EC) No 2174/2003 of 12 December 2003 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins. Off. J. European Commun L326 (2003) 12-15.
18. Commission Regulation (EC) No 683/2004 of 13 April 2004 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxins A in food for infants and young children. Off. J. European Commun L106 (2004)3 - 5.
19. Davis,N.D and Diener, U.L (1970). Environmental factors affecting the production of aflatoxin. Washington, DC, US Gort. Printing Office. pp. 43 -47.
20. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
21. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. European Commun L77 (2001) 1-13.
22. Doster, M. A., T. J. Michailides and D. P. Morgan, 1996. Aspergillus species and mycotoxins in figs from California orchards. Plant Disease 80 : 484 – 489.
23. R. T. V. Fox, Scholl of Plant Sciences, Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology, University of Reading.
24. Marsh, P. B., M. E. Simpson and M. W. Ttuckess, 1975. Effects of trace metals on the production of aflatoxins by A. parasiticus. Applied Microbiology, Vol: 30, No1, 52 -57.

25. F. Karbancioglu-Guler and D. Heperkan, Comparison of ELISA and HPLC for determination of fumonisin in dried figs, Proc. Nat. Matica Srpska Novi Sad, 117 , 37-43 2009.
26. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aflatoxin>
27. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>
28. <http://www.ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>
29. <http://www.icrisat.org/aflatoxin/>
30. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/method/ELISA.html>
31. <http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>
32. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus>
33. <http://www.aspergillus.org.uk/>
34. <http://www.aspergillusflavus.org/>
35. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxins.htm
36. <http://www.agratech.gr/kanonismos.html>
37. http://en.wikipedia.org/wiki/High_performance_liquid_chromatography
38. http://www.kathimerini.gr/4dcgi/_w_articles_kathcommon_1_13/08/2005_1284371
39. www.sykiki.gr
40. <http://www.minagric.gr/>
41. www.icrisat.org/aflatoxin/health.asp