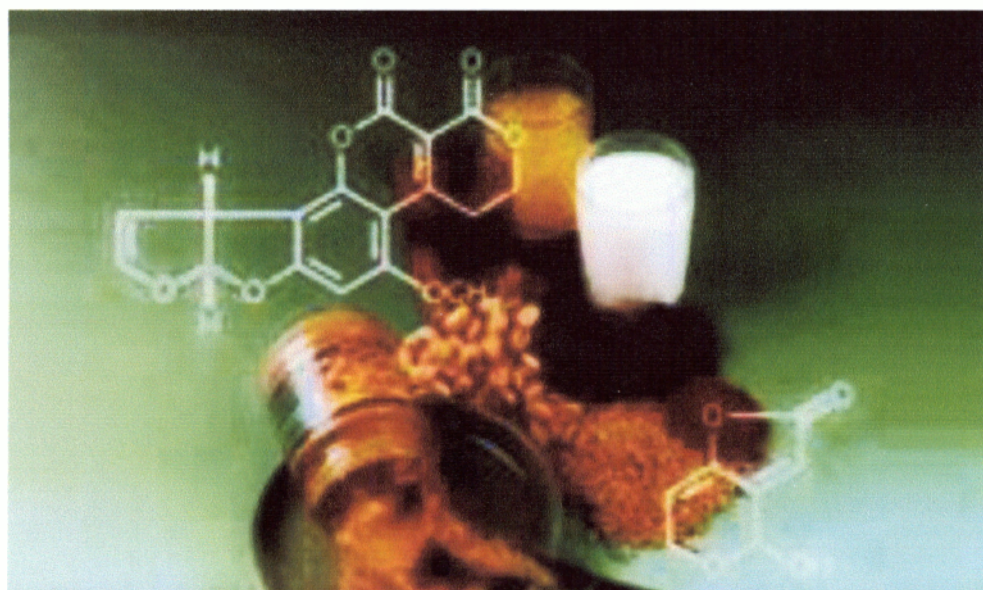




ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
(ΑΤΕΙ) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



«ΤΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ  
*Fusarium, Aspergillus, Penicillium* ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ  
ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»

ΨΩΙΝΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ  
ΑΜ: 2005138

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2013



**Α.Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ**  
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΤΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *Fusarium*,  
*Aspergillus*, *Penicillium* ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ  
ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΨΩΙΝΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, ΑΜ: 2005138**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ Ph. D.**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2013**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν πολύ σημαντικούς παράγοντες καθώς η παρουσία τους στα τρόφιμα έχει μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις, αλλά και επιπτώσεις στη υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Το γεγονός αυτό παρότρυνε την φοιτήτρια Ψώινου Παναγιώτα ώστε να επιλέξει τη συγκεκριμένη πτυχιακή με θέμα «τα φυτοπαθογόνα είδη των μυκήτων *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* και η επίδραση των μυκοτοξινών τους στα τρόφιμα».

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση της έρευνας των τελευταίων των γενών *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium* και κυρίως των μυκοτοξινών που παράγουν.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, η εργασία χωρίστηκε σε πέντε κεφάλαια. Αρχικά δίνονται όλες οι αναλυτικές πληροφορίες για τα φυτοπαθογόνα αλλά και μυκοτοξικογόνα είδη των μυκήτων *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium*, με έμφαση στις μυκοτοξίνες που παράγει το κάθε είδος. Στην συνέχεια, στο δεύτερο κεφάλαιο, αναφέρονται οι μυκοτοξίνες των παραπάνω μυκήτων στο σύνολό τους και γίνεται αναλυτική περιγραφή για κάθε μυκοτοξίνη χωριστά. Το τρίτο κεφάλαιο αφορά τις τεχνικές και μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί και εξελιχθεί ανά τα χρόνια για τον ακριβή προσδιορισμό μυκοτοξινών σε τρόφιμα. Ακολουθεί το τέταρτο κεφάλαιο με έμφαση στην επίδραση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα και κατ' επέκταση στον άνθρωπο και τα ζώα και δίνεται η σχετική Νομοθεσία για τις μυκοτοξίνες τόσο σε Ευρωπαϊκό όσο και σε Παγκόσμιο επίπεδο. Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο δίνονται τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την παραπάνω βιβλιογραφική μελέτη όσον αφορά την σημαντικότητα των μυκοτοξινών στην ποιότητα των τροφίμων και την υγεία του ανθρώπου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση της έρευνας των μυκήτων του γένους *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium* υπεύθυνων για την παραγωγή μυκοτοξινών που έχουν σημαντικές επιπτώσεις στα τρόφιμα, και κατά συνέπεια στην υγεία των ανθρώπων.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, η εργασία χωρίστηκε σε πέντε κεφάλαια. Αρχικά δίνονται όλες οι αναλυτικές πληροφορίες για τα φυτοπαθογόνα αλλά και μυκοτοξικογόνα είδη των μυκήτων *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium*, με έμφαση στις μυκοτοξίνες που παράγει το κάθε είδος. Στην συνέχεια, στο δεύτερο κεφάλαιο, αναφέρονται οι μυκοτοξίνες των παραπάνω μυκήτων στο σύνολό τους και γίνεται αναλυτική περιγραφή για κάθε μυκοτοξίνη χωριστά.

Το τρίτο κεφάλαιο αφορά τις τεχνικές και μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί και εξελιχθεί ανά τα χρόνια για τον ακριβή προσδιορισμό μυκοτοξινών σε τρόφιμα. Ακολουθεί το τέταρτο κεφάλαιο με έμφαση στην επίδραση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα και κατ' επέκταση στον άνθρωπο και τα ζώα και δίνεται η σχετική Νομοθεσία για τις μυκοτοξίνες τόσο σε Ευρωπαϊκό όσο και σε Παγκόσμιο επίπεδο.

Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο δίνονται τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την παραπάνω βιβλιογραφική μελέτη όσον αφορά την σημαντικότητα των μυκοτοξινών στην ποιότητα των τροφίμων και την υγεία του ανθρώπου.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> .....	13
«ΤΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ <i>FUSARIUM</i> , <i>ASPERGILLUS</i> και <i>PENICILLIUM</i> ».....	13
1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΑ, ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ .....	13
1.2. ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>ASPERGILLUS</i> .....	19
1.2.1. Ιστορική αναδρομή και η ταξινόμηση των μυκήτων του γένους <i>Aspergillus</i> . .....	20
1.2.2. Μορφολογία των ειδών του γένους <i>Aspergillus</i> .....	23
1.2.3. Τα φυτοπαθογόνα και η παθογένεια των ειδών του γένους <i>Aspergillus</i> . ....	24
1.3. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>PENICILLIUM</i> .....	29
1.3.1. Ιστορική αναδρομή και ταξινομικά στοιχεία. ....	30
1.3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Penicillium</i> .....	32
1.3.3 Φυτοπαθογόνα είδη του γένους <i>Penicillium</i> .....	36
1.4. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>FUSARIUM</i> .....	39
1.4.1. Ταξινόμηση των ειδών του γένους <i>Fusarium</i> .....	39
1.4.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Fusarium</i> .....	41

1.4.3. Φυτοπαθογόνα είδη του γένους <i>Fusarium</i> .....	43
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup></b> .....	<b>49</b>
<b>«ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ»</b> .....	<b>49</b>
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	49
2.2 ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ .....	52
2.2.1 Ιστορικά στοιχεία .....	52
2.2.2 Οι μύκητες - παραγωγοί των αφλατοξινών. ....	53
2.2.3 Φυσικές και χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών .....	53
2.2.5 Βιοσύνθεση αφλατοξίνης .....	58
2.2.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τη παραγωγή αφλατοξίνης .....	61
2.3 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α .....	62
2.3.1 Παράγοντες παραγωγής ωχρατοξίνης. ....	62
2.3.3 Φυσικό-χημικές ιδιότητες της ωχρατοξίνης Α .....	64
2.3.4 Βιοσύνθεση Ωχρατοξίνης Α .....	65
2.3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της Ωχρατοξίνης Α.....	69
2.4 ΠΑΤΟΥΛΙΝΗ.....	70
2.4.1 Γενικά στοιχεία.....	70
2.4.2 Παθογόνα που παράγουν την πατουλίνη.....	70
2.4.3 Βιοσυνθετικό μονοπάτι πατουλίνης .....	71
2.5 ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ.....	73
2.5.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες ζεαραλενόνης.....	73
2.5.2 Βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης .....	74
2.6 ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ .....	75
2.6.1 Γενικά στοιχεία.....	75
2.6.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες φουμονισινών .....	75
2.6.3 Βιοσύνθεση Φουμονισινών .....	76

2.7 ΚΙΤΡΙΝΙΝΗ.....	77
2.7.1 Γενικά .....	77
2.7.2 Φυσικό-χημικές ιδιότητες.....	78
2.7.3 Βιοσύνθεση Κιτρινίνης.....	79
2.7.4 Τοξικότητα και σταθερότητα κιτρινίνης .....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> .....	83
«ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ» .....	83
3.1 γενικά .....	83
3.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ .....	85
3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ .....	85
3.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ.....	86
3.5. ΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ .....	87
3.5.1. Κλασικές αναλυτικές τεχνικές.....	88
3.5.2. Υγρή χρωματογραφία / Φασματοσκοπία μάζας (LC/MS) .....	89
3.5.3. Ανοσοχημικές τεχνικές.....	94
3.5.4. Άλλες τεχνικές.....	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	100
«ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ» .....	100
4.1 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ.....	100
4.2 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	103
4.2.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία .....	103
4.2.2 Παγκόσμια Νομοθεσία .....	105
4.4 ΕΠΙΤΡΕΠΟΜΕΝΑ ΟΡΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ .....	106

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> .....	107
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	109

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα παρασιτικά είδη μυκήτων αποτελούν σπουδαία παθογόνα των φυτών και των εντόμων, όμως από ιατρικής απόψεως δεν έχουν μεγάλη σημαντικότητα για τους σπονδυλωτούς οργανισμούς, όπως συμβαίνει με άλλους παράγοντες. Ωστόσο υπάρχουν αρκετά είδη μυκήτων που έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν ως ξενιστές τους ιστούς του ζωικού βασιλείου, και να προκαλέσουν τις λεγόμενες μυκητιάσεις, ενώ οι ασθένειες που δημιουργούνται από τους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων αυτών (διατροφικές, αναπνευστικές, δερματικές) ονομάζονται μυκοτοξικώσεις.

Σύμφωνα με τα πρόσφατα διαδεδομένα, περίπου 50 είδη μυκήτων προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και στα ζώα και πάνω από 10.000 είδη προσβάλλουν τα φυτά προκαλώντας, από ασήμαντες μέχρι σοβαρές καταστρεπτικές ζημιές. Πρέπει να σημειωθεί ότι σπανίως τα φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων μπορούν να είναι και παθογόνα ανθρώπων. Μεταξύ αυτών αναφέρεται ο μύκητας *Cercospora apii* που προκαλεί κηλίδωση στα φύλλα του μαϊντανού και συγχρόνως είναι υπευθύνως για μια σοβαρή δερματίτιδα στο ανθρώπινο πρόσωπο. Επίσης, ο μύκητας *Fusarium solani* που προκαλεί σηψιρριζία σε πολλά ετήσια φυτά, μπορεί να προκαλέσει επιπεφυκίτιδα στους οφθαλμούς του ανθρώπου. Στην ουσία επικίνδυνα για τον άνθρωπο είναι τα φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων που προσβάλλουν καρπούς σιτηρών, ψυχανθών, ακρόδρυων, ακόμα και νωπά φρούτα, αυτά που διακρίνονται για την παραγωγή μυκοτοξινών τοξικών για τον άνθρωπο και τα θηλαστικά ουσιών. Έτσι, λοιπόν, οι μυκοτοξίνες που είναι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους παράγονται από αρκετά είδη μυκήτων και έχουν τοξική δράση και φαίνεται να εμπλέκονται με καρκινογενέσεις και με ασθένειες των νεφρών και του ήπατος. Αυτός είναι και ο λόγος που πολλές επιστημονικές έρευνες έχουν στραφεί σε αυτό το πεδίο.

Περίπου 300 δευτερογενείς μεταβολίτες με τοξικογόνο δράση παράγονται από περισσότερους από 100 μύκητες και ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) εκτιμά ότι περίπου το 25% της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής μολύνεται από μυκοτοξίνες, οδηγώντας σε σημαντικές οικονομικές απώλειες. Φυσικά, οι μυκοτοξίνες

μολύνουν τα τρόφιμα όταν οι συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων που της παράγουν είναι ιδανικές και προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο και τα ζώα μέσω της τροφής.

Από το σύνολο των τοξικογόνων μυκήτων πιο διαδεδομένοι ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* και *Alternaria* (πίνακας 1). Αυτοί οι μύκητες προκαλούν σοβαρά φυτοπαθολογικά και μυκοτοξικολογικά προβλήματα τόσο πριν όσο και μετά το στάδιο της συγκομιδής, καθώς και σε επεξεργασμένα προϊόντα τροφίμων. Οι πιο διαδεδομένες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, η ωχρατοξίνη Α, οι φουμονισίνες, η πατουλίνη και η ζεαραλενόνη.

Τα είδη των *Fusarium* και *Alternaria* χαρακτηρίζονται ως «μύκητες πεδίου» καθώς απαιτούν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία για την ανάπτυξή τους και τη σύνθεση μυκοτοξινών (>20%), ενώ οι «μύκητες αποθήκευσης», τα είδη των *Aspergillus* και *Penicillium* αναπτύσσονται πολύ καλά σε υποστρώματα με χαμηλότερη υγρασία. Για το λόγο αυτό τα είδη των *Fusarium* και *Alternaria* ενέχουν υψηλό μυκοτοξικολογικό κίνδυνο πριν την συγκομιδή ή αμέσως μετά κατά την ξήρανση των προϊόντων, ενώ τα είδη των *Aspergillus* και *Penicillium* ενέχουν υψηλότερο κίνδυνο για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές κατά την αποθήκευση ή άλλο είδος επεξεργασίας τους.

**Πίνακας 1: Οι κυριότεροι Μυκοτοξικογόνοι μύκητες και οι Μυκοτοξίνες που παράγονται.**

Μυκοτοξιογόνοι μύκητες		
<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>
Μυκοτοξίνες		
Αφλατοξίνη	Ωχρατοξίνη	Φουμονισίνες
Ωχρατοξίνη	Πατουλίνη	Τριχοθηκίνες
	Κιτρινίνη	Δεοξυνιβαλενόλη
		Ζεαραλενόνη

Πηγή: Μάρκογλου, 2010



Οι μυκοτοξίνες παρουσιάζουν τέσσερα βασικά είδη τοξικότητας: α) οξεία τοξικότητα (προκαλώντας συχνά επιδείνωση του ήπατος ή της λειτουργίας των νεφρών), β) χρόνιες τοξικότητες, γ) μεταλλαξιγόνο τοξικότητα και δ) τερατογόνο τοξικότητα. Φυσικά οι αφλατοξίνες, έχουν ταξινομηθεί ως καρκινογόνες για τον άνθρωπο σύμφωνα με τη Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον καρκίνο (IARC).

Λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους, οι περισσότερες από τις ανεπτυγμένες χώρες έχουν θεσπίσει κανονισμούς που ορίζουν τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα των πιο σημαντικών μυκοτοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Επίσης, τόσο σε Ευρωπαϊκό όσο και σε Παγκόσμιο επίπεδο, έχουν θεσπιστεί νόμοι σύμφωνα με τους οποίους θα γίνεται έλεγχος στα τρόφιμα προς κατανάλωση για μυκοτοξίνες ώστε τα επίπεδα αυτών να βρίσκονται κάτω από τα προκαθορισμένα όρια. Σε κάποιες περιπτώσεις ωστόσο τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια αλλάζουν με βάση την προέλευση του τροφίμου και την επεξεργασία που έχει υποστεί. Για παράδειγμα το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο για την ωχρατοξίνη Α στα σταφύλια είναι 10mg/kg ενώ στο κρασί και τους χυμούς είναι 2mg/kg. Επίσης, για τις φουμονισίνες (FB1) το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο στα σιτηρά είναι 4mg/kg ενώ στα τρόφιμα με σιτηρά 1mg/kg. Παρατηρείται προσαρμογή των ορίων ανάλογα με τον τελικό αποδέκτη των τροφίμων.

Για την ανίχνευση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι, οι οποίοι με το πέρασμα των χρόνων έχουν εξελιχθεί με σκοπό την ακρίβεια στον προσδιορισμό τόσο του είδους της μυκοτοξίνης όσο και του επιπέδου αυτής.

Καθώς παράγουν μια μεγάλη ποικιλία μυκοτοξινών, οι μύκητες, αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην αλλοίωση των τροφών, οδηγώντας σε μεγάλη οικονομική ζημιά, και σε σημαντικό κίνδυνο της δημόσιας υγείας. Αλλά, και εκείνοι που δεν είναι τοξικογόνοι στη φύση, δηλαδή δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες, μεταδίδουν μια μouxλιασμένη οσμή και γεύση στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της μακράς αποθήκευσής τους. Πιο συγκεκριμένα, αναφορές του Ευρωπαϊκού οργανισμού RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) δείχνουν πως, μέχρι και το 2011, τα κρούσματα για τις μυκοτοξίνες έφτασαν τα 669, με τις πιο επικίνδυνες τις αφλατοξίνες και την ωχρατοξίνη Α που προκαλούν καρκινογένεση και αποτελούν το σύνολο των κρουσμάτων (665 κρούσματα). Σύμφωνα λοιπόν, με τα αποτελέσματα αυτά, τα κύρια προϊόντα στα οποία εντοπίστηκαν μυκοτοξίνες ήταν οι ξηροί καρποί και τα προϊόντα

αυτών (519 κρούσματα) καθώς και τα φρούτα και λαχανικά σε μικρότερο βαθμό (69 κρούσματα). Βασικές χώρες προέλευσης για τους επικίνδυνους ξηρούς καρπούς ήταν η Αργεντινή, το Ιράν, η Τουρκία, η Κίνα, οι ΗΠΑ και η Αίγυπτος ενώ και πάλι συναντάμε τη γείτονα Τουρκία με επικίνδυνα αποξηραμένα σύκα. Παρόλα τα παραπάνω, τα κρούσματα σε σχέση με το 2008 ελαττώθηκαν κατά 264, περίπου δηλαδή κατά το 1/3, γεγονός όμως που δεν πρέπει να μας εφησυχάζει (<http://www.agrospecom.gr/site914d.html?&file=pages.xml&catid=77&lang=el>).

Για αυτό ο σκοπός της εργασίας είναι να ελέγξει την σημαντικότητα των μυκοτοξινών που ανιχνεύονται στα τρόφιμα και που αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία αλλά και να μελετήσει τους σύγχρονους τρόπους ανίχνευσης αυτών ώστε να μειωθούν αλλά και να αποφευχθούν περαιτέρω κρούσματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### «ΤΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *FUSARIUM*, *ASPERGILLUS* και *PENICILLIUM*»

#### 1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΑ, ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Σύμφωνα με τη ταξινόμηση, από το Διεθνή Κώδικα Βοτανικής Ονοματολογίας του 1983 οι μύκητες κατατάσσονται σε χωριστό από τα φυτά βασίλειο, το βασίλειο των Μυκήτων (*Regnum Fungi*).

Το βασίλειο των μυκήτων περιλαμβάνει διάφορα είδη πρακτικού, επιστημονικού και φυτοπαθολογικού ενδιαφέροντος. Είναι ευρέως κατανεμημένοι στη φύση, αναπτύσσονται κάτω από ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα θρεπτικών ουσιών, θερμοκρασίας, pH και άλλων παραμέτρων. Μερικά είδη μυκήτων παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αποσύνθεση νεκρών φυτικών υπολειμμάτων και συμβάλλουν στη γονιμότητα του εδάφους. Πολλά είδη μυκήτων δημιουργούν εξειδικευμένες συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες πολλών ανώτερων φυτών (μυκόριζες). Αλλά, είναι και η πιο πολυάριθμη ομάδα παθογόνων που προκαλούν στα καλλιεργήσιμα φυτά ασθένειες από ασήμαντες μέχρι καταστροφικές. Μπορούν να προσβάλλουν οποιοδήποτε μέρος του φυτού, το υπόγειο, το υπέργειο, το εσωτερικό ή το εξωτερικό του. (Ηλιόπουλος, 2004, Παπαδοπούλου, 2009)

Σύμφωνα με την ταξινόμηση των μυκήτων φυτοπαθολογικού ενδιαφέροντος από τον *Hawksworth* (1983), το βασίλειο των μυκήτων διαιρείται σε Μυξομύκητες και Ευμύκητες. Η διαίρεση Μυξομύκητες *Muchomycota* περιλαμβάνει τους λεγόμενους κατώτερους αντιπροσώπους των μυκήτων. Έχουν αμοιβαδοειδή θαλλό, χωρίς

κυτταρικά τοιχώματα και χωρίς σταθερό σχήμα. Τα γυμνά κύτταρα των μυξομύκητων περιέχουν ή μόνο ένα πυρήνα, όπως η μυξαμοιβάδα, ή πολλούς πυρήνες, όπως το πλασμώδιο. Στους μυξομύκητες περιλαμβάνονται ευρύτατα διαδεδομένα υδρόβια και χερσαία είδη. Στην πλειοψηφία τους είναι σαπρόφυτα και ζουν στα φυτικά υπολείμματα. Ορισμένα είδη τους τρέφονται με βακτήρια. Οι μυξομύκητες πολλαπλασιάζονται αγενώς, δηλαδή με ζωοσπόρια, και εγγενώς, δηλαδή με ένωση δύο ζωοσπορίων (πλανογαμετική σύζευξη) ή με ένωση αμοιβαδοειδών θαλλών (σωματογαμία).

Πίνακας 1.1. Ταξινομική κατάταξη των μυκήτων της διαίρεσης *Eumycota* συμφωνά με τον Hawksworth, (1983)

ΔΙΑΙΡΕΣΗ	EUMYCOTA
Υποδιαίρεση:	<i>Mastigomycotina</i> (Μαστιγομύκητες)
Κλάση:	<i>Chytriomycetes</i> <i>Hyphochytriomycetes</i> <i>Oomycetes</i>
Υποδιαίρεση:	<i>Zygomycotina</i> (Ζυγομύκητες)
Κλάση:	<i>Zygomycetes</i> <i>Trichomycetes</i>
Υποδιαίρεση:	<i>Ascomycotina</i> (Ασκομύκητες)
Κλάση:	<i>Hemiascomycetes</i> <i>Loculoascomycetes</i>
Υποδιαίρεση:	<i>Plectomycetes</i>
Κλάσεις:	<i>Laboulbeniomycetes</i> <i>Pyrenomycetes</i> <i>Discomycetes</i>
Υποδιαίρεση:	<i>Basidiomycotina</i> (Βασιδιομύκητες)
Κλάσεις:	<i>Hymenomycetes</i> <i>Gasteromycetes</i> <i>Urediniomycetes</i> <i>Ustilaginomycetes</i>
Υποδιαίρεση:	<i>Deuteromycotina</i> (Δευτερομύκητες)
Κλάσεις:	(Ατελείς μύκητες ή Αδηλομύκητες) <i>Coelomycetes</i> <i>Hyphomycetes</i>

Πηγή: Hawksworth, 1983

Οι Ευμύκητες έχουν πέντε υποδιαιρέσεις (πίνακας 1.1) και συμπεριλαμβάνει τα είδη των μυκήτων τα οποία έχουν νηματοειδή θαλλό με ή χωρίς διαφράγματα (septa). (Ηλιόπουλος, 2004)

Η σύγχρονη ταξινόμηση (από 1990) των μυκήτων απομακρύνεται από την κλασική υπαγωγή των κατώτερων μυκήτων, όπως Μυξομυκήτων και Ωομυκήτων στους πραγματικούς μύκητες και τους κατατάσσει στο βασίλειο των Πρωτοζώων και των Χρωμίστων αντίστοιχα. Οι κατηγορίες αυτές κατατάσσονται σήμερα στους Ψευδομύκητες. Οι πραγματικοί μύκητες ή Ευμύκητες είναι εκείνοι που ταξινομούνται στο Βασίλειο των Μυκήτων (Τζάμος, 2007).

Από άποψη έμβιων όντων οι μύκητες παρουσιάζουν πολλές ιδιομορφίες και τα γενικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών αυτών είναι τα εξής:

- ❖ Έχουν **κυτταρική δομή**.
- ❖ Αποτελούνται μόνο από **ένα κύτταρο**.
- ❖ Ανήκουν στους **ευκαρυωτικούς οργανισμούς**, επειδή έχουν ευδιάκριτο πυρήνα. Περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη με πολλούς πυρηνικούς πόρους. Το κύτταρο έχει 1-2 πυρήνες (σπάνια περισσότερους) με ένα, συνήθως, πυρηνίσκο και χρωμοσώματα, τα οποία έχουν συχνά μόνο μία σειρά (μονοπλοειδή) και είναι λίγα και πολύ κοντά.
- ❖ Είναι **ετερότροφοι μικροοργανισμοί**, εφόσον στερούνται τις χλωροφύλλες δεν σχηματίζουν άμυλο και, όπως τα ζωικά όντα, αποθησαυρίζουν το γλυκογόνο. Αλλά όπως και τα φυτικά κύτταρα έχουν χυμοτόπια. Οπτικά διαφανείς υδαρείς χώροι. Εμφανίζονται σε ώριμα κύτταρα του μύκητα, συνεχώς μεγαλώνουν σε όγκο πιέζοντας το κυτταρόπλασμα προς τα τοιχώματα και προς το άκρο της υφής που αυξάνει.
- ❖ Το κυτταρικό τοίχωμα τους αποτελείται από πολυσακχαρίτες διαφορετικούς για κάθε κατηγορία μυκήτων. Τέτοιοι είναι η χιτίνη (το κύριο συστατικό πολλών μυκήτων), β-γλυκάνες, γλυκογόνο, γαλακτοζαμίνη, πολυμερή λακτόζης και κυτταρίνη (συναντάται μόνο στους ωομύκητες). Εκτός από τους πολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τοίχωμα υπάρχουν πρωτεΐνες και λιπίδια. Η πρωτοπλασματική μεμβράνη περιβάλλει το πρωτόπλασμα και έχει λιποπρωτεϊνική σύσταση. Στα νεαρά κύτταρα το κυτταρόπλασμα είναι

πυκνότευτο και κοκκώδες, περιέχει οργανίδια, διάφορα λιπίδια, κρύσταλλα οξαλικού ασβεστίου και πρωτεΐνες.

- ❖ Οι μεμβρανώδεις σχηματισμοί των μυκήτων (η κυττοπλασματική, η πυρηνική, η μεμβράνη των μιτοχονδρίων, το ενδοπλασματικό δίκτυο ) χαρακτηρίζονται από την παρουσία μια ουσίας της εργοστερόλης.
- ❖ Το κύτταρο του μύκητα περιέχει μιτοχόνδρια. Υπάρχουν ένα ή περισσότερα, έχουν διάμετρο 0,5-0,8 μm, είναι κυλινδρικά, καλύπτονται από διπλή μεμβράνη, περικλείουν ριβοσώματα και ένα κυκλικό DNA. Επίσης ριβοσώματα τα οποία συμβάλλουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, έχουν μέγεθος περίπου 20-80nm, αποτελούνται από πρωτεΐνη και RNA, υπάρχουν ελεύθερα στο κυτόπλασμα ή είναι προσκολλημένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης υπάρχουν στους πυρήνες, στα μιτοχόνδρια. Άλλα οργανίδια που συναντάμε είναι τα μικροσώματα, λομάσωμα, πολυκυστιδικό σωματίο, ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi (δικτυόσωμα) (εικόνα 1.1).



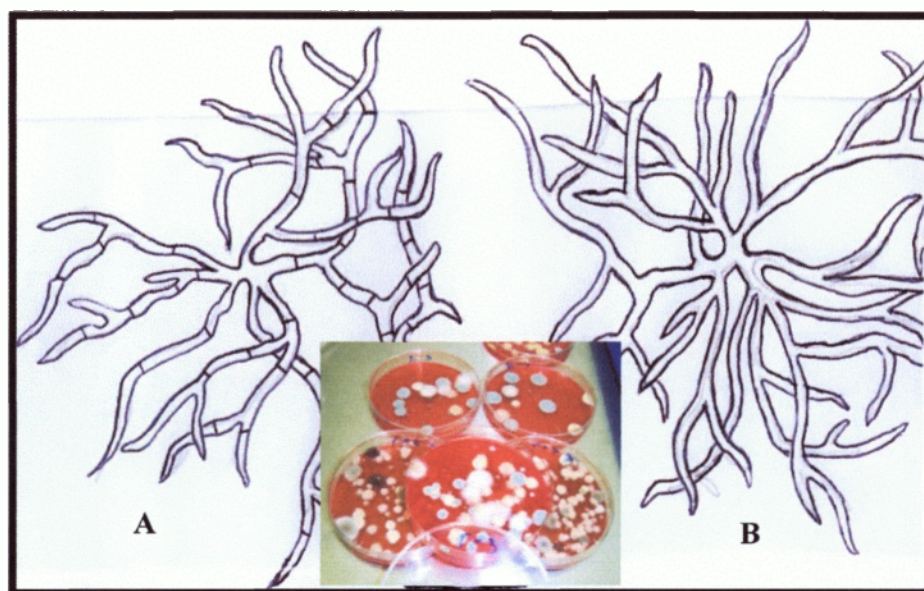
*Εικόνα 1.1. Μικροσκοπική δομή του κυττάρου του μύκητα (πηγή Miller, 1995 )*

- ❖ Σύμφωνα με τις θρεπτικές τους απαιτήσεις διακρίνονται σε: **α) υποχρεωτικά παράσιτα** που χρησιμοποιούν για την τροφή τους μόνο τη ζωντανή ύλη, **β) προαιρετικά παράσιτα**, είδη που ζουν τρεφόμενα από νεκρή ύλη (σαπρόφυτα), αλλά είναι ικανά να προσβάλουν και τα ζωντανά φυτά, **γ) προαιρετικά**



**σαπρόφυτα**, που συνηθίζουν να ζουν καταναλώνοντας τους ζωντανούς φυτικούς ιστούς ως παράσιτα, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες μπορούν να ζήσουν τρεφόμενα από νεκρή οργανική ύλη, **δ) υποχρεωτικά σαπρόφυτα**, η ζωή των οποίων εξαρτάται από την παρουσία νεκρής οργανικής ύλης.

- ❖ Το μη διαφοροποιημένο σώμα του μύκητα ο θαλλός αποτελείται από λεπτά, διακλαδιζόμενα νημάτια ή υφές. Το σύνολο των υφών αυτών ονομάζεται μυκήλιο (εικόνα 1.2).
- ❖ Το κύτταρο των νηματοειδών μυκήτων περιβάλετε με κυτταρικό τοίχωμα και έχει σταθερό νηματοειδές σχήμα. Τα είδη τα οποία ανήκουν στους ανώτερους μύκητες όλο το μυκήλιο τους χωρίζεται με εγκάρσια διαφράγματα ή σέπτα.



*Εικόνα 1.2: Α. Νηματοειδές «πολυκύτταρο μυκήλιο» μυκήλιο. (οι υφές με διαφράγματα χαρακτηριστικό για τους ανώτερους μύκητες όπως Ασκομύκητες, οι Βασιδιομύκητες και οι Αδηλομύκητες), Β. Νηματοειδές κοινοκύτταρο μυκήλιο οι υφές χωρίς διαφράγματα χαρακτηριστικό για τους κατώτερους μύκητες, (Ωομύκητες, Ζυγομύκητες). Στο κέντρο: τα τρυβλία Petri με αποικίες μυκήτων σε RBA (πηγή: Μ. Παπαδοπούλου 2009).*

- ❖ Το κυτταρόπλασμα γεμίζει όλες τις υφές και τις διακλαδώσεις και οι πυρήνες βρίσκονται διάσπαρτα σε όλο το κυτταρόπλασμα. Οι λεγόμενοι ανώτεροι μύκητες (Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Αδηλομύκητες), έχουν μυκήλιο «πολυκύτταρο» (εικόνα 1), χωρισμένο με εγκάρσια διαφράγματα (σέπτα) σε πολλά τμήματα, που το καθένα περιέχει 1 – 2 πυρήνες, ή σπάνια περισσότερα.

Τα σέπτα επιτρέπουν την επικοινωνία του κυτταροπλάσματος των γειτονικών τμημάτων, διότι στο κέντρο τους έχουν ένα άνοιγμα.

- ❖ Οι κατώτεροι αντιπρόσωποι των μυκήτων, ευρύτατα διαδεδομένα υδρόβια και χερσαία είδη που ζουν ως σαπρόφυτα στα φυτικά υπολείμματα και ορισμένα είδη τρέφονται με βακτήρια, έχουν αμοιβαδοειδή θαλλό, χωρίς κυτταρικά τοιχώματα και σταθερό σχήμα, και ονομάζεται είτε μυξαμοιβάδα, είτε πλασμώδιο.
- ❖ Ο θαλλός των ζυμών διαφέρει μορφολογικά από το νηματοειδές μυκήλιο των υπόλοιπων μυκήτων. Αποτελείται από ένα κύτταρο μεγαλύτερο σε μέγεθος από το βακτηριακό και έχει σχήμα σφαιρικό ή ωσειδές. Το κύτταρο αυτό αναπαράγεται με εγκάρσια διαίρεση. Τα εκβλαστήματα που δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο συχνά δεν αποχωρίζονται και έτσι σχηματίζουν αλυσίδες που μοιάζουν με μυκήλιο, γι' αυτό και ονομάζονται ψευδομυκήλιο.
- ❖ Στους μύκητες διακρίνονται και τα δύο είδη αναπαραγωγής, η εγγενής και η αγενής. Κατά την αγενή και εγγενή αναπαραγωγή σχηματίζονται τα λεγόμενα **σπόρια**. Τα σπόρια αυτά διαφέρουν σημαντικά από τα σπέρματα των φυτών με το ότι είναι πάντα **απλοειδής** και **δεν έχουν προσχηματισμένο έμβρυο**.
- ❖ Κάθε χρόνο οι μύκητες έχουν πολλούς κύκλους αγενών σπορίων τα, Με βάση τη διαδικασία παραγωγής τους, τα αγενή σπόρια χωρίζονται σε δύο τύπους: α) τα σποριαγγειοσπόρια και β) τα κονίδια. (Ηλιόπουλος 2004, Παπαδοπούλου 2009).
- ❖ Οι τύποι των σπόρων εγγενούς αναπαραγωγής, που παρατηρούνται στους μύκητες, είναι τα ωσπόρια, τα ζυγοσπόρια, τα ασκοσπόρια και τα βασιδιοσπόρια. Από τα σπόρια αυτά τα ωσπόρια, και τα ζυγοσπόρια σχηματίζονται απ' ευθείας πάνω στο μυκήλιο των μυκήτων. Τα ασκοσπόρια δημιουργούνται μέσα σε ασκούς και τα βασιδιοσπόρια πάνω σε βασίδια. (Ηλιόπουλος, 2004).

## 1.2. ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ASPERGILLUS*

Λίγοι μύκητες είναι τόσο σημαντικοί όσο τα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι Ασπεργύλλοι, ως μια ομάδα οργανισμών έχουν τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση στους ανθρώπους. Τα χαρακτηριστικά τους έχουν μεγάλο παθολογικό, γεωργικό, βιομηχανικό, φαρμακευτικό, επιστημονικό και καλλιεργητικό ενδιαφέρον. Στη φύση, ο *Aspergillus* παίζει βασικό ρόλο στην ανακύκλωση του περιβαλλοντικού άνθρακα και αζώτου. Ως έξοχοι παράγοντες βιοαποδόμησης, οι ασπεργύλλοι έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές όπως καύσιμα αεροσκαφών, Αιγυπτιακές μούμιες, υλικό φωλιάς αλιγάτορα, ηλεκτρικές ασφάλειες, πλαστικά προϊόντα κ.α. Αυτή η μεγάλη και κοσμοπολίτικη ομάδα μυκήτων έχει ένα σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα, διότι εμπλέκεται στην αποδόμηση ενός μεγάλου εύρους οργανικών υποστρωμάτων, ιδιαίτερος φυτικών υλικών. Τα είδη των ασπεργύλλων έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε πολλές και διαφορετικές πηγές άνθρακα. Εμφανίζουν μια καταπληκτική θρεπτική ευελιξία. Η ποικιλομορφία των ενζύμων και των οργανικών οξέων που χρησιμοποιούν ως θρεπτικά συστατικά συμπληρώνεται από την μεταβολική τους ικανότητα να εκκρίνουν πολλούς χαμηλού μοριακού βάρους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι θεωρείται ότι είναι σημαντικοί στα διάφορα εκκριτικά συστήματα επικοινωνίας των μυκήτων (Baker & Bennett, 2008).

Στις ευεργετικές για το άνθρωπο δραστηριότητες αυτών των ειδών προσμετρώνται η χρησιμοποίηση ειδών όπως *Aspergillus niger* για παραγωγή οργανικών οξέων όπως κιτρικού και γλυκονικού καθώς επίσης και αντιβιοτικών. Στην Ιαπωνία χρησιμοποιούν τον *A. oryzae* για την παραγωγή του *sake* του εθνικού ποτού των Ιαπωνέζων. Το είδος *A. nidulans* χρησιμοποιείται σαν ερευνητικό μέσο για την μελέτη βασικών βιολογικών μηχανισμών (Χριστιάς, 1999).

Επίσης, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή ενζύμων. Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από στελέχη του *A. flavus* μετά από παρατηρήσεις ότι ορισμένες ουσίες εμφανίζουν αντιβακτηριδιακή δράση. Λόγω της ικανότητας αυτής της ομάδας των μυκήτων να παράγουν κογικό οξύ, μελέτες έχουν γίνει για την χρήση τους σε διαδικασίες ζύμωσης

και στην παρεμπόδιση της ενζυματικής αμαύρωσης διαφόρων τροφίμων. Άλλες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για τη χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή βιταμινών, παραγόντων ανάπτυξης και άλλων χημικών ουσιών (π.χ. στεροειδών, λιπών, πρωτεϊνών).

### 1.2.1. Ιστορική αναδρομή και η ταξινόμηση των μυκήτων του γένους *Aspergillus*.

Μικροσκοπικοί μύκητες του γένους *Aspergillus* παρουσιάζονται συνήθως ως παράγοντες σήψης και αποδόμησης. Αναφορές εμφάνισης του γένους ξεκινούν από την Αρχαία Ελλάδα (Νίκανδρος ο Κολοφώνιος, 185 π.Χ.) και φτάνουν ως και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικό, Κεφ. 13-14). Η πρώτη γνωστή αξιοποίηση των Ασπεργίλλων για ωφελμιστικούς σκοπούς ήταν στην Κίνα περίπου πριν από 2000 χρόνια, όπου τους χρησιμοποιούσαν για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων βοηθώντας έτσι την περαιτέρω ζύμωσή τους από ζύμες και βακτήρια. Παρόμοιες ζυμώσεις υιοθετήθηκαν και σε άλλες όμορες περιοχές όπως η Ινδονησία, Ιαπωνία, Κορέα και άλλες περιοχές της Ασίας. Στην Ιαπωνία, οι ζυμώσεις των σιτηρών και της σόγιας από κάποια είδη ασπεργίλλων είναι γνωστές με το όνομα Koji και αναπτύχθηκαν αιώνες πριν αναπτυχθεί η επιστήμη της μικροβιολογίας.

Η επιστημονική έρευνα των ασπεργίλλων αλλά και των άλλων μυκήτων ξεκίνησε αμέσως μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* πρωτοαναφέρθηκαν το 1729 από τον Pier A. Micheli (1679-1737), τον Ιταλό βοτανολόγο του «Nova Plantarum Genera». Ο Micheli ήταν ο πρώτος που διέκρινε τους χαρακτηριστικούς κονιδιοφόρους και τις κεφαλές του γένους αυτού και λόγω της ιδιότητάς του, ήταν ιερέας, ονόμασε αυτούς τους μύκητες Ασπέργιλλους. Διότι στα λατινικά *Aspergillum* (*Aspergillu* = ράντιστρον) είναι το θρησκευτικό σκεύος που χρησιμοποιούνταν στους αγιασμούς στη Ρωμαιοκαθολική Εκκλησία, με το οποίο προσομοίασε τις αποικίες του μύκητα. Ήδη από τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα οι Ασπέργιλλοι άρχισαν να αναγνωρίζονται ως λοιμογόνιοι παράγοντες του ανθρώπου και των ζώων, ως δραστικοί παράγοντες στις διαδικασίες αποδόμησης, αλλά και στις

ζυμώσεις. Τελικά οι ασπέργιλλοι ως ξεχωριστό γένος μυκήτων πήρε οριστική μορφή από τον Wehmer το 1901 (Raper & Fennell, 1965).

Το όνομα του γένους *Aspergillus*, από ταξινομική άποψη, αναφέρεται στην ατελή μορφή των μυκήτων σύμφωνα με τον Κώδικα Ταξινόμησης, όμως έχει επικρατήσει αυτή η ονομασία λόγω της ευρείας χρήσης του. Λόγω του ότι σχετικά λίγα είδη του γένους *Aspergillus* παράγουν κλειστοθήκια με τα εγγενή σπόρια τα ασκοσπόρια, η ταξινόμηση για την πλειοψηφία των απομονώσεων βασίζεται στα χαρακτηριστικά της αποικίας και στις λεπτομέρειες της μορφολογίας των σχηματισμών που φέρουν τα κονίδια. Πιο συγκεκριμένα η ταξινόμηση βασίζεται στη μορφολογία των παρακάτω χαρακτηριστικών:

1. Κονιδιακή κεφαλή: χρώμα, σχήμα, μέγεθος, δομή.
2. Βασικά κύτταρα ή Foot-Cell: σχήμα, μέγεθος, μετατροπή με το χρόνο, η σύνδεσή του με τις υπόλοιπες μυκηλιακές υφές.
3. Κονιδιοφόρος: Μήκος, διάμετρος, χρώμα, ύπαρξη ή μη διακλάδωσης.
4. Κορυφαία εξόγκωση κονιδιοφόρου: σχήμα, μέγεθος.
5. Κονίδιο: σχήμα, χρώμα, μέγεθος. Ιδιαίτερα το χρώμα είναι πολύ χαρακτηριστικό π.χ. πράσινο στο είδος *A. flavus* και μαύρο-καφέ στο είδος *A. niger*.
6. Ύπαρξη κλειστοθηκίων (ασκοκάρπια καρποφορίες εγγενών σπορίων) και ασκοσπορίων.
7. Δημιουργία σκληρωτίων ή ψευδοσκληρωτίων

Τα είδη του γένους *Aspergillus* ανήκει στην οικογένεια *Moniliaceae* (τ.μ. *Trichocomaceae*) της κλάσης *Hyphomycetes* των Αδηλομυκήτων (*Deuteromycotina*) και από ταξινομική άποψη είναι η ατελής μορφή των Ασκομυκήτων. Η ταξινομική του κατάταξη παρουσιάζεται στο πίνακα 1.2.



Πίνακας 1.2. Ταξινομική κατάταξη των ειδών  
του γένους πηγή *Aspergillus* με την τέλεια και ατελή μορφή

Περιοχή: <i>Eukaryota</i>	Περιοχή: <i>Eukaryota</i>
Βασίλειο: <i>Mycota</i> <u>Μύκητες</u>	Βασίλειο: <i>Mycota</i> <u>Μύκητες</u>
Φύλο : <i>Ascomycota</i>	Υποδιαίρεση: <i>Deuteromycotina</i>
Κλάση: Μυκηλιακοί Ασκομύκητες	Κλάση: <i>Hyphomycetes</i>
Υποκλάση: <i>Plectomycetes</i>	Τάξη: <i>Moniliales</i>
Τάξη : <i>Eurotiales</i>	Οικογένεια: <i>Moniliaceae</i>
Οικογένεια: <i>Eurotiomycetes</i>	Γένος: <i>Aspergillus</i>
Γένος: <i>Emericella (Aspergillus)</i>	

Είδη
<p><u><i>Aspergillus caesiellus</i></u>, <u><i>Aspergillus candidus</i></u>, <u><i>Aspergillus carneus</i></u>,  <u><i>Aspergillus clavatus</i></u>, <u><i>Aspergillus deflectus</i></u>, <u><i>Aspergillus flavus</i></u>,  <u><i>Aspergillus fumigatus</i></u>, <u><i>Aspergillus glaucus</i></u>, <u><i>Aspergillus nidulans</i></u>,  <u><i>Aspergillus niger</i></u>, <u><i>Aspergillus ochraceus</i></u>, <u><i>Aspergillus oryzae</i></u>,  <u><i>Aspergillus parasiticus</i></u>, <u><i>Aspergillus penicilloides</i></u>, <u><i>Aspergillus restrictus</i></u>,  <u><i>Aspergillus sojae</i></u>, <u><i>Aspergillus sydowi</i></u>, <u><i>Aspergillus terreus</i></u>, <u><i>Aspergillus ustus</i></u>  <u><i>Aspergillus versicolor</i></u>.</p>

Πηγή: <http://wikipedia.qwika.com/en/Aspergillus>

Στο γένος *Aspergillus*, μέχρι τώρα, κατατάσσονται περίπου 200 είδη παγκοσμίως. Μερικά από αυτά τα είδη είναι σοβαρά παθογόνα των ανθρώπων και των ζώων. Τα πιο κοινά είδη του γένους που προκαλούν ασθένειες είναι *A. fumigatus* και *A. flavus* και *A. clavatus* το οποίο είναι το κύριο αίτιο αλλεργιών στον άνθρωπο. (Ηλιόπουλος, 2004)



### 1.2.2. Μορφολογία των ειδών του γένους *Aspergillus*.

Το βλαστικό μυκήλιο των μυκήτων του γένους *Aspergillus* αποτελείται από διακλαδιζόμενες υφές με εγκάρσια διαχωριστικά διαφράγματα (septa), οι οποίες μπορεί να είναι άχρωμες ή έγχρωμες ή τοπικά έγχρωμες. Έχουν καλά αναπτυγμένο μυκήλιο με υφές που διακλαδίζονται έντονα και φέρουν απλά διαφράγματα.

Διακρίνονται από την ιδιομορφία τους να παρουσιάζονται στην φύση με δυο συνήθως μορφές, την τέλεια που μπορεί να πολλαπλασιάσει το παθογόνο εγγενώς, και την ατελή (που ανήκει στους Αδηλομύκητες) που απαντά συχνότερα και το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της διάρκειας του βιολογικού κύκλου τους.

Το ακραίο τμήμα της υφής, κατά την αγενή αναπαραγωγή φέρει τα σπόρια (κονίδια) και ονομάζεται κονιδιοφόρος. Οι κονιδιοφόροι παράγονται απευθείας από το μυκήλιο σαν πλευρικές διακλαδώσεις ειδικών, εξειδικευμένων «κυττάρων» των υφών τα οποία είναι ευμεγέθη, με παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα και είναι γνωστά σαν βασικά κύτταρα ή «foot cells». Είναι σχετικά μακριές και καταλήγουν σε μια κύστη (vesicle). Από την επιφάνεια της ώριμης κύστης εκφύονται ειδικά καρποφόρα φιαλοειδή κύτταρα γνωστά σαν φιαλίδια (sterigmata). Τα φιαλίδια παράγουν κονίδια σε αλυσίδες (εικόνα 1.3). Τα φιαλίδια μπορεί να είναι σε μια σειρά, οπότε το είδος αυτό διάταξης ονομάζεται μονοστοιβαδικό, ή σε δυο σειρές η μια πάνω στην άλλη. Το είδος αυτής της διάταξης των φιαλιδίων ονομάζεται διστοιβαδικό. Στο διστοιβαδικό είδος τα κονίδια παράγονται από την δεύτερη στοιβάδα φιαλιδίων (Χριστιάς, 1999). Τα δε κονιδιά τους είναι συνήθως μικρά, στρογγυλά σε αλυσίδες. Το χρώμα, το σχήμα, το μέγεθος των κονιδιοφόρων, των κεφαλών, των στηριγμάτων και των κονιδίων αποτελούν ταξινομικά χαρακτηριστικά του γένους.

Σε ορισμένα είδη βρίσκονται ασκοκάρπια, τα οποία παράγουν ασκοσπόρια σε ασκούς και μέσα σε λίγες εβδομάδες. Τα ασκοκάρπια που σχηματίζουν αυτά τα είδη ονομάζονται κλειστοθήκια. Είναι σφαιρικά ή σφαιροειδή χωρίς εξαρτήματα με λεία κίτρινα τοιχώματα και τελείως κλειστά. Η ελευθέρωση των ασκών και των ασκοσπορίων από το κλειστοθήκιο γίνεται με διάρρηξη του τοιχώματος του. Οι ασκοί

τους σχηματίζονται σε όλα τα επίπεδα του κλειστοθηκίου, διαθέτουν μονά τοιχώματα και στερούνται στηριγμάτων. Είναι ωοειδείς απιοειδείς ή σφαιρικοί και διαλύονται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά το σχηματισμό των ασκοσπορίων, οπότε αυτά διακινούνται ελευθέρως μέσα στο κλειστοθήκιο. (Ηλιόπουλος 2004, Τζάμος, 2007).

Ορισμένα είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus* σχηματίζουν σκληρώτια ή ψευδοσκληρώτια και σε ορισμένες περιπτώσεις παράγουν ασκοσπόρια τα οποία απαιτούν μήνες για να ωριμάσουν (Baker & Bennett, 2008).



**Εικόνα 1.3:** Μακροσκοπική (α) και μικροσκοπική παρατήρηση (β) μύκητα του γένους *Aspergillus* spp. **A)** Αποικία μύκητα του γένους *Aspergillus* spp και **B)** κονιδιοφόρος που φέρει σπόρια (κονίδια) επάνω στην κεφαλή του (SEM) (πηγή: <http://www.insectimages.org> και <http://faculty.ccbcmd.edu/>).

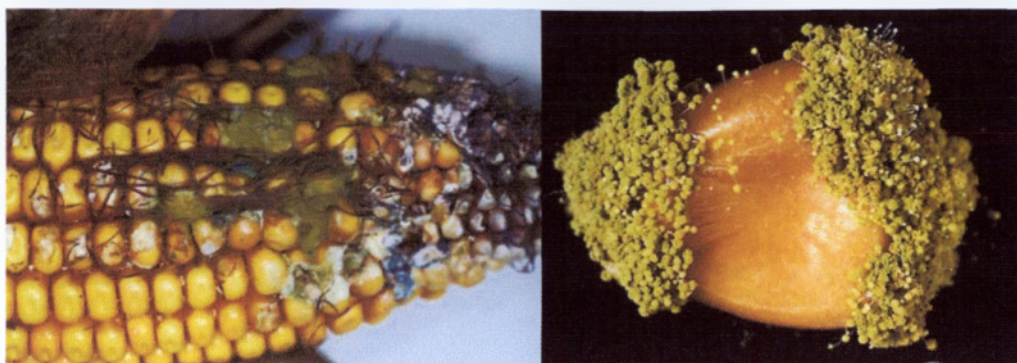
### 1.2.3. Τα φυτοπαθογόνα και η παθογένεια των ειδών του γένους *Aspergillus*.

Ο φυσικός χώρος των *Aspergillus* είναι το έδαφος, μέσα στο οποίο επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σε οργανικά κατάλοιπα. Παρότι αυτό το είδος μύκητα δεν είναι το πλέον διαδεδομένο στον πλανήτη, αποτελεί έναν από τους συχνότερα αερομεταδιδόμενους μύκητες (Latge JP. 1999).

Τα φυτοπαθογόνα είδη του γένους των *Aspergillus* είναι τα *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. ochraceoroseus*, *A. bombycis*, *A. oryzae*, *A. sojae*, και *A. niger* και παρασιτούν σε σπόρους σιτηρών, καλαμποκιού, αραχίδας, βαμβακιού και σταφίδας, σε ξηρούς καρπούς αλλά και σε γαλακτοκομικά και ζωικά προϊόντα.

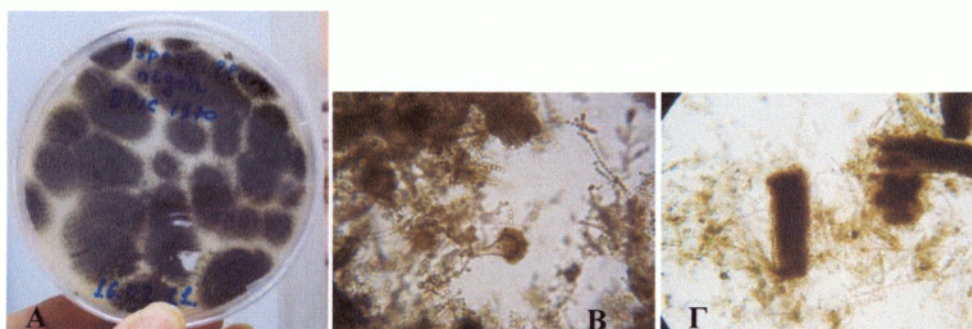
Από αυτά το πιο διαδεδομένο είναι το είδος *A. flavus*, το οποίο είναι ένα προαιρετικό φυτοπαθογόνο των αναπτυσσόμενων καρπών κυρίως του καλαμποκιού, του βαμβακιού, της αραχίδας και των ξηρών καρπών. Τα είδη της ομάδας *A. flavus* είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Απομονώνονται συχνά από εδάφη, κυρίως των τροπικών και υποτροπικών περιοχών, από ζωοτροφές και φυτικά υλικά σε αποσύνθεση, σε αποθηκευμένους σπόρους και σιτηρά και από διάφορα άλλα προϊόντα (φρούτα, αποξηραμένους καρπούς κ.α.). Συνεισφέρουν στις διεργασίες της αποσύνθεσης σε υψηλά επίπεδα υγρασίας, γι' αυτό και δεν παίζουν κυρίαρχο ρόλο σε σχέση με άλλα είδη μυκήτων που απαιτούν χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας. Δεν είναι επιθετικό παθογόνο και η αποίκισή του συχνά απαιτεί το φυτό-ξενιστή να έχει κατεσταλμένη άμυνα, συνήθως λόγω ξηρασίας και θερμοκρασιακού στρες. Η παρουσία του κυρίως σχετίζεται με τραυματισμένους καρπούς όπου μπορεί να εισβάλει και να τους μολύνει με αφλατοξίνη (εικόνα 1.4).

Αν και είναι προαιρετικό παθογόνο είναι πολύ καλά προσαρμοσμένο στην αποίκιση καρπών και μόνο λίγοι άλλοι μύκητες προσβάλλουν και αποικίζουν καρπούς παρουσία του *A. flavus*. Αυτή η καλή προσαρμογή υποδηλώνει ότι ο μύκητας έχει μια μοναδική ομάδα γονιδίων απαραίτητη για την αποίκισή τους στους καρπούς, ή διαφορετικά, έχει ικανότητες ανταγωνιστικής υπεροχής. Μελέτες στην αραχίδα έδειξαν ότι ο *A. flavus* είναι ο κυρίαρχος μύκητας σε τραυματισμένους καρπούς αν και αντιπροσωπεύει μόλις το 1% της πανίδας του εδάφους.



**Εικόνα 1.4:** Προσβολή καρπών καλαμποκιού από τον μύκητα *Aspergillus flavus* (πηγή: [http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson\\_r/A\\_flavus3.html](http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/A_flavus3.html)).

Γενικά, όμως λίγοι καρποί ενός δέντρου ή ενός φυτού μολύνονται από τον *A. flavus*, αλλά δυστυχώς ακόμη και ένας περιορισμένος αποικισμός οδηγεί σε παραγωγή αφλατοξίνης σε συγκεντρώσεις πάνω από το θεσμοθετημένο αποδεκτό όριο. Μόλυνση μπορεί να προκληθεί και σε μετασυλλεκτικό στάδιο εάν οι καρποί ή οι ζωοτροφές δεν αποθηκευθούν σε κατάλληλο περιβάλλον (Yu et al., 2008).



**Εικόνα 1.5.** Α. Καλλιέργεια του *A. flavus* σε PDA. Β, Γ. Οι κονιδιοφόροι και τα κονίδια σε αλυσίδες του μύκητα *Aspergillus niger* (προσωπικό αρχείο Μ. Παπαδοπούλου).

Ορισμένα είδη είναι παθογόνα στον άνθρωπο, τα ζώα και τα έντομα. Η ικανότητα των Ασπεργίλλων να αναπτύσσονται σε πολλά και διαφορετικά υποστρώματα σε μεγάλο σχετικά εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών έδωσε τη δυνατότητα σε ορισμένα είδη να αποικούν τόσο σε ζωντανούς όσο και σε νεκρούς ζωικούς ιστούς. Συμπεριφέρονται δηλαδή τόσο ως παράσιτα όσο και ως σαπρόφυτα.



Στον άνθρωπο τα είδη του γένους *Aspergillus* προκαλούν τρεις τύπους ασθeneιών:

- i. *Λοίμωξη*. Το αποτέλεσμα της εισβολής του μύκητα σε ζωντανούς ιστούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις ορισμένα είδη ασπεργίλλων γίνονται ευκαιριακά παθογόνα σε ανοσοκατεσταλμένους. Αυτές ονομάζονται μυκώσεις. Εκτός από ισχυρές τοξίνες είδη του γένους *Aspergillus* όπως τα *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* προκαλούν αρρώστιες γνωστές σαν ασπεργιλλώσεις. Εισπνοή κονιδίων των παραπάνω μυκήτων μπορεί να προκαλέσει σημαντική φλεγμονή των πνευμόνων (Χριστιάς, 1999).
- ii. *Αλλεργία*. Σχετίζεται με την εισπνοή κονιδίων ή άλλης μορφής επαφής με το μύκητα.
- iii. *Τοξίκωση*. Αποτέλεσμα της κατάποσης τροφής μολυσμένης με τοξικούς μεταβολίτες του μύκητα. Ανάλογα με το όνομα της τοξίνης από την οποία προκαλείται η ασθένεια παίρνει το όνομά της η τοξίκωση π.χ. από την αφλατοξίνη προκαλείται αφλατοξίκωση. Οι τοξικοί μεταβολίτες που παράγονται από ορισμένα είδη του γένους *Aspergillus* επηρεάζουν τον άνθρωπο και τα ζώα με δύο τρόπους. Πρώτον, τα στοιχεία δείχνουν ότι τα παθογόνα είδη παράγουν εξωτοξίνες και ενδοτοξίνες κατά την ανάπτυξή τους σε ζωντανούς ιστούς και δεύτερον τα σαπροφυτικά ή παθογόνα είδη που αναπτύσσονται σε υποστρώματα τα οποία αργότερα χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα από τον άνθρωπο και τα ζώα παράγουν τοξικές ουσίες, οι οποίες απορροφώνται κατά την πέψη και δρουν σε διάφορα συστήματα του σώματος. Οι ασθένειες που προκαλούνται με τον δεύτερο τρόπο δράσης ονομάζονται μυκοτοξικώσεις. Οι δράσεις αυτών των τοξινών στο σώμα ποικίλλει από μείωση της ανάπτυξης μέχρι καρκινογένεση και θνησιμότητα (Adams & Moss, 2008).

Το είδος *A. flavus* παράγει μια ομάδα μυκητοτοξινών που είναι γνωστές σαν αφλατοξίνες (aflatoxins). Μια από αυτές η Αφλατοξίνη Β1 είναι ισχυρότατο καρκινογόνο. Η αφλατοξίνη προσδένεται σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο στα θηλαστικά και προκαλεί μια ειδική σημειακή μετάλλαξη (Valkmann *et. al.*, 1994). Εκτός από τις αφλατοξίνες, είδη του γένους *Aspergillus* παράγουν και άλλες μυκητοτοξίνες τις οχρατοξίνες (ochratoxins) γνωστή και σαν νεφροτοξίνες που καταστρέφουν το ήπαρ και το πάγκρεας. Άλλες τοξίνες που παράγονται από είδη του

γένους *Aspergillus* είναι η κιτρινίνη που καταστρέφουν το πάγκρεας και η πατουλίνη που προκαλεί αιμορραγία των πνευμόνων και του εγκεφάλου. Μια ισχυρότατη τοξίνη είναι και το κυκλικό πεπτίδιο μαλφορμίνη A το οποίο είναι πολύ τοξικό στα θηλαστικά και προκαλεί καρκινογένεση στα φυτά. (Griffim 1994).

Τα κονίδια, όταν απελευθερώνονται, διασπείρονται στην ατμόσφαιρα μέσω των ρευμάτων του αέρα. Έχοντας μια διάμετρο αρκετά μικρή (2–3 μm), εισπνεόμενα εισχωρούν μέχρι τις κυψελίδες. Περιβαλλοντικές εκτιμήσεις δείχνουν ότι όλοι οι άνθρωποι εισπνέουν καθημερινά εκατοντάδες σπόρια *A. fumigatus*. 16–18. Για το λόγο αυτό, στους περισσότερους ασθενείς πύλη εισόδου είναι οι αεροφόρες οδοί και η νόσος εκδηλώνεται πρωταρχικά στους πνεύμονες, αν και ουσιαστικά μπορεί να διασπαρεί σε οποιοδήποτε όργανο και κυρίως σε ασθενείς με σοβαρούς προδιαθεσικούς παράγοντες. Έχουν παρατηρηθεί και άλλες εστίες λοιμώξεων, όπως δερματικές, περιτοναϊκές, νεφρικές, οστικές, οφθαλμικές, καθώς και λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος, αλλά δεν εμφανίζονται τόσο συχνά και δεν συζητούνται στο άρθρο αυτό. Η εισπνοή σπορίων από ανοσοεπαρκή άτομα σπάνια προκαλεί νόσο, καθότι τα σπόρια αποβάλλονται σχετικά εύκολα και επαρκώς από τους ενδογενείς ανοσοποιητικούς μηχανισμούς. Τα τελευταία 10 χρόνια, ο *A. fumigatus* έγινε ο επικρατέστερος μυκητιακός αερομεταδιδόμενος παθογόνος παράγοντας, ο οποίος προκαλεί σοβαρή και κάποτε καταληκτική λοίμωξη σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, στις αναπτυγμένες χώρες. Παρά το γεγονός ότι ο *A. fumigatus* ευθύνεται για το 90% των λοιμώξεων σε ανθρώπους, δεν είναι ο μόνος παθογόνος παράγοντας αυτού του είδους. Οι *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* και *A. nidulans* μπορούν επίσης να προκαλέσουν λοίμωξη στον άνθρωπο (Dixon, Walsh. 1992., Latge, 1999., Δημητρόπουλος, Φιλίππου, 2008).

Οι πρώτες έρευνες για την αερομεταδιδόμενη μυκητιακή χλωρίδα άρχισαν στην Αθήνα το 1971 και συνέδεσαν τον *Aspergillus* και άλλους μύκητες (*Penicillium*, *Candida*, *Rhodotorula* και *Mucor*) με τον ατμοσφαιρικό αέρα της πρωτεύουσας, τις εποχές και τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της υγρασίας. (Paravassiliou, Bartzokas, 1975). Πιο πρόσφατες έρευνες απέδειξαν την ύπαρξη του μύκητα σε όλα τα δείγματα που ελήφθησαν τυχαία από παράκτια ύδατα της βόρειας Ελλάδας και στο 98,9% των δειγμάτων δύο μεγάλων ποταμών της χώρας (Αλιάκμονας και Αξιός). Στο νοσοκομειακό περιβάλλον μελετήθηκαν αέρας, διάφορες επιφάνειες και πόσιμο νερό



σε τμήματα ασθενών υψηλού κινδύνου, σε τρεις μεγάλες πόλεις. Το μυκητιακό φορτίο του αέρα βρέθηκε χαμηλότερο το χειμώνα και υψηλότερο το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, αλλά σπάνια πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Στους νηματοειδείς μύκητες (*Cladosporium carrionii*, *Phialophora verrucosa*, *Madurella mycetomatis*, *Aspergillus* spp, *Mucor* spp κ.ά.), που απομονώθηκαν, ο *Aspergillus* spp αντιπροσώπευε το 70,5%, με κύρια στελέχη τους *A. niger*, *A. flavus* και *A. fumigatus*. Τα υψηλότερα φορτία, που παρατηρήθηκαν στην Αθήνα και τη Θεσσαλονίκη, αποδόθηκαν σε διάφορες παράπλευρες εργασίες ανακαίνισης των χώρων. Επίσης, νηματοειδείς μύκητες και βλαστομύκητες ανέδειξε και το 60% όλων των επιφανειών που εξετάστηκαν, ενώ θετικά δείγματα βρέθηκαν σε νοσοκομείο του Ηρακλείου στο πόσιμο νερό. Υψηλά ποσοστά παρουσίας *Aspergillus* spp εντοπίστηκαν και στο επεξεργασμένο νερό και τους διαλύτες, σε έρευνα όλων των μονάδων αιμοκάθαρσης της χώρας (Arvanitidou, et. al. 2000).

Επιπρόσθετα, ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό ασθενών με ατοπία παρουσιάζει θετικές δερματικές δοκιμασίες σκαριφισμού στον *Aspergillus* spp, που σημαίνει ότι τα άτομα αυτά μολύνθηκαν και ανέπτυξαν μηχανισμούς υπερευαισθησίας (Δημητρόπουλος, Φιλίππου, 2008).

### 1.3. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *PENICILLIUM*

Όπως ο *Aspergillus* έτσι και το *Penicillium* υπάρχει παντού στη φύση και μαζί με τα είδη αυτά προκαλούν ζημιές στη συγκομιδή φρούτων. Είδη του γένους *Penicillium* είναι παθογόνα του ανθρώπου και των φυτών. Το είδος *P. marneffei*, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι είναι παθογόνο του ανθρώπου. Άλλα είδη του γένους χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διαδικασίες για παραγωγή προϊόντων, όπως οργανικά οξέα (φουμαρικό, οξαλικό, γλυκονικό), ένζυμα, αντιβιοτικά κ.λπ. Το *Penicillium roquefortii* χρησιμοποιείται για παραγωγή του τυριού ροκφόρ, ενώ το *P. chrysogenum* χρησιμοποιείται για την παραγωγή πενικιλίνης.

### 1.3.1. Ιστορική αναδρομή και ταξινομικά στοιχεία.

Το γενικό όνομα *Penicillium* Link, που στα λατινικά σημαίνει μικρή βούρτσα, εκδόθηκε για πρώτη φορά το 1809. Στη δημοσίευσή του, ο Link περιγράφει τρία είδη του γένους *Penicillium* το *P. candidum* L., *P. expansum* L. και *P. glaucum* L., με βάση τη μορφολογία των δομών που μοιάζουν με βούρτσα. Το 1824, ο Link εγκατέλειψε τα ονόματα *Penicillium candidum* και *expansum*, τοποθετώντας όλα τα είδη του γένους *Penicillium* spp. υπό το όνομα *P. glaucum*. Η κίνηση αυτή βέβαια ήταν ατυχής καθώς πολλοί άλλοι ερευνητές έκαναν το ίδιο, πράγμα που οδήγησε το όνομα *P. glaucum* να αναφέρεται σε περισσότερα του ενός είδη με αποτέλεσμα η ταξινόμηση των ειδών του γένους να είναι προβληματική. Στη συνέχεια ένας μεγάλος αριθμός ειδών *Penicillium* έχουν περιγραφεί από το 1830 έως το 1900. Λόγω της έλλειψης μεθόδων καλλιέργειας, η περιγραφή των ειδών βασίστηκε κυρίως στην ανάπτυξή τους στα φυσικά υποστρώματα. Επειδή όμως η μορφολογία είναι αποτέλεσμα των περιβαλλοντικών συνθηκών πολλά από τα είδη αυτά δεν μπορούσαν να ταυτοποιηθούν. Ο Brefeld (1874) ήταν ο πρώτος που τόνισε την σημασία των μεθόδων καλλιέργειας στη μορφολογία των ειδών. Αν και ποτέ δεν έδωσε κάποια περιγραφή για το *P. glaucum*, έδωσε εικόνες για τα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του, συμπεριλαμβανομένης και της τέλειας μορφής του.

Ο Charles Thom (1872-1956) συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση του *Penicillium* όπως το γνωρίζουμε σήμερα. Είχε αφιερώσει το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς του στην ταξινόμηση των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* με πολλές από τις ιδέες του να χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα. Η αναγνώριση της σημασίας των σταθερών μέσων ανάπτυξης και του ρόλου της θερμοκρασίας στην περιγραφή των ειδών ήταν μόνο μερικά από την συνεισφορά του. Το πρώτο μεγάλο έργο του, δημοσιεύτηκε το 1910, στο οποίο περιέγραφε 13 νέα είδη του γένους *Penicillium* ενώ η πραγματική και σημαντικότερη συμβολή του στην ταξινόμηση του γένους ήταν το έργο του, "The Penicillia" (1930), στο οποίο περιέγραφε 300 περίπου είδη του γένους.

Ο Thom ήταν αυτός που έθεσε τα θεμέλια για τους Raper και Fennel ώστε να κάνουν το επόμενο μεγάλο βήμα στην ταξινόμηση του είδους. Σε συνεργασία με τον Thom δημοσίευσαν το έργο "The Manual of the Penicillia" το 1949, η σαραντάχρονη

εμπειρία του Thom και η κατανόηση του γένους χρησιμοποιήθηκαν από τους νεότερους ως οδηγός για την συγγραφή του βιβλίου. Δεν είναι άλλωστε τυχαίο πως ο Rarey χρησιμοποίησε τις ίδιες έννοιες στην ταξινόμηση με αυτές που είχε αναφέρει πρώτος ο Thom (1930). Εξέτασαν όλα τα γνωστά είδη τα οποία είχαν καλλιεργηθεί και μείωσαν τον αριθμό των 300 διαφορετικών ειδών σε μόλις 137 είδη, τα οποία διαχώρισαν σε 4 κλάσεις και 41 σειρές. Με την σειρά τους οι προσπάθειες του Rarey για την κατανόηση της σημασίας του μέσου ανάπτυξης και τον ρόλο της θερμοκρασίας στην ταυτοποίηση και ταξινόμηση του γένους *Penicillium* αποτέλεσαν τα θεμέλια για την συγγραφή ενός ακόμη μονογράφου 30 χρόνια μετά από τον Pitt (1979).

Από το 1979 και μέχρι σήμερα το σύγγραμμα του Pitt για το γένος *Penicillium* αποτελεί πρότυπο για την ταυτοποίηση ειδών του γένους. Ο Pitt για ακόμη μια φορά τόνισε τη σημασία των συνθηκών και του χρόνου ανάπτυξης των αποικιών του γένους ως κριτήρια για τον μορφολογικό χαρακτηρισμό των ειδών. Επειδή ο χρόνος επώασης παίζει σημαντικό ρόλο στη διάμετρο των αποικιών αλλά και σε χαρακτηριστικά όπως το χρώμα των κονιδίων, ο Pitt συνιστά τις επτά ημέρες επώασης στους 25°C ως άριστες συνθήκες ανάπτυξης του γένους. Παρά το ότι ήταν γνωστό πως η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά της αποικίας, ο Pitt ήταν ο πρώτος που συνειδητοποίησε την ταξινομική σημασία της θερμοκρασίας και περαιτέρω καινοτόμησε με την χρήση θρεπτικού μέσου ανάπτυξης με μειωμένη τη δραστηριότητα του νερού ως έναν σημαντικό ταξινομικό κριτήριο. Ο Pitt αποδέχθηκε 97 είδη, τα οποία διαιρέθηκαν σε 4 υποείδη, 10 κλάσεις και 21 σειρές (Visagie, 2008).

**Πίνακας 1.3.** Ταξινομική κατάταξη των μυκήτων του γένους *Penicillium*.

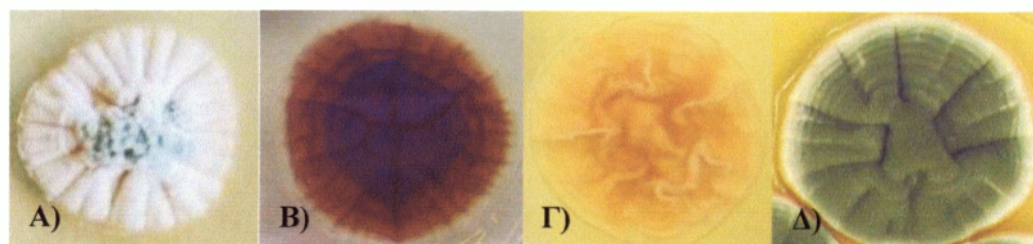
Βασίλειο: <b>FUNGI (MYCOTA)</b>	<b>Βασίλειο: FUNGI</b>
Φύλο: <b>ASCOMYCOTA</b>	<b>Διαίρεση: EUMYCOTA</b>
Κλάση: <b>Plectomycetes.</b>	<b>Υποδιαίρεση:</b>
Τάξη: <b>Eurotiales</b>	<b>DEUTEROMYCOTINA</b>
	Κλάση: <b><i>Hyphomycetes</i></b>
Γένος: <b><i>Talaromyces</i></b>	Τάξη: <b>Moniliales</b>
<b>(<i>Penicillium</i>)</b>	Οικογένεια: <b>Moniliaceae</b>
	Γένος: <b><i>Penicillium</i></b>

Με τα σύγχρονα μυκητολογικά δεδομένα το γένος *Penicillium* διαιρείται στα υπογένη *Binerticillium* που συνδέεται με τέλειες μορφές του γένους *Talaromyces* όπου ανήκει και ο ανταγωνιστικός βιολογικός παράγοντας *Talaromyces flavus* (συν. *Penicillium vermiculatum*) και το υπογένος *Penicillium* που χαρακτηρίζεται από την απουσία σχηματισμού τέλειας μορφή.

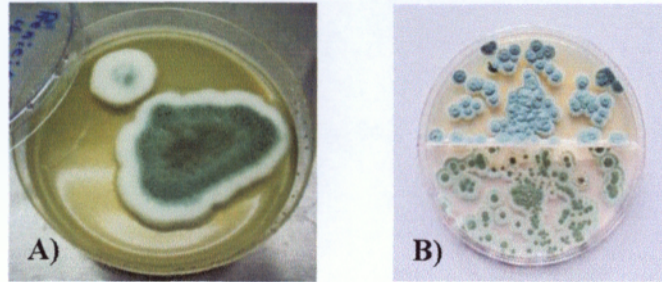
### 1.3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Penicillium*

#### 1.3.2.1 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

- ❖ **Το μυκήλιο του μύκητα.** Σαν ανώτερη κατηγορία μυκήτων τα είδη του γένους *Penicillium*, έχουν καλά αναπτυγμένο «πολυκύτταρο» μυκήλιο που διαχωρίζεται με σέπτα απλού τύπου.
- ❖ **Το χρώμα της αποικίας.** Συνήθως το χρώμα της αποικίας υπόκειται σε ερμηνεία του ερευνητή ωστόσο εξακολουθεί αν αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για την ταξινόμηση των ειδών. Το χρώμα των κονιδίων διακρίνεται με γυμνό μάτι και αποτελεί χαρακτηριστικό διάκρισης των ειδών του γένους *Penicillium*. Στην εικόνα 1.6 δίνονται αποικίες από συγκεκριμένα είδη του γένους *Penicillium* των οποίων τα μυκήλια έχουν διαφορετικά χρώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το χρώμα της αποικίας δημιουργείται από την συνολική εικόνα των κονιδίων χωρίς το μυκήλιο να έχει ένα συγκεκριμένο χρώμα.

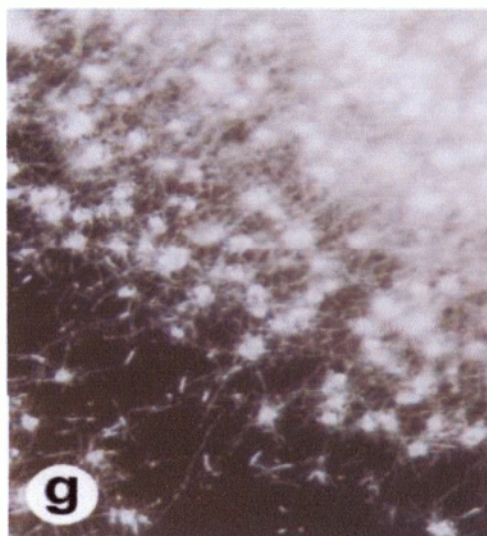


**Εικόνα 1.6:** Αποικίες του γένους *Penicillium* spp. σε άγαρ σακχαρόζης μετά από επτά ημέρες επώασης στους 25°C. Α) *P. verrucosum* or *P. nordicum*, Β) *P. verrucosum* (reverse), Γ) *P. nordicum* (reverse) και Δ) *P. viridicatum* (πηγή: Cabañes et al., 2010).



Εικόνα 1.7. Α. Αποικία του *Penicillium italicum* σε PDA (εργαστήριο φυτοπαθολογίας του ΑΤΕΙ Καλαμάτας). Β. Αποικίες του είδους *P. verrucosum* σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ (πηγή: <http://www.lgl.ch/>).

- ❖ **Τα σκληρώτια.** Μερικά είδη του γένους *Penicillium* παράγουν σκληρώτια τα οποία αποτελούν ταξινομικά χαρακτηριστικά. Τα σκληρώτια ορίζονται ως σκληρές δομές, οι οποίες δεν ξεχωρίζουν από τα ανώριμα κλειστοθήκια. Σύμφωνα με τον Pitt (1979), όταν παρατηρούμε τα σκληρώτια πρέπει να ληφθούν υπόψη το χρώμα και το μέγεθος αυτών (εικόνα 1.7).
- ❖ **Τα κλειστοθήκια.** Αποτελούν κλειστή σφαιρική ή υποσφαιρική εγγενής καρποφορία των ασκομυκήτων που αναπτύσσεται σε επιφάνειες παρασιτούμενων οργάνων και περιέχει ασκούς με ασκοσπόρια.

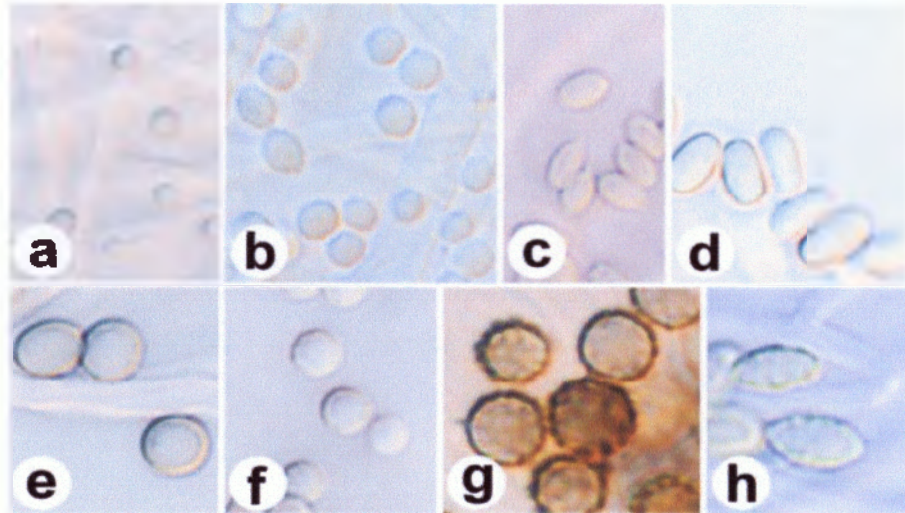


Εικόνα 1.7: Σκληρώτια του γένους *Penicillium* μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο (πηγή: Visagie, 2008).

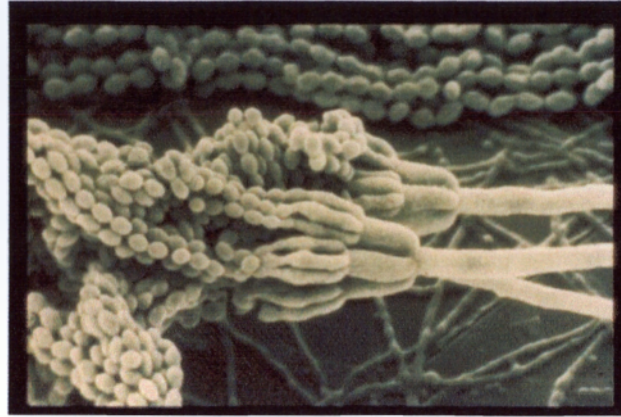


### 1.3.2.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά

- ❖ **Κονίδια.** Οι κονιδιοφόροι παράγονται απ' ευθείας από το μυκήλιο. Τα άκρα τους διακλαδίζονται έντονα και παράγουν κονίδια σε αλυσίδες. Τα είδη του γένους *Penicillium* σχηματίζουν κονίδια με μια μεγάλη ποικιλία σχημάτων όπως σφαιροειδή (*P. melinii*), οβάλ (*P. expansum*), ελλειψοειδές (*P. chloroloma*) και κυλινδρικά (*P. digitatum*). Τα τοιχώματα των κονιδίων μπορεί να είναι ομαλά, τραχύ, ακανθώδη ή γραμμωτά. Τα κονίδια είναι σχεδόν πάντα χρωματιστά δίνοντας το χαρακτηριστικό χρώμα στην κάθε αποικία (εικόνα 1.8).

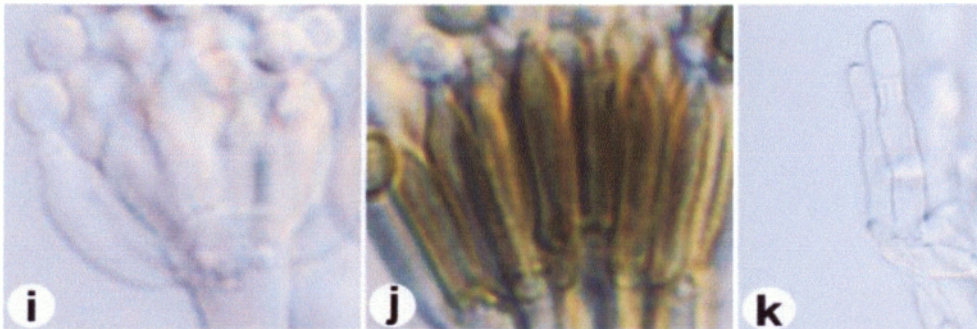


**Εικόνα 1.8:** Διάφορα σχήματα των κονιδίων του γένους *Penicillium*. *a)* σφαιροειδή, *b)* οβάλ, *c)* ελλειψοειδή, *d)* κυλινδρικά και διάφορες υφές τοιχωμάτων των κονιδίων *e)* ομαλά, *f)* τραχύ, *g)* ακανθώδη και *h)* γραμμωτά (πηγή: Visagie, 2008).



*Εικόνα 1.9.* Κονίδια και κονιδιοφόροι του γένους *Penicillium* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως. Παρατηρείται οι διακλάδωση των ακραίων τμημάτων των κονιδιοφόρων (στηρίγματα) από τα οποία σχηματίζονται κονίδια σε αλυσίδες.

- ❖ **Σχήματα φιαλίδων.** Οι φιαλίδες είναι τα κονιδιογόνα κύτταρα που δίνουν την αφορμή για την παραγωγή εκατομμυρίων κονιδίων σε μια αποικία *Penicillium*. Οι φιαλίδες είναι κυρίως σε σχήμα αμπούλας εκτός από το υπογένος *Biverticillium*, το οποίο παράγει λεπτόστενες φιαλίδες. Είδη όπως το *P. digitatum* και το *P. italicum* παράγουν κυλινδρικές φιαλίδες χαρακτηριστικές για την αναγνώριση του είδους (εικόνα 1.10).



*Εικόνα 1.10:* Διαφορετικά σχήματα φιαλίδων του γένους *Penicillium* spp. *i*) σχήμα αμπούλας, *j*) λεπτόστενο σχήμα και *k*) κυλινδρικό σχήμα (πηγή: Visagie, 2008).

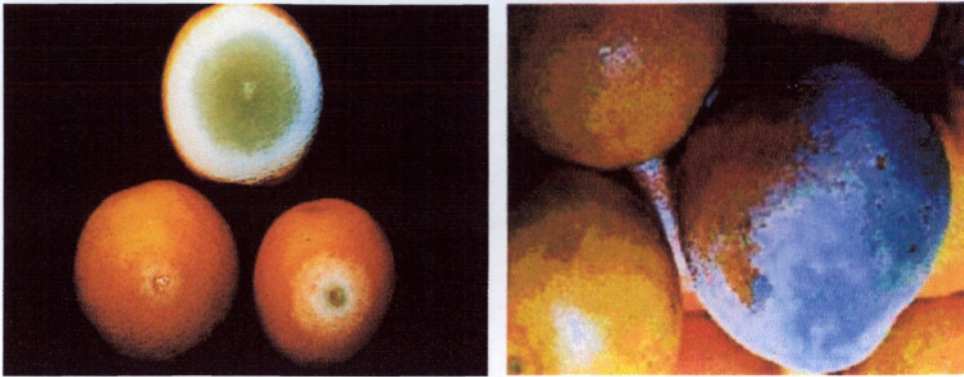
### 1.3.3 Φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Penicillium*

Τα πιο σημαντικά από τα φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Penicillium* είναι τα *P. verrucosum* και *P. nordicum*. Μάλιστα, τα δυο αυτά είδη είναι τα μόνα που παράγουν την μυκοτοξίνη οχρατοξίνη από το γένος αυτό. Είδη όπως τα *P. italicum* *P. digitatum* *P. expansum* είναι παθογόνα που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις των φρούτων των εσπεριδοειδών, των μηλοειδών και άλλων φρούτων.

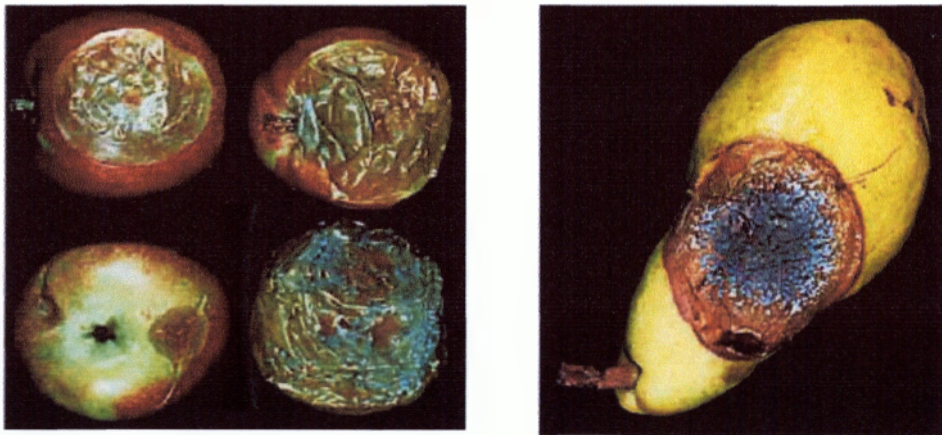
Το *P. verrucosum* είναι ένα πολύ σπουδαίο είδος καθώς είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός οχρατοξίνης στον τομέα των σιτηρών, όπως το σιτάρι, το κριθάρι, τη βρώμη και τη σίκαλη, σε εύκρατα και ψυχρά κλίματα. Αυτό το είδος είναι η κύρια πηγή μόλυνσης των σιτηρών που σχετίζονται με την γρίπη των χοίρων και την νεφροπάθεια των πουλερικών που ανιχνεύονται στις εύκρατες και ψυχρές χώρες όπως είναι η Δανία, η Σουηδία, ο Καναδάς και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής.

Στη Γαλλία το πρώτο εθνικό πρόγραμμα παρακολούθησης έδειξε ότι οι χοίροι εκτίθενται στην οχρατοξίνη μέσω των ζωοτροφών. Το ίδιο συνέβη με τα πουλερικά στα οποία εκτίθενται στην οχρατοξίνη μέσω της διατροφής τους η οποία αποτελείται από δημητριακά όπως το σιτάρι, αραβόσιτο, βρώμη και κριθάρι που είναι ευαίσθητα στη μόλυνση από την συγκεκριμένη μυκοτοξίνη. Πρόσφατη έρευνα έδειξε πως πάνω από το 80% των δειγμάτων συγκομιδής (συμπεριλαμβανομένων της σίκαλης, του κριθαριού και του σιταριού, μεταξύ άλλων) που περιείχαν τον *P. verrucosum*, δείχνοντας ότι η μόλυνση είχε γίνει πολύ πριν την ξήρανση και την αποθήκευση. Οι συντάκτες τόνισαν πως η πρόωρη μόλυνση με αυτό το είδος είναι λανθάνων κίνδυνος της παραγωγής οχρατοξίνης, εάν ο σπόρος δεν χειρίζεται σωστά μετά τη συγκομιδή (Cabañes et al., 2010).

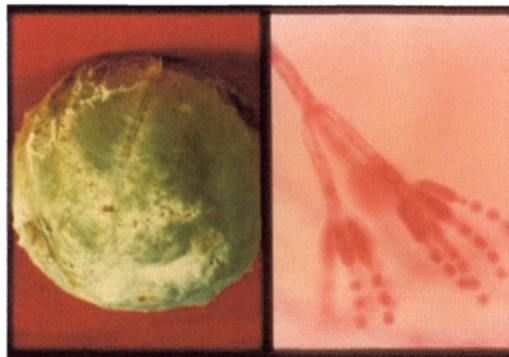




*Εικόνα 1.11. Penicillium digitatum (κν. Πράσινη μούχλα) που προσβάλλει κυρίως τα εσπεριδοειδή. Αλλά και Κρανή μούχλα*



*Εικόνα 1.12. P. expansum, P. italicum (κν. Κρανή μούχλα ) που προσβάλλουν κυρίως τα μηλοειδή.*



*Εικόνα 1.13. Penicillium digitatum (κν. Πράσινη μούχλα)*

Οι μετασυλλεκτικές ασθένειες που προκαλούν τα είδη του προαναφερόμενου γένους είναι γνωστές σαν μπλε ή πράσινη σήψη («Blue and green mold rots»). Πρόκειται για τις πιο συχνές και πιο καταστρεπτικές μετασυλλεκτικές ασθένειες όλων των νωπών καρπών και λαχανικών. Τα πιο διαδεδομένα είδη που είναι υπεύθυνα για τις σήψεις των αποθηκευμένων προϊόντων είναι τα *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι καρποί των φυτών εμφανίζουν αρχικά κυκλικές διαφόρου μεγέθους υδατώδεις ανοικτού καστανού χρώματος κηλίδες. Στην αρχή είναι επιφανειακές αλλά γρήγορα μεγαλώνουν σε έκταση και βάθος. (εικόνα 1.14). Οι προσβεβλημένοι ιστοί αποκτούν μια μαλακή υδαρή υφή και εύκολα αποχωρίζονται από τους υγιείς ιστούς με ελαφρά πίεση. Στην επιφάνεια των κηλίδων, σε προχωρημένο στάδιο της προσβολής και με υψηλή υγρασία, εμφανίζονται κατά θέσεις μπλε ή πράσινη στρογγυλή, πυκνή εξάνθηση από το μυκήλιο, κονιδιοφόρους και τα κονίδια του παθογόνου (κοινώς μαξιλαράκια). Οι εξανθήσεις αυτές είναι αρχικά λευκές αποκτούν σταδιακά κυανό ή πράσινο χρώμα. Οι προσβεβλημένοι καρποί έχουν χαρακτηριστική οσμή και γεύση μούχλας. Επιπροσθέτως, οι μύκητες του γένους *Penicillium* παράγουν διάφορες μυκοτοξίνες οι οποίες μολύνουν και τα προϊόντα που προέρχονται από μερικώς προσβεβλημένα φρούτα ή λαχανικά (χυμοί, σάλτσες κ.α.) (βλ. σχετικό κεφάλαιο). Τα είδη *Penicillium digitatum* που προσβάλλει κυρίως τα εσπεριδοειδή προκαλεί την κοινή «Πράσινη μούχλα» και τα *P. expansum*, *P. italicum* που προσβάλλουν κυρίως τα μηλοειδή, προκαλούν την λεγόμενη την κν. «Κυανή μούχλα».



**Εικόνα 1.14.** Προσβολή από *P. italicum* που προκαλεί την λεγόμενη κν. «Κυανή μούχλα». (πηγή προσωπικό αρχείο Μ. Παπαδοπούλου).



## 1.4. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *FUSARIUM*

Οι μύκητες αυτοί είναι προαιρετικά παράσιτα που ζουν ως παράσιτα ή σαπρόφυτα ανάλογα με το πλήθος τους. Παράγουν σταθερές δομές κυρίως με την μορφή χλαμυδοσπορίων ώστε να εξασφαλίζουν την διαβίωσή τους για πολλά χρόνια πριν την ανάπτυξή τους. Είναι ευρύτατα διαδεδομένα παγκόσμιως.

### 1.4.1. Ταξινόμηση των ειδών του γένους *Fusarium*

Το σύστημα αναγνώρισης και ταξινόμησης των ειδών του γένους *Fusarium* είναι πολύ περίπλοκο. Αν και περισσότερα από 80 είδη έχουν αναγνωρισθεί, υπάρχει ακόμη πρόβλημα στην αναγνώριση των ειδών μορφολογικά κυρίως λόγω των διαφορετικών συστημάτων ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές σε όλο τον κόσμο (Leslie & Summerell, 2006). Ωστόσο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά συνεχίζουν να είναι τα πιο σημαντικά κριτήρια για την ταξινόμηση των ειδών.

Μια συστηματική διαδικασία ταυτοποίησης ήταν απαραίτητη για τον προσδιορισμό της πολυπλοκότητας στην ταξινόμηση του *Fusarium*. Έτσι, μια συστηματική προσέγγιση, η οποία εισήχθη από τον Burgess et al. (1994) και τους Leslie & Summerell (2006) στα εγχειρίδια τους είναι πολύ χρήσιμη για τον προσδιορισμό των ειδών μορφολογικά.

Η μελέτη της ταξινόμησης του *Fusarium* άρχισε το 1809 από τον επιστήμονα Link. Ωστόσο, μια εντατική μελέτη σχετικά με το σύστημα ταξινόμησης έγινε από Wollenweber και Reinking (1935) ο οποίος εισήγαγε την χρήση των τμημάτων στην ταξινόμηση των ειδών *Fusarium* σε 16 κλάσεις, 65 είδη και 77 υποοικιλίες και μορφές. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του ταξινομικού συστήματος για το γένος *Fusarium*, πολλοί ερευνητές πρότειναν τα συστήματά τους μετά από εντατικές μελέτες βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Πρέπει να σημειωθεί πως οι ταξινομιστές χωρίστηκαν σε δυο μεγάλες ομάδες, οι οποίες χρησιμοποιούσαν διαφορετικά συστήματα για να περιγράψουν το γένος.

Ο Nelson et al. (1983) συνδύασε όλα τα συστήματα με τα αποτελέσματά του για να αναπτύξει μια πρακτική προσέγγιση στην αναγνώριση των ειδών του γένους *Fusarium*. Τελικά, ο αριθμός των ειδών μειώθηκε σημαντικά καθώς συνδυάστηκαν ποικιλίες και μορφές κάτω από συγκεκριμένα είδη.

Την βασική προσέγγιση του Nelson et al. (1983) και Burgess et al. (1994) αποδέχθηκαν πολλοί ερευνητές. Πρόσφατα οι Leslie και Summerell (2006) δημοσίευσαν το εργαστηριακό εγχειρίδιο για το *Fusarium* (*Fusarium Laboratory Manual*) που ενώνει όλα τα ταξινομικά συστήματα με τις τελευταίες τεχνολογίες και μεθόδους για την αναγνώριση των ειδών. Επιπλέον, ενσωματώνει την μορφολογική, βιολογική και φυλογενετική πλευρά των ειδών. Οι δυσκολίες και η πολυπλοκότητα του ταξινομικού συστήματος του *Fusarium* οφείλονται σε πολλούς παράγοντες όπως είναι η σύνδεση αναμόρφου-τελειομόρφου, οι σχέσεις μεταξύ των κλάσεων, ποικίλες μεταλλάξεις και η ταυτοποίηση των υποομάδων.

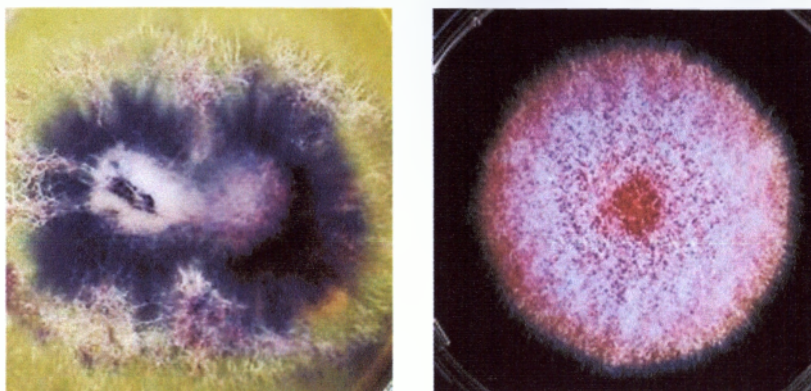
Συνήθως οι μύκητες με διπλή μορφή ζουν παρασιτικά με την ατελή μορφή τους (ως Δευτερομύκητες) και σαπροφυτικά με την τέλια τέλεια (ως Ασκομύκητες). Γι' αυτό έχουν επικρατήσει οι ονομασίες των ατελών μορφών τους. Όμως ορθότερο είναι να αναφέρονται με τις ονομασίες των τέλειων μορφών τους. Έτσι οι τέλειες μορφές των ειδών του γένους *Fusarium* κατατάσσονται κυρίως στο γένος *Gibberella*, και για μικρότερο αριθμό ειδών στα γένη *Hemanectria* και *Albonectria*, και ταξινομούνται στο φύλο *Ascomycota*, κλάση *Pyrenomycetes* Πυρηνομύκητες, επειδή κατά την εγγενή αναπαραγωγή παράγουν περιθήκια, και στην τάξη *Hypocreales*,

Με την ονομασία *Fusarium* τα είδη το γένος ανήκουν, στους Αδηλομύκητες ή Ατελείς μύκητες (*Deuteromycetes*), κλάση *Hyphomycetes*, και τάξη *Tuberculariales*, οικογένεια *Tuberculaliaceae*.

## 1.4.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Fusarium*

### 1.4.2.1 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

Ανήκουν στους ανώτερους μύκητες και σχηματίζουν μυκήλιο πολυκύτταρο.



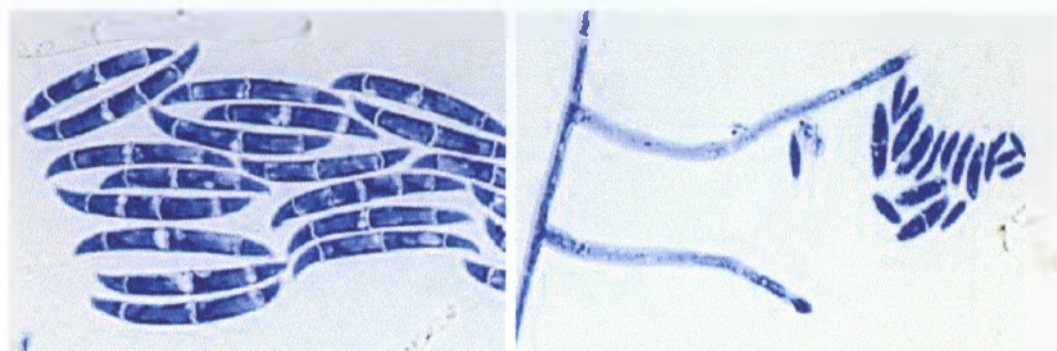
*Εικόνα 1.15. Καλλιέργειες των F. oxysporum με το μωβ χρώμα και F. subglutinans με το ροζ χρώμα (πηγή: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>).*

### 1.4.2.1 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά

Τα είδη του γένους *Fusarium* παράγουν τρεις τύπους αγενών σπορίων, τα μικροκονίδια, τα μακροκονίδια και τα γλαμυδοσπόρια. Ωστόσο η παρουσία των μακροκονιδίων είναι το σημαντικότερο χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για την διάκριση του *Fusarium* από τα άλλα γένη.

Τα **μακροκονίδια** σχηματίζονται στα σποροδοχεία και έχουν σχήμα μισοφεγγαριού ή μπαμπάνας με πολλά σέπτα. Στην πραγματικότητα υπάρχουν τρία σχήματα μακροκονιδίων, τα οποία είναι α) ευθύ σαν βελόνα, β) καμπυλωτό και γ) ραχιαίο καμπυλωτό. Επίσης, τα σχήματα των κορυφαίων κυττάρων και των κυττάρων της βάσης είναι πολύ σημαντικά στην αναγνώριση των ειδών του γένους. Τα κορυφαία κύτταρα μπορεί να είναι αμβλύ, γαντζωτά και στενά ενώ τα κύτταρα της βάσης να είναι επίμηκες, οδοντωτά ή λίγο οδοντωτά (εικόνα 1.8). Έχουν λεπτά τοιχώματα με 3 – 5 εγκάρσια χωρίσματα οξυκατάληκτα άκρα και διαστάσεων 27 – 46 X 3 – 5 μm (των 3

χωρισμάτων), 35 – 60 X 3 – 5 μm (των 5 χωρισμάτων) και 50 – 66 X 3,5 – 5 μm (των 6 - 7 χωρισμάτων).

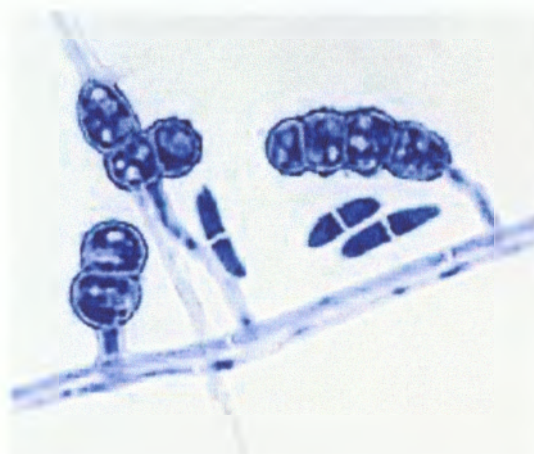


*Εικόνα 1.16: Μικροκονίδια και Μικροκονίδια του γένους Fusarium. Διακρίνονται το σχήμα (αριστερά) μπανάνας και τα πολυάριθμα σέπτα (πηγή: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>).*

Τα **μικροκονίδια** παράγονται μόνο στο εναέριο μυκήλιο από κονιδιογόνα κύτταρα και όχι από σποροδόχεια όπως τα μακροκονίδια. Υπάρχουν δύο τύποι κονιδιογόνων, οι μονοφιαλίδες και οι πολυφιαλίδες. Στην πρώτη κατηγορία υπάρχει μόνο ένα άνοιγμα ενώ στην δεύτερη υπάρχουν περισσότερα των δυο ανοίγματα ανά κύτταρο. Η διάταξη των μικροκονιδίων στα κονιδιογόνα κύτταρα είτε σε μεμονωμένες ψευδείς κεφαλές είτε σε αλυσίδες αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της αναγνώρισης των ειδών του γένους. Μάλιστα η απουσία ή παρουσία της μικροκονιδιακής αλυσίδας είναι βασικό χαρακτηριστικό των ειδών της κλάσης *Liseola*. Επιπλέον, τα σχήματα των μικροκονιδίων μπορεί να είναι ωσειδή, νεφροειδή αχλαδόσχημα, γογγυλοειδή, στρογγυλά και ατρακτοειδή διαστάσεως 5 – 12 X 2 – 3,5 μm (εικόνα 1.16).

Ένας άλλος τύπος σπορίων είναι τα **χλαμυδοσπόρια**, έχουν ένα παχύ τοίχωμα με λιπιδική ουσία που δίνει τη δυνατότητα στο μύκητα να επιβιώσει κάτω από αντίξες συνθήκες, ακόμη και έξω από τον ξενιστή. Μερικά μόνο είδη του γένους *Fusarium* παράγουν χλαμυδοσπόρια τα οποία αποτελούν σημαντικό χαρακτηριστικό αναγνώρισης των ειδών. Τα χλαμυδοσπόρια δημιουργούν σχηματισμούς μεμονωμένα, διπλά, σε μάζες ή σε αλυσίδες. Στο εργαστήριο ο σχηματισμός των χλαμυδοσπορίων παίρνει πολύ χρόνο, μερικές φορές πάνω από έξι εβδομάδες. Απαντώνται στο εναέριο μυκήλιο αλλά και ενσωματωμένα στο άγαρ. Η βλάστηση των χλαμυδοσπορίων

επηρεάζεται από το περιεχόμενο του νερού στα εδάφη και από τα εξιδρώματα των ριζών (εικόνα 1.17).



**Εικόνα 1.17:** Χλαμυδοσπόρια και μικροκονίδια του γένους *Fusarium* (πηγή: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>).

Το άλλο σημαντικό μορφολογικό χαρακτηριστικό είναι τα μεσοκονίδια. Είναι κονίδια μεγαλύτερα από τα μικροκονίδια με 3-4 σέπτα (διαφράγματα) και μικρότερα από τα μακροκονίδια. Αυτός ο τύπος κονιδίων παράγεται στο εναέριο μυκήλιο από τις πολυφιαλίδες. Επιπλέον, αποτελεί χαρακτηριστικό κριτήριο ταξινόμησης του είδους *F. semitectum*. Αυτά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Fusarium* επηρεάζονται ιδιαίτερα από την ένταση του φωτός, τη συγκέντρωση του νιτρικού αζώτου και το pH του μέσου καλλιέργειας (Leslie & Summerell, 2006).

### **1.4.3. Φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Fusarium***

Το γένος *Fusarium* έχει θεωρηθεί ως μια πολύ ενδιαφέρουσα και σημαντική ομάδα μυκήτων, κυρίως λόγω της ποικιλομορφίας του αλλά και επειδή είναι υπεύθυνο για πολλές ασθένειες φυτών, όπως είναι οι σήψη του ριζικού συστήματος των φυτών και ο μαρασμός τους (αδρομυκώσεις), σήψεις αποθηκευμένων προϊόντων καθώς και για την



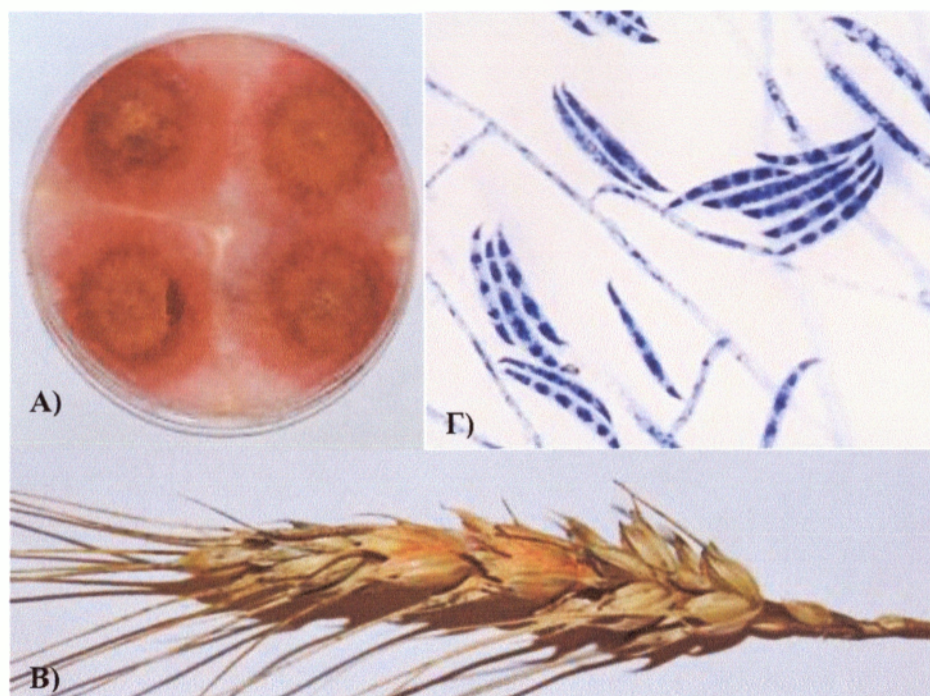
εμφάνιση τοξικόσεων και μυκόσεων τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα (Nelson et al., 1983; Summerell et al., 2003).

Όπως είναι ήδη γνωστό, τα περισσότερα είδη *Fusarium* είναι παθογόνα για τα φυτά. Τα συμπτώματα που προκαλούν είναι σήψεις του υπέργειου τμήματος, μάρανση των φυτών εξαιτίας προσβολής των αγγείων, σήψεις της ρίζας και έλκη. Κυρίως προκαλούν αδρομυκώσεις στα κηπευτικά (τομάτα, κρεμμύδι κ.α.). Κυριότερο είδος το *F. oxysporum*, το οποίο εμφανίζει διάφορες φυσιολογικές φυλές εξειδικευμένες κατά ξενιστή. Η πιο καταστροφική ζημιά που έχει προκαλέσει το γένος *Fusarium* στο Γεωργικό τομέα είναι η μόλυνση των Μπανανιών του Παναμά από το είδος *F. oxysporum* f sp. *cubense*, γνωστή ως ασθένεια του Παναμά, επηρεάζοντας όλους τους οικονομικούς τομείς της αγροτικής βιομηχανίας του Παναμά (Ploetz, 1990). Επίσης, άλλο ένα σημαντικό γεγονός που προκλήθηκε από το γένος αυτό είναι η ασθένεια γνωστή ως ψώρα του *Fusarium* η οποία μολύνει κυρίως το σιτάρι και το κριθάρι στις Ηνωμένες Πολιτείες. Άλλα ενδιαφέροντα είδη είναι το *F. monilifogme*, *F. culmorum*, *F. gramineum* (Παναγόπουλος, 1995, Βακαλουνάκης, 2006).

#### 1.3.4.1 *Fusarium graminearum* complex

Η πρόσφατη εκ νέου ταξινόμηση του είδους *F. graminearum*, ένα παγκόσμιο παθογόνο του σίτου και του αραβόσιτου, είναι αμφιλεγόμενη. Το είδος αυτό παράγει αρκετές μυκοτοξίνες, όπως είναι τα τρικυκλικά σεσκιτερπένια, τα οποία έχουν συσχετισθεί με χρόνιες και θανατηφόρες τοξικώσεις των ανθρώπων και των ζώων καθώς και η ζεαραλενόνη, η οποία έχει οιστρογονική δράση. Επιπλέον, το *F. graminearum* παράγει πολλαπλά ανάλογα τριχοθηκινών και συγκεκριμένα την δεσοξυνιβαλενόλη (DON) και την νιβαλενόλη (MEA), καθώς και τα ακετυλιωμένα παράγωγά τους, 3-acetil-DON (3A-DON) και 15-acetil-DON (15A-DON) (Moretti, 2009).

Μακροσκοπικά οι αποικίες του είδους *F. graminearum* δίνουν ένα χαρακτηριστικό πορτοκαλορόζ χρώμα. Μικροσκοπικά το συγκεκριμένο είδος παράγει κυρίως μακροκονίδια (εικόνα 1.18).

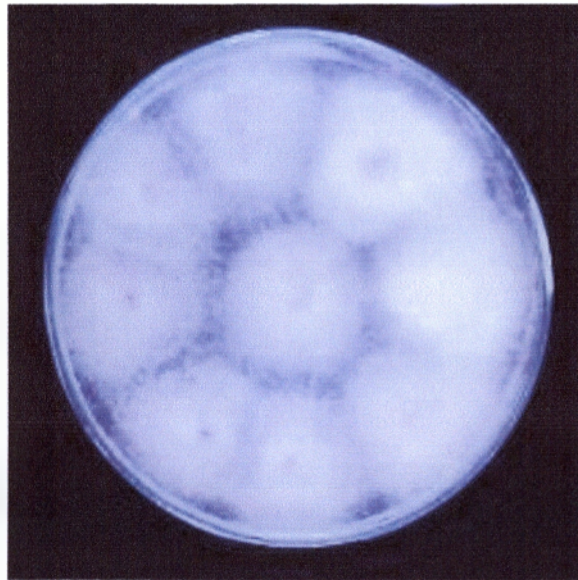


**Εικόνα 1.18:** **A)** Αποικία του είδους *F. graminearum*, **B)** Μόλυνση σιταριού από το είδος *F. graminearum* και **Γ)** Μακροκονίδια του είδους *F. graminearum* (πηγή: <http://www.gov.mb.ca/agriculture>).

#### 1.3.4.2 *Fusarium oxysporum*

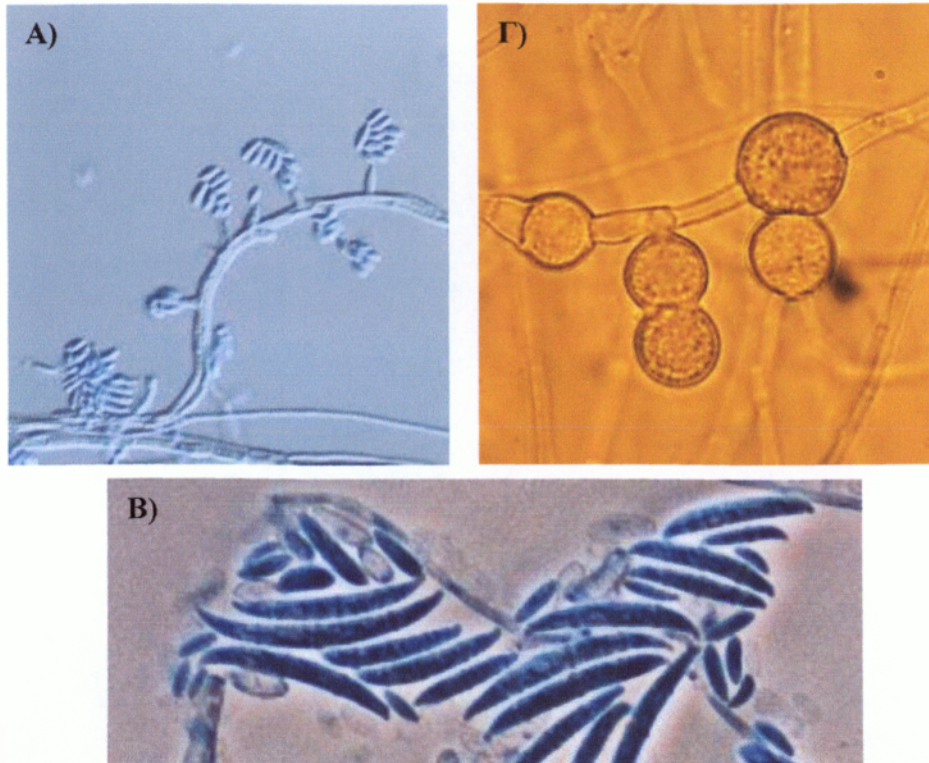
Το *Fusarium oxysporum* είναι παθογόνο των φυτών και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ασθενειών οι οποίες σχετίζονται κυρίως με τον μαρασμό του φυτού, επειδή έχουν την δυνατότητα να εγκατασταθούν στα αγγεία του ξυλώματος του φυτού. Ωστόσο, μεταξύ των ειδών, έχουν απομονωθεί από το έδαφος πολλοί πληθυσμοί οι οποίοι δεν είναι παθογόνοι και χρησιμοποιούνται ως βιολογικός έλεγχος κατά διάφορων ασθενειών που προκαλούνται από τα παθογόνα είδη του γένους *Fusarium*. Μορφολογικά, οι μη παθογόνες σειρές δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν από τις παθογόνες σειρές, αν και ένα ευρύ φάσμα γενετικής πληθυσμιακής ποικιλότητας που προέρχονται από εδάφη έχει αναγνωριστεί. Από την άλλη πλευρά, η πλειοψηφία των απομονωμένων σειρών που προκαλούν αγγειακούς μαρασμούς είναι εξειδικευμένα για ένα συγκεκριμένο ξενιστή. Από ταξινομικής πλευράς, τα στελέχη αυτά έχουν διαφοροποιηθεί από τα υπόλοιπα βάση της παθογένειας στα φυτά, ως ειδικές μορφές.

Έτσι η ταυτοποίηση αυτών γίνεται με δοκιμές παθογένειας με κατάλληλους ξενιστές, κάτι που είναι αρκετά χρονοβόρο αφού μπορεί να διαρκέσει μέχρι και κάποιους μήνες. Βέβαια, ο παράγοντας της παθογένειας για την διάκριση του είδους δεν αποτελεί δυνατό κριτήριο καθώς πρέπει να συνδυάζεται με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα. Οι αποικίες του είδους *Fusarium oxysporum* είναι λευκές όπως φαίνεται στην εικόνα 1.19. Μικροσκοπικά, το είδος σχηματίζει μικροκονίδια, μακροκονίδια και γλαμυδοσπόρια (εικόνα 1.20) (Βακαλουνάκης 2006, Moretti, 2009).

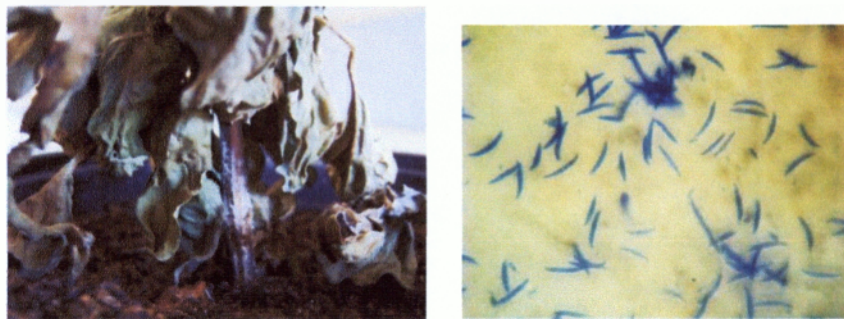


*Εικόνα 1.19: Αποικία του είδους *Fusarium oxysporum* σε άγαρ (πηγή: <http://www.plantmanagementnetwork.org>).*

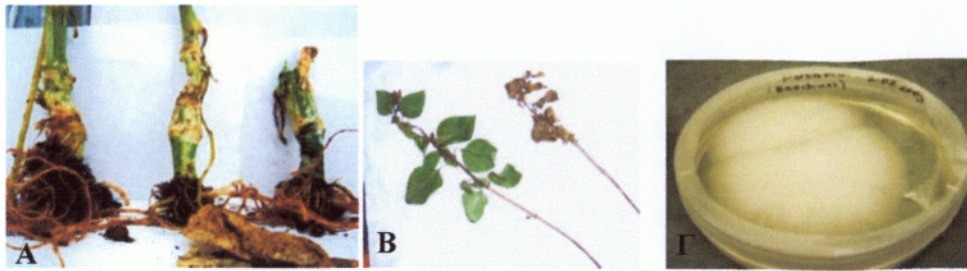




Εικόνα 1.20: Σπόρια του γένους *Fusarium oxysporum*. Α) Μικροκονίδια, Β) Μακροκονίδια και Γ) Χλαμυδοσπόρια (πηγή: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>).



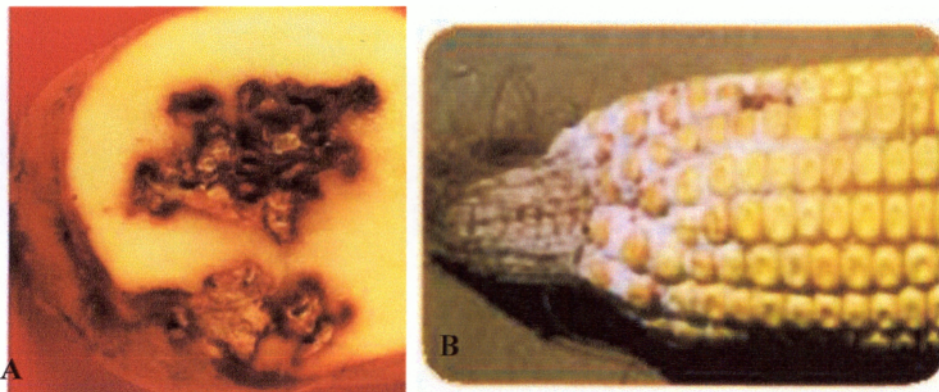
Εικόνα 1.21. Προσβολή του Πλατύφυλλου Βασιλικού από το *F. oxysporum* (αδρόμύκωση) και τα κονίδια του μύκητα. (πηγή αρχείο Μ. Παπαδοπούλου)



**Εικόνα 1.22.** *A.* Συμπτώματα σήψης των ριζών και της βάσης της αγγουριάς. *B.* Συμπτώματα προσβολής των αγγείων και μααρασμού του βλαστού και *Γ.* Οι αποικίες του μύκητα *F. oxysporum* σε PDA.

Το παθογόνο αίτιο της ξηρής σήψης πατάτας το οποίο προσβάλλει τους κονδύλους στην αποθήκη είναι το *Fusarium* spp. Συμπτώματα:

- Επιφανειακή συρρίκνωση του κονδύλου.
- Εσωτερικά εμφανίζεται ξηρή σήψη & κοιλότητες.
- Παρουσία λευκής & ροζέ εξάνθησης



**Εικόνα 1.23.** Σήψης των αποθηκευμένων προϊόντων από το *Fusarium*. *A.* Κόνδυλος πατάτας. *B.* Σπάδικας καλαμποκιού.

Τα είδη του γένους *Fusarium* προκαλούν σήψης και στο σπάδικα καλαμποκιού μόνο από την κορυφή τους ή τοπικά. Στις προσβεβλημένες περιοχές εμφανίζεται μια λευκή εξάνθηση από το μύκητα ή τα κονίδια του (εικόνα 1.23).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### «ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ»

Τα περισσότερα είδη μυκήτων είναι τοξικογόνα στη φύση αλλά και εκείνοι που δεν είναι, έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες που μεταδίδουν μια μouxλιασμένη οσμή και γεύση στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της μακράς αποθήκευσής τους.

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες του μεταβολισμού των μυκήτων και προκαλούν τοξική αντίδραση όταν εισάγονται ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις στα ανώτερα σπονδυλωτά και σε άλλα ζώα μέσω της φυσικής οδού. Αυτή η ομάδα των εξαιρετικά τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών παράγονται από ένα ευρύ ταξινομικό φάσμα νηματοειδών μυκήτων οι οποίοι προσβάλλουν κυρίως τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Sekar et al., 2008).

#### 2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Είναι δύσκολο να καθοριστούν οι μυκοτοξίνες σε λίγες λέξεις. Όλες οι μυκοτοξίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους φυσικά προϊόντα που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από νηματοειδής μύκητες. Αυτοί οι μεταβολίτες αποτελούν τοξιγονικές και χημικές συσσωρεύσεις που συγκεντρώνονται μόνο και μόνο επειδή μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες ακόμη και τον θάνατο σε ανθρώπινα όντα και άλλα σπονδυλωτά. Όχι απροσδόκητα, πολλές μυκοτοξίνες εμφανίζουν τοξικότητα σε ασπόνδυλα, φυτά και μικροοργανισμούς.

Ο όρος μυκοτοξίνες επινοήθηκε το 1962 στον απόηχο μιας ασυνήθιστης κτηνιατρικής κρίσης κοντά στο Λονδίνο κατά τη διάρκεια της οποίας περίπου 100.000

γαλοπούλες πέθαναν. Όταν η ασθένεια αυτή συνδυάστηκε με ένα μολυσμένο φυστίκι από δευτερογενείς μεταβολίτες του είδους *Aspergillus flavus* (αφλατοξίνη), αποτέλεσε το έναυσμα για τους επιστήμονες να σκεφτούν την πιθανότητα πως και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες της μούχλας μπορεί να είναι θανατηφόροι. Σύντομα η έννοια των μυκοτοξινών επεκτάθηκε προκειμένου να συμπεριλάβει έναν αριθμό καλά γνωστών μυκητιακών τοξινών, ενώσεις που αρχικά είχαν απομονωθεί ως αντιβιοτικά (π.χ. πατουλίνη) καθώς και ένας αριθμός νέων δευτερογενών μεταβολιτών (π.χ. Ωχροτοξίνη Α).

Το χρονικό διάστημα μεταξύ 1960-1975 έχει ονομαστεί ως ο «χρυσός πυρετός μυκοτοξινών», επειδή τόσοι πολλοί επιστήμονες προσχώρησαν στην πολύ καλά χρηματοδοτούμενη έρευνα γι' αυτούς τους τοξικούς παράγοντες. Ανάλογα με τον τρόπο που χρησιμοποιείται ο ορισμός και αναγνωρίζοντας ότι οι περισσότερες μυκοτοξίνες εμφανίζονται σε οικογένειες χημικά συσχετιζόμενες με μεταβολίτες, περίπου 300 με 400 ενώσεις αναγνωρίζονται πλέον ως μυκοτοξίνες, εκ των οποίων μια ντουζίνα ομάδες λαμβάνουν τακτικά την προσοχή ως απειλή για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων.

Ενώ όλες οι μυκοτοξίνες είναι μυκητιακής προέλευσης, δεν καλούνται όλες οι τοξικές ενώσεις που παράγονται από μύκητες ως μυκοτοξίνες. Ο τελικός στόχος και η συγκέντρωση του μεταβολίτη είναι πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά. Προϊόντα μυκήτων που είναι κυρίως τοξικά σε βακτήρια ονομάζονται συνήθως αντιβιοτικά (π.χ. πενικιλίνη). Προϊόντα μυκήτων που είναι τοξικά για τα φυτά ονομάζονται φυτοτοξίνες από φυτοπαθολόγους. Οι μυκοτοξίνες παράγονται από τους μύκητες και είναι τοξικοί για όλα τα σπονδυλωτά και άλλες ομάδες ζώων σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Άλλες χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες μυκήτων όπως είναι η αιθανόλη, που είναι τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν θεωρείται μυκοτοξίνη. Τέλος, αν και τα δηλητήρια των μυκήτων είναι βέβαιο πως είναι δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων και προκαλούν το θάνατο, δεν εμπλέκονται στην μυκοτοξικολογία σύμφωνα με τους ερευνητές.

Ο προσδιορισμός της σοβαρότητας της δράσης μιας μυκοτοξίνης βασίζεται στη συχνότητα εμφάνισής της ή και στο είδος της ασθένειας που προκαλεί, ειδικά εάν είναι γνωστή η καρκινογόνος δράση της. Ανάμεσα στις μυκοτοξίνες που

κατηγοριοποιούνται σε αυτήν την ομάδα είναι οι αφλατοξίνες (aflatoxins), που παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus*, οι φουμονισίνες (fumonisins) που παράγονται από το *Fusarium verticillioides* και η δεοξυनिβαλενόλη (deoxynivalenol ή DON ή vomitoxin), που παράγεται από το *F. graminearum*. Άλλες μυκοτοξίνες είναι το κυκλοπιαζονικό οξύ (cyclopiiazonic acid), η ζεαραλενόνη (zearalenone), η πατουλίνη (patulin), η ωχρατοξίνη (ochratoxin), η τριχοθηκίνη T-2, και ορισμένα αλακαλοειδή που παράγονται από το μύκητα *Claviceps purpurea* που προκαλεί την εργοτίαση των σιτηρών (ergot alkaloids). Οι αφλατοξίνες είναι αποδεδειγμένες καρκινογόνες ουσίες, ανοσοτοξίνες, και προκαλούν καθυστέρηση ανάπτυξης στα ζώα. Οι φουμονισίνες είναι επίσης καρκινογόνες ουσίες, ενώ οι τριχοθηκίνες αναφέρονται ως ανοσοτοξικές ενώσεις.

Στο παρελθόν, οι μυκοτοξίνες θεωρούνταν ότι παράγονται μόνο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των τροφίμων από διάφορους μύκητες που αναπτύσσονταν στους σπόρους και οδηγούσαν στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που αποδείχθηκαν να είναι τοξικοί όταν καταναλώνονται από τον άνθρωπο και τα ζώα. Περαιτέρω όμως έρευνες απέδειξαν ότι διάφορες μυκοτοξίνες παράγονται και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καλλιεργειών στον αγρό.

Πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο έχουν θεσπίσει ένα επιτρεπτό όριο «ανοχής» της παρουσίας μυκοτοξινών στα τρόφιμα που θα χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση. Ενώ οι αναπτυγμένες χώρες έχουν βέβαια τις σύγχρονες υποδομές για τον έλεγχο τροφίμων σύμφωνα με τα ποιοτικά πρότυπα, οι άνθρωποι στις αναπτυσσόμενες χώρες δεν προστατεύονται από τον ποιοτικό έλεγχο τροφίμων και την επιβολή των ασφαλών προτύπων μέσα στις χώρες τους. Στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες έχουν αναφερθεί ποσοστά μόλυνσης μυκοτοξινών που κυμαίνονται από 22% για φουμονισίνες έως 56% σε αφλατοξίνες και πολλά άτομα εκτίθενται μακροχρόνια σε υψηλά επίπεδα μυκοτοξινών στην καθημερινή διατροφή τους. Καμία οικονομικά εφικτή διαδικασία επεξεργασίας δεν είναι διαθέσιμη σήμερα για να αφαιρέσει τις τοξίνες από τα τρόφιμα που είναι ήδη μολυσμένα (Τσιτσιγιάννης 2008).

Οι μυκοτοξίνες δεν είναι μόνο δύσκολο να προσδιοριστούν αλλά και να ταξινομηθούν. Λόγω των διαφορετικών χημικών δομών τους και της βιοσυνθετικής προέλευσής τους, των αμέτρητων βιολογικών επιδράσεών τους καθώς και την

παραγωγή τους από μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών μυκήτων, η ταξινόμησή τους αντικατοπτρίζει την εκπαίδευση του ατόμου που κάνει την κατηγοριοποίηση. Οι κλινικοί γιατροί κατηγοριοποιούν τις μυκοτοξίνες ανάλογα με το όργανο που επηρεάζουν έτσι υπάρχουν οι ηπατοτοξίνες, νεφροτοξίνες, νευροτοξίνες, άνοσοτοξίνες και ούτω καθεξής. Οι βιολόγοι τις κατηγοριοποιούν σε γενικές ομάδες όπως είναι τερατογόνα, μεταλλαξογόνα, καρκινογόνα και αλλεργιογόνα. Οι χημικοί έχουν προσπαθήσει να τις κατατάξουν με βάση τη χημική τους δομή (π.χ. λακτόνες, κουμαρίνες), οι βιοχημικοί με βάση το βιοσυνθετικό μονοπάτι από το οποίο προέρχονται, οι θεραπευτές με την ασθένεια που προκαλούν και οι μυκητολόγοι με βάση τον μύκητα που τις παράγει (π.χ. μυκοτοξίνες του γένους *Aspergillus*, μυκοτοξίνες του γένους *Penicillium* κ.α.) (Bennett & Klich, 2003).

## 2.2 ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

### 2.2.1 Ιστορικά στοιχεία

Το 1960, στη Μεγάλη Βρετανία πάνω από 100.000 γαλοπούλες πέθαναν λόγω τοξίκωσης, η οποία προκλήθηκε από τοξικούς μεταβολίτες μυκήτων. Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε ένα συστατικό της διατροφής τους, τις αραχίδες σε ποσοστό από 0,5-16%, οι οποίες είχαν μολυνθεί από *Aspergillus flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτό τον καρπό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μια σειρά φθοριζόντων ουσιών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στη συνέχεια μετονομάστηκαν σε αφλατοξίνες (Afs) (Jaimez J. et al., 2000). Εξάρσεις μυκοτοξίκωσης προκλήθηκαν τον επόμενο χρόνο (1961) σε βοοειδή και χοίρους οι οποίοι είχαν ήδη διατραφεί με μολυσμένο γεύμα αραχίδας.

Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α., παρατηρήθηκε μια έξαρση καρκίνου του ήπατος στις πέστροφες, το οποίο αργότερα αποδόθηκε στην μόλυνση από αφλατοξίνες ενός μίγματος βαμβακόσπορου, συστατικού της διατροφής αυτών των ψαριών.

Στην Ινδία, το 1974, καταγράφηκε η πιο σοβαρή έξαρση ηπατίτιδας στους ανθρώπους λόγω αφλατοξίκωσης. Στην εν λόγω περίπτωση, η αφλατοξίκωση προήλθε από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού από αφλατοξίνες στα επίπεδα 0,25 έως 15mg/kg και οι 108 από τους 397 ασθενείς πέθαναν. Πιο πρόσφατα, στη Κένυα το 2005, το πρόβλημα της αφλατοξίνης επανεμφανίστηκε οδηγώντας τουλάχιστον 125 ανθρώπους στο θάνατο από κατανάλωση καλαμποκιού μολυσμένου με αφλατοξίνη.

### 2.2.2 Οι μύκητες - παραγωγοί των αφλατοξινών.

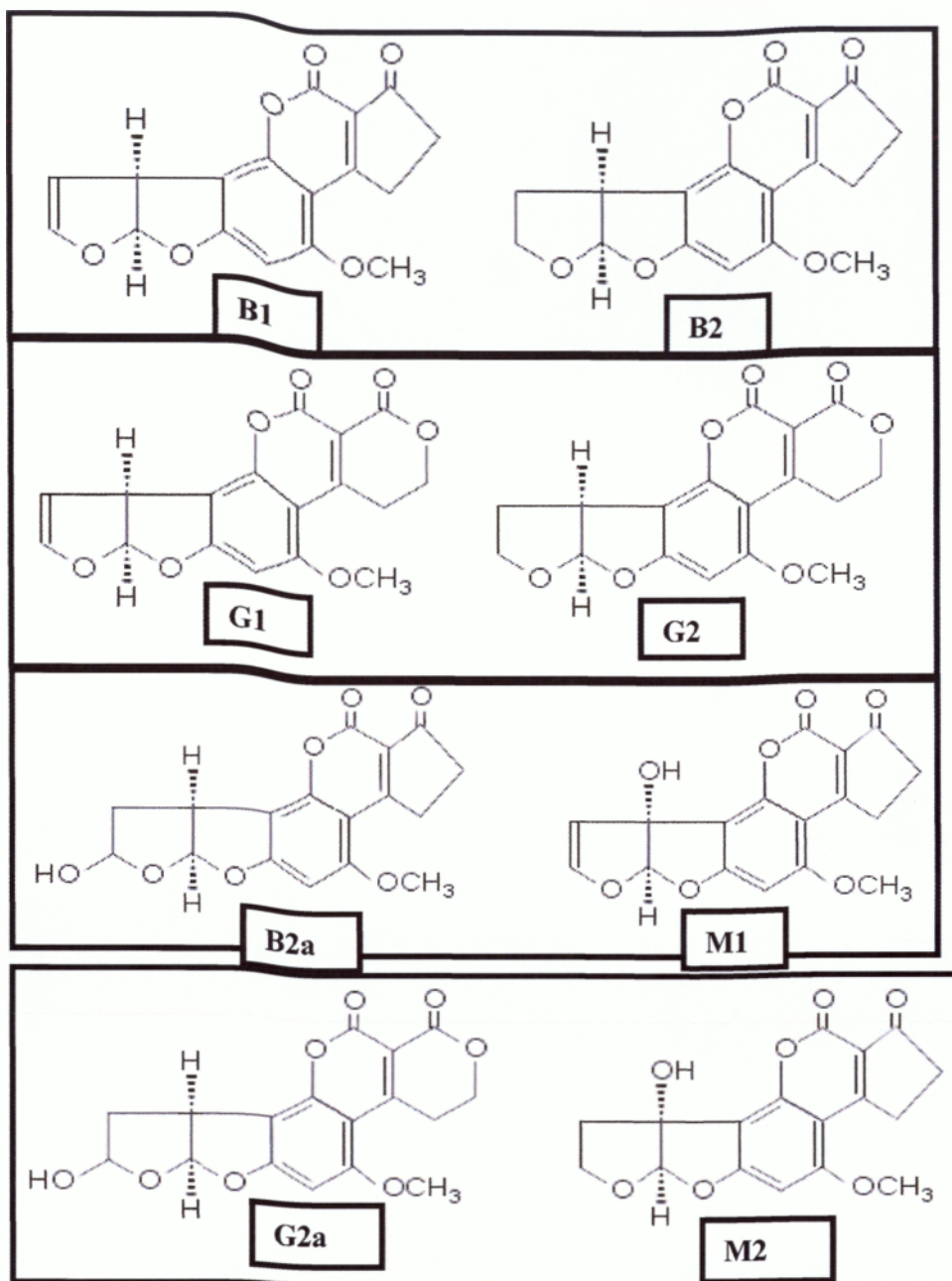
Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων όπως ο *Aspergillus flavus* και ο *Aspergillus parasiticus* ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού. Επίσης διάφορα άλλα είδη ασπεργίλλων όπως οι *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* και *Emericella venezuelensis* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν αφλατοξίνες. Επειδή οι τέσσερις βασικές αφλατοξίνες ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ) απομονώθηκαν από καλλιέργειες του *A. flavus*, τα πρώτα γράμματα του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν για την ονομασία των τοξινών. Άλλες τέσσερις αφλατοξίνες οι  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $P_1$ ,  $Q_1$ ,  $B_{2A}$  και  $G_{2A}$ , που παράγονται σε μικρότερες ποσότητες απομονώθηκαν στην πορεία από καλλιέργειες των *A. flavus* και *A. parasiticus*. Ο *A. flavus* παράγει τις  $B_1$  και  $B_2$ , καθώς και κάποιες συγγενείς ενώσεις όπως η  $M_1$ , ενώ ο *A. parasiticus* παράγει τις  $G_1$  και  $G_2$  καθώς και τις  $B_1$  και  $B_2$  (Yu et al., 2008).

### 2.2.3 Φυσικές και χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες είναι μια ομάδα υψηλά οξυγονωμένων ετεροκυκλικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παράγονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού, ορισμένων μυκήτων του *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, οι οποίοι αναπτύσσονται σε διάφορα τρόφιμα όπως ξηροί καρποί, μπαχαρικά, δημητριακά κ.ά.



Από χημική άποψη είναι παράγωγα δι-φουρανο-κουμαρίνης και χαρακτηρίζονται από υδροφουρανικά και τετρα-υδροφουρανικά τμήματα συγχωνευμένα σε ένα υποκατεστημένο τμήμα κουμαρίνης (εικόνα 2.1). Μεταξύ αυτών, οι G αφλατοξίνες διαφέρουν χημικά από τις B λόγω της παρουσίας ενός 3-γαλακτονικού δακτυλίου αντί ενός κυκλοπεντενονικού δακτυλίου (cyclopentenone). Επίσης, στις αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> υπάρχει ένας 8,9 διπλός δεσμός στον τερματικό φουρανικό δακτύλιο, ο οποίος δεν υπάρχει στις B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub>. Όμως, η μικρή αυτή διαφορά στη χημική τους δομή σχετίζεται με μια πολύ σημαντική αλλαγή στη δράση τους: οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> είναι καρκινογόνες και θεωρούνται πολύ πιο τοξικές από τις B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub> οι οποίες αποτελούν τα δι-υδροπαράγωγά τους (εικόνα 2.1).



**Εικόνα 2.1:** Χημική δομή αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> (πηγή: [http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_aflatoxins.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxins.htm)).

Ότι αφορά τις φυσικές τους ιδιότητες οι αφλατοξίνες είναι κρυσταλλικές ουσίες, ελεύθερα διαλυτές σε ελαφρά πολικούς ή μέτρια πολικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο καθώς επίσης στην ακετόνη και το ακετωιτρίλιο, ενώ στο νερό διαλύονται μέχρι 10-20mg/l. Αντίθετα είναι αδιάλυτες σε μη-πολικούς διαλύτες. Αυτή η χαρακτηριστική τους φυσική ιδιότητα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εκχύλισης του δείγματος για τον ποσοτικό

προσδιορισμό της αφλατοξίνης. Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικά η συμπεριφορά των αφλατοξινών στην εφαρμογή αλκάλιων, οξέων και οξειδωτικών αντιδραστηρίων.

❖ *Αλκάλια.* Σε αλκαλικά διαλύματα πραγματοποιείται υδρόλυση του τμήματος της λακτόνης. Η υδρόλυση εμφανίζεται ως αντιστρεπτή, αφού έχει αποδειχθεί ότι συντελείται επανακυκλοποίηση κατόπιν οξίνισης από ένα βασικό διάλυμα που περιέχει αφλατοξίνη. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες το άνοιγμα του δακτυλίου ακολουθείται από αποκαρβοξυλίωση και η αντίδραση μπορεί να προχωρήσει περαιτέρω προκαλώντας απώλεια της μεθόδου ομάδας από τον αρωματικό δακτύλιο. Παρόμοια σειρά αντιδράσεων θεωρείται ότι πραγματοποιείται από την αμμωνία και διάφορες αμίνες.

❖ *Οξέα.* Παρουσία ανόργανων οξέων, οι αφλατοξίνες B1 και G1 μετατρέπονται στις αφλατοξίνες B2a και G2a εξ αιτίας της υπό οξέος καταλυόμενης προσθήκης νερού στο διπλό δεσμό του φουρανικού δακτυλίου. Παρουσία οξικού ανυδρίτη και υδροχλωρικού οξέος η αντίδραση προχωρεί περαιτέρω δίνοντας αιθόξυ παράγωγα. Παρόμοιες ενώσεις προσθήκης των αφλατοξινών B1 και G1 σχηματίζονται με μυρμηγκικό οξύ-θειονυλοχλωρίδιο, οξικό οξύ-θειονυλοχλωρίδιο και τρι-φθοροοξικό οξύ.

❖ *Οξειδωτικά αντιδραστήρια.* Πολλά οξειδωτικά αντιδραστήρια όπως το υποχλωριώδες νάτριο, το υπερμαγγανικό κάλιο, το χλώριο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το όζον και το υπερβροϊκό νάτριο αντιδρούν με τις αφλατοξίνες μεταβάλλοντας κατά κάποιο τρόπο το μόριό τους όπως αποδεικνύεται από την απώλεια του φθορισμού. Ο μηχανισμός αυτών των αντιδράσεων δεν έχει πλήρως καθοριστεί και τα προϊόντα της αντίδρασης παραμένουν στις περισσότερες περιπτώσεις μη ταυτοποιημένα.

Η πιο συχνά απαντώμενη αφλατοξίνη η B1 έχει λευκό έως κίτρινο χρώμα, είναι κρυσταλλική και άοσμη. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών.

**Πίνακας 2.1: Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών**

Αφλατοξίνη	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος	Σημείο τήξης	UV Απορρόφηση	
				265nm	360-362nm
<b>B1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269	12,400	21,800
<b>B2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	12,100	24,000
<b>G1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	9,600	17,700
<b>G2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240	8,200	17,100
<b>M1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	14,150	21,250
<b>M2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293	12,100	22,900

Πηγή: [www.mvcotoxins.org](http://www.mvcotoxins.org)

Από καθαρά χημικής απόψεως, οι υψηλές συζευγμένες και σταθερές ρίζες στη δομή των αφλατοξινών προσδίδουν τη χαρακτηριστική χημική τους ιδιότητα να φθορίζουν στο υπεριώδες (UV). Αυτές οι τοξίνες φθορίζουν είτε μπλε είτε πράσινο χρώμα υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και αυτό το χαρακτηριστικό διακρίνει τις Β από τις G αφλατοξίνες (Jaimez J. et al., 2000).

Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερές απουσία φωτός και κυρίως υπεριώδους ακτινοβολίας ακόμα και σε θερμοκρασίες πάνω από 100°C. Ένα διάλυμα που προετοιμάζεται με χλωροφθόρμιο ή βενζένιο είναι σταθερό για χρόνια, εφ' όσον διατηρηθεί στο σκοτάδι και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Οι αφλατοξίνες σε ξηρή μορφή παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα στη θέρμανση έως το σημείο τήξεως. Ωστόσο, παρουσία υγρασίας και σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται καταστροφή τους ύστερα από κάποιο διάστημα. Τέτοιου είδους καταστροφή των αφλατοξινών μπορεί να συμβεί στους ελαιώδεις καρπούς, στα ψημένα φιστίκια ή σε υδατικά διαλύματα με pH 7. Παρόλο που τα προϊόντα της αντίδρασης δεν έχουν εξεταστεί λεπτομερώς φαίνεται, ενδεχόμενα, ότι αυτού του είδους η μεταχείριση έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου της λακτόνης με πιθανή αποκαρβοξυλίωση σε υψηλές θερμοκρασίες.

Τέλος η υδρογόνωση της αφλατοξίνης B1 και G1 οδηγεί στην αφλατιξίνη B2 και G2, αντίστοιχα. Περαιτέρω αναγωγή της B1 από 3 μόρια H<sub>2</sub> οδηγεί στην τετρα-υδροξυ-αφλατοξίνη. Αναγωγή της B1 και B2 αφλατοξίνης με βορικό υδρίδιο του νατρίου οδήγησε στην παραγωγή αφλατοξίνης RB1 και RB2, αντίστοιχα. Αυτές προκύπτουν από το άνοιγμα του λακτονικού δακτυλίου, το οποίο ακολουθείται από αναγωγή της οξικής ομάδας και αναγωγή της κετο-ομάδας στον κυκλοπεντενικό δακτύλιο.

Η συμπεριφορά των αφλατοξινών υπό την επίδραση διαφόρων φυσικών συνθηκών και χημικών αντιδραστηρίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα εξ αιτίας της πιθανής εφαρμογής τέτοιων μεθόδων στην αποτοξίνωση προϊόντων, που έχουν μολυνθεί.

## 2.2.5 Βιοσύνθεση αφλατοξίνης

### 2.2.5.1 Μονοπάτια και ένζυμα στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης

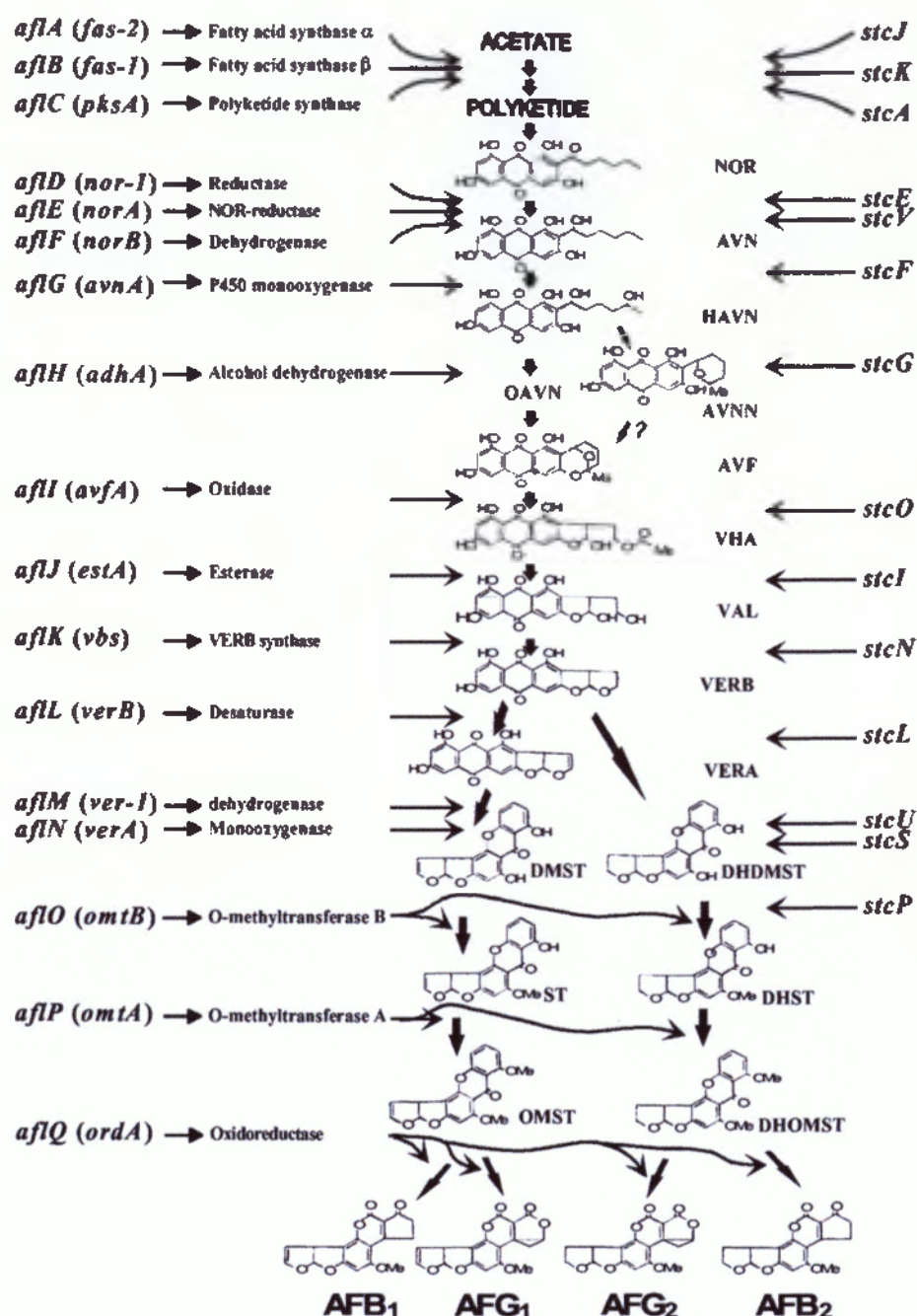
Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης είναι ένα από τα πιο ευρέως μελετημένα μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων. Μέσα στην τελευταία δεκαετία, έχουν διευκρινιστεί τα κύρια βιοχημικά μονοπάτια καθώς και η χημική δομή των ενδιάμεσων προϊόντων έχει ταυτοποιηθεί. Έχει αποδειχθεί ότι στη βιοσύνθεση περιλαμβάνονται 23 τουλάχιστον ενζυματικές αντιδράσεις, ενώ παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 15 δομικά προσδιορισμένες ενδιάμεσες ενώσεις.

Οι έρευνες δείχνουν ότι οι αφλατοξίνες συντίθενται από το μηλονυλ-συνένζυμο A (Malonyl-CoA), αρχικά με το σχηματισμό του εξανοϋλ-συνενζύμου A (hexanoyl-CoA) και στη συνέχεια με το σχηματισμό δεκακετιδίου ανθρακινόνης. Υπάρχουν δυο συνθάσες λιπαρών οξέων (FAS) και μια συνθάση πολυκετιδίου (PKS) οι οποίες εμπλέκονται στη σύνθεση του πολυκετιδίου από το ακέτυλο-συνένζυμο A (acetyl-CoA).



Το νορσολορινικό οξύ (norsolorinic acid-NOR) είναι το πρώτο σταθερό ενδιάμεσο που ταυτοποιήθηκε στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης. Οι αφλατοξίνες σχηματίζονται μετά από μια σειρά καλά οργανωμένων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων.

Το γενικά αποδεκτό μονοπάτι βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης δίνεται στην εικόνα 2.2.



**Εικόνα 2.2:** Τα βέλη υποδεικνύουν τις συνδέσεις από τα γονίδια προς τα ένζυμα που κωδικοποιούν, από τα ένζυμα προς τις βαθμίδες βιομετατροπής στις οποίες εμπλέκονται, και από τα ενδιάμεσα προς τα προϊόντα αφλατοξίνης. Συντομογραφίες, *NOR*: norsolorinic acid, *AVN*: averantin, *HAVN*: 5'-hydroxyaverantin, *OAVN*: oxoaverantin, *AVNN*: averufanin, *AVF*: averufin, *VHA*: versiconal hemiacetal acetate, *VAL*: versiconal, *VERB*: versicolorin B, *VERA*: versicolorin A, *DMST*: *ST*: sterigmatocystin, *DHST*: dihydrosterigmatocystin, *OMST*: O-methylsterigmatocystin, *DHOMST*: dihydro-O-methylsterigmatocystin, *AFB1*: aflatoxin B1, *AFB2*: aflatoxin B2, *AFG1*: aflatoxin G1, *AFG2*: aflatoxin G2 (πηγή: Jiujiang Yu et al., 2004).

## 2.2.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τη παραγωγή αφλατοξίνης

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, είναι γνωστό ότι επιδρούν στην παραγωγή αφλατοξίνης από τοξικογόνα στελέχη των ασπεργίλλων. Οι μηχανισμοί σε μοριακό επίπεδο δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι αν και έχουν γίνει πολλές έρευνες και μελέτες. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες πιθανόν να επιδρούν στο γονίδιο ρύθμισης της αφλατοξίνης *aflR* ή να διαφοροποιούν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι αποκρίνονται σε εξωτερικά σήματα.

Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από μύκητες του γένους *Aspergillus spp*, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή). Η παρουσία των μυκήτων δεν σηματοδοτεί κατ' ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης. Γενικά, οι κλιματολογικές συνθήκες, το κατάλληλο υπόστρωμα, τα έντομα και η ευαισθησία του σε μολύνσεις από μύκητες είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή από μύκητες και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συλλογή. Σε κάθε περίπτωση, συνδέονται με παράγοντες που προκαλούν στρες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς) στους μύκητες. Μετά την συλλογή και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, της επεξεργασία και της αποθήκευσης, η ανάπτυξη τοξικογόνων μυκήτων και η ενδεχόμενη παραγωγή μυκοτοξίνης επηρεάζονται από το πλήθος παραγόντων μεταξύ των οποίων η ενεργότητα νερού, το επίπεδο υγρασίας, η θερμοκρασία, ο χρόνος, το μέγεθος ζημιάς που έχουν υποστεί οι καλλιέργειες, οι προσβολές από έντομα και άλλους μικροοργανισμούς και διάφοροι χημικοί παράγοντες όπως ο αερισμός (επίπεδα  $O_2$  και  $CO_2$ ), το pH και η παρουσία/απουσία παρεμποδιστών θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες (Yu et al., 2008).

- ❖ *Παράγοντες θρέψης.* Θρεπτικοί παράγοντες όπως ο άνθρακας, το άζωτο, τα αμινοξέα, τα λιπίδια και τα ιχνοστοιχεία έχει παρατηρηθεί πως επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης. Απλά σάκχαρα όπως γλυκόζη, μαλτόζη αλλά όχι πεπτόνη, σορβόζη ή λακτονη υποστηρίζουν το σχηματισμό αφλατοξινών. Η πηγή αζώτου επιδρά στο σχηματισμό αφλατοξίνης πολλαπλώς. Η παραγωγή

αφλατοξίνης είναι διαφορετική εάν στο υπόστρωμα υπάρχει νιτρώδες ή νιτρικό άλας. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως από τα αμινοξέα η τρυπτοφάνη παρεμποδίζει το σχηματισμό αφλατοξινών ενώ η τυροσίνη τον ευνοεί στο *A. flavus*. Τέλος τα λιπίδια φαίνεται πως έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στο σχηματισμό αφλατοξίνης, όχι μόνο ως πηγή θρεπτικών συστατικών αλλά και ως υποστρώματα μεταβολισμού των αρχικών μονάδων του ακυλο-συνένζυμου A (acyl-CoA) και ως μόρια εκπομπής σημάτων.

- ❖ *Περιβαλλοντικοί παράγοντες.* Οι εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού, παράγοντες στρες όπως η ξηρασία και άλλοι έχει αποδειχθεί πως επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης καθώς και τους πληθυσμούς των αφλατοξικογόνων μυκήτων. Η μόλυνση με αφλατοξίνες ποικίλει και εξαρτάται από τον καιρό που επικρατεί κατά την καλλιεργητική περίοδο. Σε μελέτη για την αραχίδα στην Αυστραλία αναφέρεται αύξηση της μόλυνσης με αφλατοξίνες μετά από επαρκείς βροχοπτώσεις. Πριν τη συγκομιδή, ο κυριότερος παράγοντας που επάγει τη μόλυνση με αφλατοξίνες είναι οι ακανόνιστες ή ανεπαρκείς βροχοπτώσεις, ιδιαίτερα στα εδάφη που έχουν μειωμένη υδατοϊκανότητα. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγινε και στις Η.Π.Α., όπου οι υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με το στρες ξηρασίας είναι οι κυριότεροι παράγοντες παραγωγής αφλατοξίνης (Barry J. Blaney, 1985).

## 2.3 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α

### 2.3.1 Παράγοντες παραγωγής ωχρατοξίνης.

Η Ωχροτοξίνη Α ανακαλύφθηκε ως μεταβολίτης του *Aspergillus ochraceus* το 1965 κατά τη διάρκεια ενός μεγάλου σκρυναρίσματος μεταβολιτών μυκήτων που σχεδιάστηκαν ειδικά για την αναγνώριση νέων μυκοτοξινών. Λίγο αργότερα, απομονώθηκε από δείγμα καλαμποκιού στις Η.Π.Α. και αναγνωρίστηκε ως μια ισχυρή νεφροτοξίνη. Μέλη της οικογένειας των Ωχροτοξινών έχουν βρεθεί ως μεταβολίτες σε πολλά διαφορετικά είδη του γένους *Aspergillus* συμπεριλαμβανομένων των *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus*

*glaucus*, *Aspergillus melleus* και *Aspergillus niger*. Επειδή το *Aspergillus niger* χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή ενζύμων και κιτρικού οξέος για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί το γεγονός τα βιομηχανικά στελέχη να μην μπορούν να παράγουν την ωχρατοξίνη.

Αν και αρκετές έρευνες εμπλέκουν πολλά είδη *Penicillium* στην παραγωγή ωχρατοξίνης, είναι γνωστό πως το είδος *Penicillium verrucosum*, ένα κοινό μολυσματικό είδος του κριθαριού, φαίνεται να είναι ο μόνος παραγωγός ωχρατοξίνης του γένους.

Όπως συμβαίνει με όλες τις μυκοτοξίνες, το επίπεδο της προαναφερόμενης τοξίνης που παράγεται επηρεάζεται από το είδος του υποστρώματος στο οποίο αναπτύσσεται ο μύκητας, το επίπεδο υγρασίας, τη θερμοκρασία και τη παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Η ωχρατοξίνη Α έχει βρεθεί στο κριθάρι, τη βρώμη, τη σίκαλη, το σιτάρι, τους κόκκους καφέ και άλλα φυτικά προϊόντα. Από αυτά, το κριθάρι έχει τη μεγαλύτερη επικινδυνότητα μόλυνσης από την ωχρατοξίνη Α. επίσης υπάρχει η ανησυχία ότι η ωχρατοξίνη Α μπορεί να εμφανιστεί σε συγκεκριμένα κρασιά, κυρίως εκείνων των οποίων τα σταφύλια από τα οποία προέρχονται είναι μολυσμένα με τον *Aspergillus carbonarius*.

Η Ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), όπως έχουμε αναφέρει και νωρίτερα, παράγεται από διάφορους μύκητες που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium*. Η δυνατότητα παραγωγής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα στελέχη των μυκήτων. Έτσι, το 90% των απομονωθέντων στελεχών *A. niger* μπορεί να παράγει ΟΤΑ, ενώ για τον *P. verrucosum* αναφέρεται ότι το 74% των στελεχών που απομονώθηκαν στην Ευρώπη μπορεί να παράγει ΟΤΑ *in vitro*. Δυστυχώς, όμως, είναι τα κυριότερα είδη μυκήτων που απομονώνονται συχνότερα από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και ενοχοποιούνται για την παραγωγή ΟΤΑ, οι *A. ochraceus* και *P. verrucosum*.

Ο *P. verrucosum* εντοπίζεται κυρίως στις ψυχρές κλιματικές ζώνες, ενώ ο *A. ochraceus*. Η ιδανική θερμοκρασία για την παραγωγή της ΟΤΑ κυμαίνεται από 12-37°C για τον *A. ochraceus* και 4-31°C για τον *P. verrucosum*. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι ο *A. ochraceus* μπορεί να αναπτυχθεί καλύτερα σε τρόφιμα, όπως



φυστίκια και σόγια, ενώ η ανάπτυξη του *P. verrucosum* ευνοείται από το καλαμπόκι και τη βρώμη.

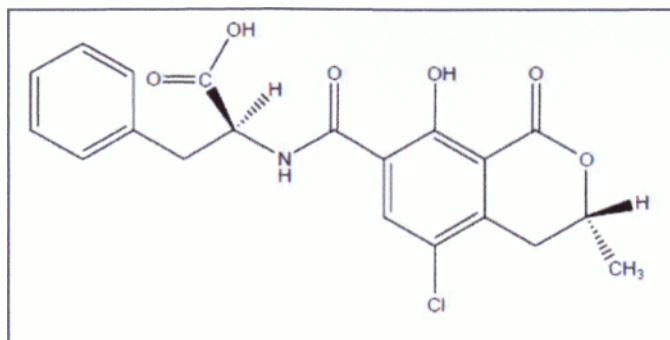
Η ωχρατοξίνη έχει την ίδια σημαντικότητα με τις αφλατοξίνες από τις τοξίνες των Ασπεργίλλων. Το όργανο-στόχος της ωχρατοξίνης είναι το νεφρό. Η ωχρατοξίνη Α είναι μια νεφροτοξίνη για όλα τα είδη ζώων που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και πιο τοξική για τον άνθρωπο. Εκτός από νεφροτοξίνη, έρευνες έδειξαν πως η ωχρατοξίνη Α είναι τοξίνη του ήπατος, είναι ανοσοκατασταλτικό, ισχυρό τερατογόνο και καρκινογόνο. Η ωχρατοξίνη Α διαταράσσει την κυτταρική φυσιολογία με πολλούς τρόπους, αλλά φαίνεται πως οι κυριότερες συνέπειες συνδέονται με ένζυμα του μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης. Επιπλέον, αναστέλλει την μιτοχονδριακή παραγωγή ATP και διεγείρει την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Bennett & Klich, 2003).

### 2.3.3 Φυσικό-χημικές ιδιότητες της ωχρατοξίνης Α

Η ΟΤΑ περιγράφεται χημικά σαν μια ένωση φαινυλαλανίνης-κουμαρίνης (dihydroisiscoumarin) με διπλό δεσμό. Πρόκειται για μια σύνθετη οργανική ουσία. Σε αντίθεση με τις άλλες ωχρατοξίνες, η ΟΤΑ διαθέτει ένα άτομο χλωρίου στη θέση C5 του δακτυλίου της κουμαρίνης, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 2.3. Η καρβοξυλική ομάδα της φαινυλαλανίνης παραμένει αδέσμευτη, με αποτέλεσμα η ΟΤΑ να αποτελεί ένα ασθενές οξύ ( $pK_a = 7,1$ ).

Η ωχρατοξίνη Α είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ με  $pK_a = 7,1$  και μοριακό βάρος 403.8g/mol. Με κρυσταλλική δομή, η οποία ποικίλει από άχρωμο σε λευκό χρώμα, το μόριο αυτό κατέχει έναν έντονο πράσινο φθορισμό κάτω από υπεριώδες φως σε όξινο μέσο και μπλε φθορισμό υπό αλκαλικές συνθήκες. Σε όξινο και ουδέτερο pH, η ΟΤΑ είναι διαλυτή σε πολικούς οργανικούς διαλύτες (αλκοόλες, κετόνες, χλωροφθόρμιο), ελαφρώς διαλυτό σε νερό και αδιάλυτο σε πετρελαϊκούς αιθέρες και κορεσμένους υδρογονάνθρακες. Ενώ σε αλκαλικές συνθήκες, το μόριο αυτό είναι διαλυτό σε υδατικό διάλυμα διττανθρακικού νατρίου και γενικά σε όλα τα αλκαλικά διαλύματα. Έχει ένα σημείο τήξεως περίπου 90°C όταν κρυσταλλώνεται από βενζόλιο

ως ένα διαλύτωμα. Ωστόσο, οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι με σημείο τήξεως 169°C, έχουν ληφθεί από ξυλόλιο και είναι κατάλληλα για δομική ανάλυση ακτίνων-X.



*Εικόνα 2.3: Ο χημικός τύπος της Ωχρατοξίνης Α (πηγή: Khoury & Atoui, 2010).*

Η ιδιαιτερότητα της ΟΤΑ οφείλεται στην υψηλή σταθερότητά του. Έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει μια αντίσταση στην οξύτητα και τις υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, αφού τα τρόφιμα είναι μολυσμένα, είναι πολύ δύσκολο να μειωθεί αυτή η μόλυνση. Μάλιστα το 1982 ο Muller έδειξε ότι το μόριο της ΟΤΑ αποικοδομείται μόνο κατά ένα μέρος σε κανονικές συνθήκες μαγειρέματος. Επιπλέον, το μόριο αυτό μπορεί αν αντισταθεί σε τρεις ώρες υψηλής αποστείρωσης νε ατμό υπό πίεση στους 121°C, και ακόμη και στους 250°C η καταστροφή του δεν είναι πλήρης (Khoury & Atoui, 2010).

### 2.3.4 Βιοσύνθεση Ωχρατοξίνης Α

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με τις διάφορες τοξικογόνες ιδιότητες των ΟΤΑ, σε αντίθεση με άλλες σημαντικές μυκοτοξίνες, δεν είναι πολλά γνωστά για το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ΟΤΑ σε όλα τα είδη μυκήτων. Πιστεύεται ευρέως ότι είναι μια ομάδα ισοκουμαρίνης υπό την μορφή πεντακετιδίου, το οποίο σχηματίζεται από οξικό και μηλονικό μέσω του μονοπατιού της σύνθεσης πολυκετιδίου. Έτσι, μια συνθάση πολυκετιδίου (PKS), το οποίο θεωρείται ένζυμο κλειδί, εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της ΟΤΑ με τον ίδιο τρόπο όπως συμβαίνει και με άλλες μυκοτοξίνες, τις Φουμασίνες και τις αφλατοξίνες.

Οι Huff και Hamilton (1979) πρότειναν ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι για την ΟΤΑ βασισμένο σε ένα μηχανικό μοντέλο σύμφωνα με τη δομή της ωχρατοξίνης Α. Το ετεροκυκλικό τμήμα της ΟΤΑ είναι δομικά όμοιο με την μαλεΐνη, ένας δευτερογενής μεταβολίτης που παράγεται από πολλά ωχρατοξικογόνα είδη μυκήτων όπως είναι τα *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* και *A. melleus*. Βεβαία η μαλεΐνη παράγεται και από άλλα είδη μυκήτων τα οποία δεν είναι τοξικογόνα όπως τα *Pezicula spp.*, *Botryosphaeria obtusa*, *Septoria nodorum*, *Phoma tracheiphila*, *Apiospora camptospora*, *Cercospora taiwanensis*, *C. scirpicola*, *Fusarium larvarum*, *Gyrostroma missouriense*, *Pezicula livida*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Cryptosporiopsis sp.* και *Plectophomella sp.*

Σύμφωνα με τους Huff και Hamilton, τρία διακριτά στάδια συμβαίνουν στην βιοσύνθεση της ΟΤΑ (εικόνα 2.4). Το πρώτο μέρος είναι η πολυκετιδιακή σύνθεση της ωχρατοξίνης Α μέσω της μαλεΐνης στο οποίο εμπλέκεται η συνθάση του πολυκετιδίου. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την ακυλ-ενεργοποίηση, όπου η μαλεΐνη μεθυλιώνεται και οξειδώνεται σε 7-καρβόξυ-μαλεΐνη (ΟΤβ). Χλωρίωση του συγκεκριμένου μορίου με χλωρουποξειδάση οδηγεί στην ΟΤα. το συστατικό αυτό στη συνέχεια μετασχηματίζεται σε έναν μικτό ανυδρίτη, μια αντίδραση ενεργοποίησης χρησιμοποιώντας ΑΤΡ. Ο δεύτερος πρόδρομος συντίθενται μέσω της οδού του σικιμικού οξέος, που ακολουθείται από ενεργοποίηση αιθυλεστέρα, έτσι ώστε να μπορούν να συμμετέχουν στην μετέπειτα ακυλο αντίδραση μετατόπισης. Τέλος στο τρίτο βήμα, η σύνδεση αυτών των ενεργοποιημένων προδρόμων λαμβάνει χώρα μέσω μιας συνθετάσης, έναν αιθυλεστέρα της ΟΤΑ, τον ΟΤC με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ωχρατοξίνης Α.

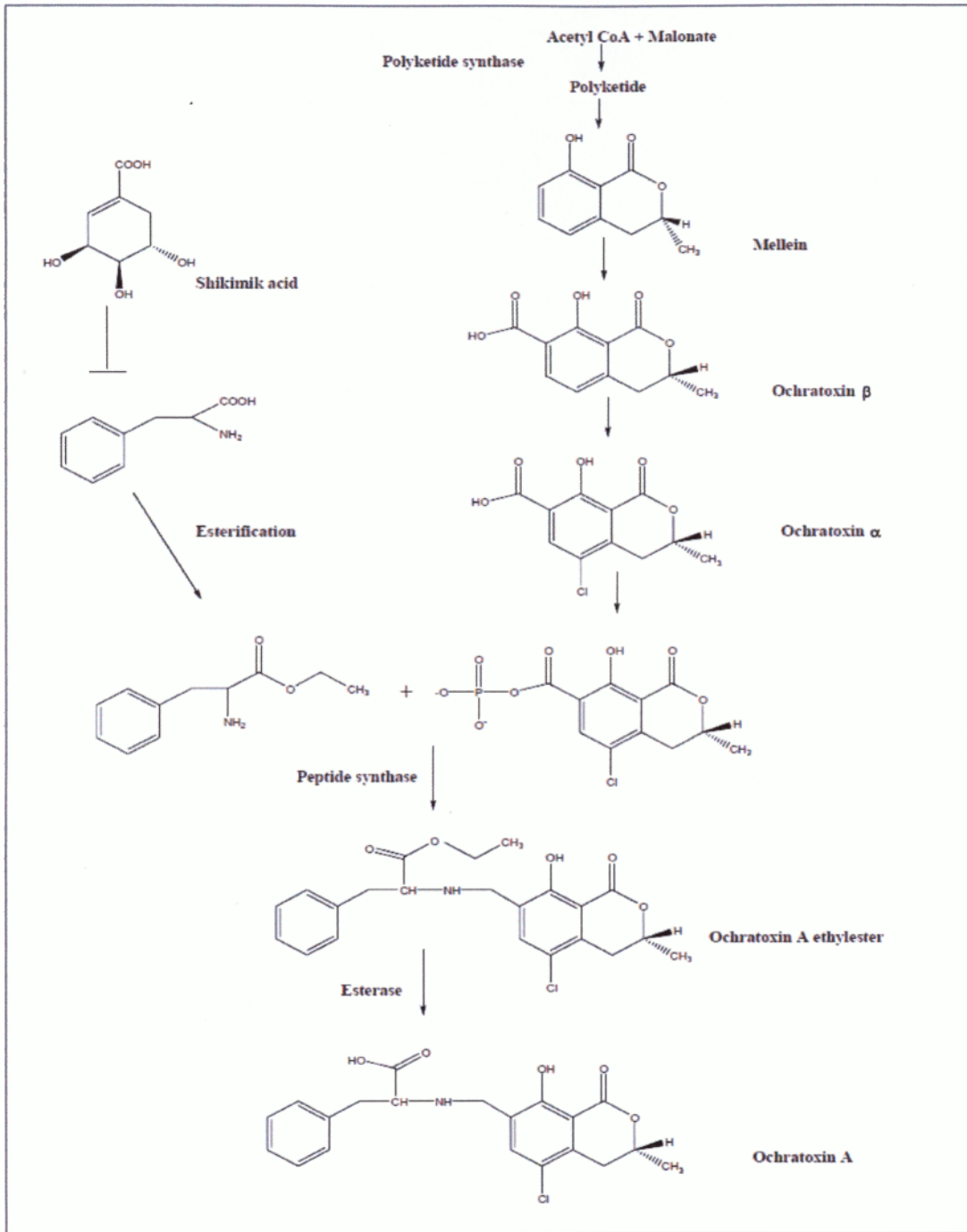
Ωστόσο με το υποθετικό αυτό μονοπάτι διαφώνησαν οι Harris και Mantle (2001) οι οποίοι χρησιμοποιώντας σημασμένες πρόδρομες ενώσεις σε αναπτυσσόμενες καλλιέργειες μυκήτων *A. ochraceus* που παράγουν ΟΤΑ, διαπίστωσαν πως τα σημασμένα πρόδρομα έπαιζαν ισχυρό ρόλο στο ενδιάμεσο ΟΤΑ, μέτριο ρόλο στο ενδιάμεσο ΟΤβ και κανέναν ρόλο στην παραγωγή ΟΤΑ μέσω μαλεΐνης.

Σε μια προσπάθεια διαλεύκανσης του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ωχρατοξίνης Α, οι O'Callaghan et al (2003), κλωνοποίησαν πρόσφατα το γονίδιο της

συνθάσης του πολυκετιδίου (pks), το οποίο είναι απαραίτητο στην βιοσύνθεση της ΟΤΑ, χωρίς όμως να πάρουν καμία παραπάνω πληροφορία για την απουσία ή παρουσία κάποιου μεταβολίτη όπως είναι η μαλεΐνη.

Σε μια πιο πρόσφατη δημοσίευση οι Bacha et al. (2009) μελετώντας το ίδιο γονίδιο διαπίστωσαν ότι η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου αυτού είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της ΟΤΑ αλλά όχι και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως είναι η μαλεΐνη.

Τα αποτελέσματα αυτά ήρθαν για να υποστηρίξουν την υπόθεση των Harris και Mantle (2001) για την βιοσύνθεση της ωχρατοξίνης Α μέσω της μαλεΐνης (Khoury & Atoui, 2010).



**Εικόνα 2.4:** Σχηματική απεικόνιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ωχρατοξίνης A σύμφωνα με τους Huff και Hamilton (1979) (πηγή: Khoury & Atoui, 2010).



### 2.3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της Ωχρατοξίνης A

Η ΟΤΑ όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένας φυσικός δευτερογενής μεταβολίτης ο οποίος παράγεται από πολλούς μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Penicillium*. Η ΟΤΑ στα σιτηρά κυρίως παράγεται από τον μύκητα *P. verrucosum* ενώ στα φρούτα, στο καφέ και στο κακάο από τον μύκητα *A. carbonarius*. Οι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, της συγκομιδής και της αποθήκευσης των ευαίσθητων στην ΟΤΑ αγροτικών προϊόντων είναι η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε υγρασία και ο χρόνος που το προϊόν παραμένει κάτω από δυσμενείς συνθήκες.

Άλλοι παράγοντες που ευνοούν την παρουσία των σπορίων είναι οι μηχανικοί παράγοντες (το εσωτερικό μέρος του λαχανικού είναι πιο ευάλωτο στη δράση μυκήτων συγκριτικά με το εξωτερικό μέρος), τα έντομα (με τον μεταβολισμό τους αυξάνουν την υγρασία του υποστρώματος και τη θερμοκρασία κι έτσι διασπούν το προστατευτικό εξωτερικό μέρος του φυτού), οι τραυματισμοί που προκαλούν οι βροχές και οι καταιγίδες, η διαθεσιμότητα των μεταλλικών συστατικών, το pH (γενικά η μούχλα είναι ανθεκτική σε όξινα μέσα και συχνά ικανή να καθιστά το pH του υποστρώματος όξινο), τα επίπεδα του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, χημικοί και φυσικοί χειρισμοί και σε ορισμένα αγροτικά προϊόντα η επανύγρανση και αποξήρανση του προϊόντος.

Πράγματι η γνώση όλων των παραγόντων που εμπλέκονται στη παραγωγή της ΟΤΑ και η αλληλεπίδρασή τους, επιτρέπει πιο ασφαλή πρόβλεψη και καλύτερη μέθοδο πρόληψης, γι' αυτό και πολλές μελέτες πραγματοποιούνται προς αυτήν την κατεύθυνση (Astoreca et al., 2007; Suarez-Quíroz et al., 2004).

Πρέπει όμως να σημειωθεί πως η παρουσία των μυκήτων δεν υπονοεί την παραγωγή ΟΤΑ, εφόσον υπάρχουν συγκεκριμένες βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, οξυγόνου, χρόνου και διαθεσιμότητας θρεπτικών.

## 2.4 ΠΑΤΟΥΛΙΝΗ

### 2.4.1 Γενικά στοιχεία

Η πατουλίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Birkinshaw et al. το 1943 από τα στελέχη *Penicillium griseofulvum* και *Penicillium expansum*. Αυτό ήταν μέρος μιας προσπάθειας ελέγχου της εξεύρεσης για νέα μόρια τοξινών μυκήτων με αντιβιοτική δράση, στα πλαίσια του γενικού ενθουσιασμού μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Fleming. Η ένωση αυτή δοκιμάστηκε σε έναν μεγάλο αριθμό κλινικών δοκιμών μέσω μιας Βρετανικής εταιρείας, ωστόσο, το ενδιαφέρον για αυτό το πιθανό αντιβιοτικό ατόνησε λόγω της ισχυρής τοξικότητας για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Σήμερα, η πατουλίνη ανήκει σε μια σύντομη λίστα μυκοτοξινών (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες Α, ζεαραλενόνη, φουμονισίνες και τριχοθισίνες) των οποίων το επίπεδο στα τρόφιμα ρυθμίζεται σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο με τις Ευρωπαϊκές χώρες να είναι ανάμεσα στις πρώτες που προτείνουν όρια στα επίπεδά τους στα τρόφιμα. Από το 2003 ο Ευρωπαϊκός κανονισμός το ανώτατο όριο των 50μg/L για τους χυμούς φρούτων και τα παράγωγα προϊόντα, 25μg/L για τα στερεά προϊόντα μήλου και 10μg/L για τους χυμούς και τα τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη. Σήμερα, η αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και φαρμάκων (FDA) περιορίζει τα όρια στα 50μg/L (Puel et al., 2010).

### 2.4.2 Παθογόνα που παράγουν την πατουλίνη.

Αρκετές μελέτες που βασίζονται σε ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών μέσω μεθόδων HPLC-DAD ή LC-MS έχουν επιτρέψει την αναθεώρηση του αριθμού των ειδών που παράγουν πατουλίνη. Η πατουλίνη απομονώνεται από διάφορα είδη μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* και *Byssoschlamys*. Μια πρόσφατη ανασκόπηση από παλιές μελέτες αναφέρουν παραγωγή πατουλίνης από έναν μεγάλο αριθμό ειδών τα οποία ανήκουν σε πάνω από 30 γένη.

Μεταξύ των ειδών *Aspergillus*, ο αριθμός των ειδών που παράγουν πατουλίνη περιορίζεται σε τρία είδη της ομάδας *Clavati*, το *Aspergillus clavatus*, το *A. giganteus* και το *A. longivesica*. Για το γένος *Penicillium*, μετά από έλεγχο ενός σημαντικού αριθμού απομονώσεων από κάθε είδος και σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα προσδιορίστηκαν 13 είδη που παράγουν πατουλίνη, τα οποία είναι τα *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomycicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* και *P. vulpinum*.

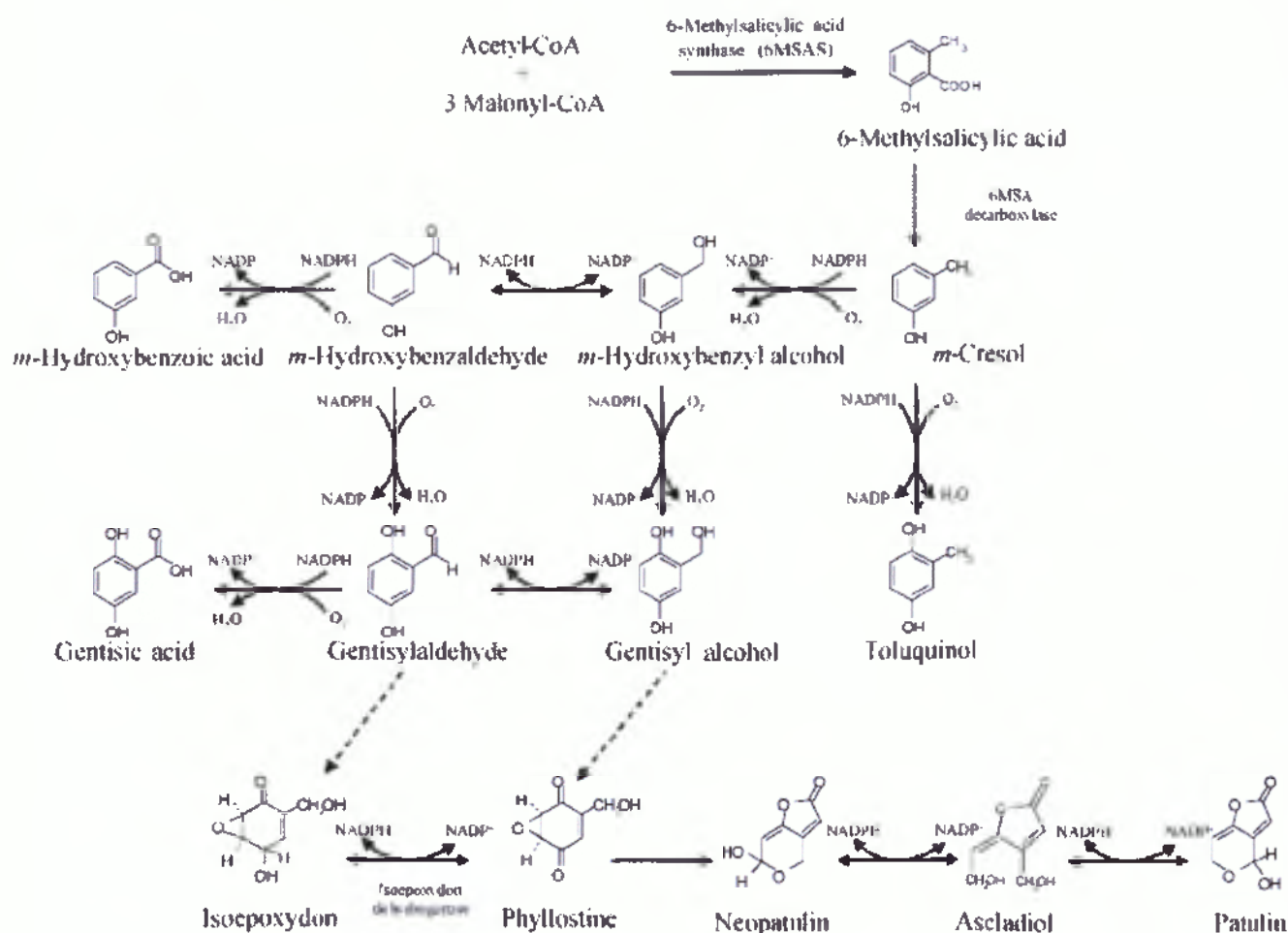
Στην περίπτωση των *Rhizoglyphus* και *Byssochlamys* δυο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες απέδειξαν πρόσφατα πως είδη που είχαν χαρακτηριστεί ως παράγωγα πατουλίνης στην πραγματικότητα δεν παράγουν την συγκεκριμένη μυκοτοξίνη. Μεταξύ αυτών των ειδών, *P. expansum* είναι υπεύθυνο για την αποσύνθεση στα σαρκώδη φρούτα (μήλα και αχλάδια) που χαρακτηρίζεται από ταχεία μαλακή σήψη και τελικά την εμφάνιση από μπλε φλύκταινες. Το είδος αυτό θεωρείται ως η κύρια πηγή πατουλίνης στα φρούτα και κατά συνέπεια στα προϊόντα που παράγονται από αυτά (Puel et al., 2010).

### 2.4.3 Βιοσυνθετικό μονοπάτι πατουλίνης

Η πατουλίνη είναι ένας πολυκετιδικός μεταβολίτης, όπως και πολλές άλλες μεγάλες μυκοτοξίνες π.χ. αφλατοξίνες, φουμοσίνες και ωχρατοξίνες. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της πατουλίνης αποτελείται από 10 βήματα, όπως προτείνεται από διάφορες βιοχημικές (εικόνα 2.5).

Το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση της πατουλίνης είναι ο σχηματισμός 6MSA από την συμπύκνωση μιας μονάδας ακετυλο-CoA και τριών μονάδων μηλονυλο-CoA. Ο σχηματισμός αυτός διεξάγεται από ένα πολυλειτουργικό ένζυμο το οποίο έχει αρκετές ενζυματικές δράσεις όπως ακέτυλο και μηλονυλο μεταφοράση, κετοάκυλο-συνθάση, κετοαναγωγή και αφυδρατάση. Μάλιστα, οι Bu'Lock and Tanenbaum έδειξαν πως το ραδιοσημασμένο 6MSA μετατράπηκε σε πατουλίνη.

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πολλές δραστηριότητες ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της πατουλίνης. Μεταξύ αυτών είναι η υδροξυλίωση της *m*-υδροξυβενζολικής αλκοόλης σε τζεντισυλική αλκοόλη η οποία απαιτεί NADPH και μοριακό οξυγόνο.



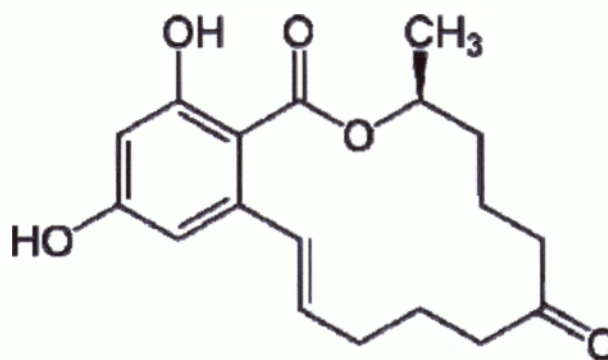
Εικόνα 2.5: Βιοσυνθετικό μονοπάτι πατουλίνης (πηγή: Puel et al., 2010)

## 2.5 ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ

### 2.5.1 Φυτικοχημικές ιδιότητες ζεαραλενόνης

Η Ζεαραλενόνη (zearalenone, ZON), ανήκει στην κατηγορία των μυκοοιστρογόνων, και έχει προκαλέσει την έντονη προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της πιθανότητας να επηρεάζει τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα, τα οποία μπορεί να έχουν τη δυνατότητα να αναστατώνουν τις λειτουργίες των στεροειδών ορμονών που καθορίζουν το φύλο. Πρόκειται για προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού. Τα είδη *Fusarium* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ZON και απαντώνται συχνότερα στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις είναι το *F. graminearum* και το *F. culmorum* και σπανιότερα, το *F. equiseti* και *F. cerealis*.

Η ζεαραλενόνη είναι μια λακτόνη του 6 (10-υδροξύ-6-όξο-τρανς-1-εντενέκυλο)-β-ρεσορκυκλικού οξέος με μοριακό τύπο  $C_{18}H_{22}O_5$  και μοριακό βάρος 318,36. Οι μεταβολίτες α- και β-ZEN είναι τα δύο ισομερή που σχηματίζονται με την αναγωγή της κετονο-ομάδας του άνθρακα στη θέση 6 του δακτυλίου της λακτόνης, σε υδροξύλο-ομάδα ( $C=O \rightarrow C-OH$ ) και έχουν μοριακό τύπο  $C_{18}H_{24}O_5$ , και μοριακό βάρος 320,36 (εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Χημική δομή της ζεαραλενόνης (πηγή: <http://en.wikipedia.org>).

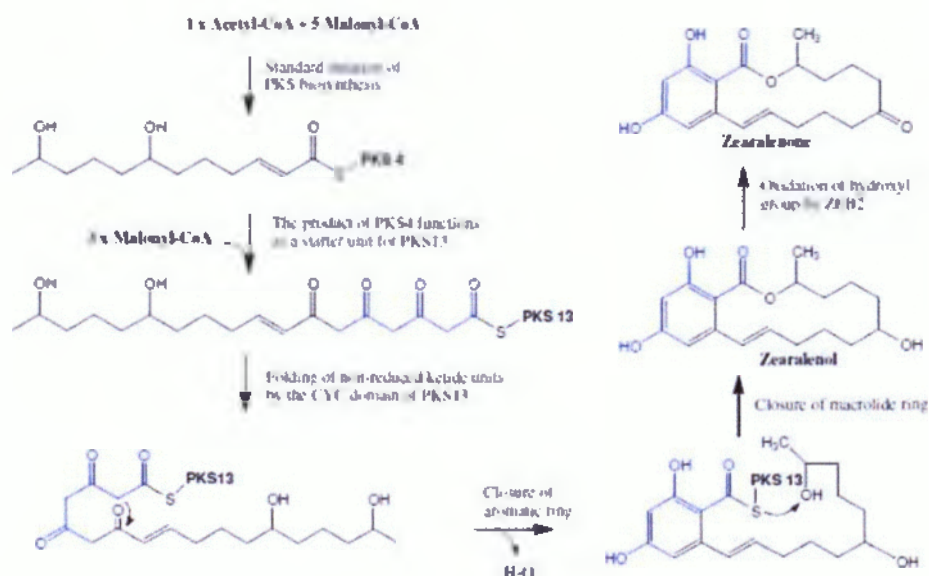
Η Ζεαραλενόνη είναι ένα άσπρο κρυσταλλικό στερεό με το σημείο τήξης της να κυμαίνεται από 159-165 OC, ενώ το μοριακό της βάρος είναι 318,36. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι 0,002g/100ml. Είναι λιγότερο διαλυτή στο εξάνιο και παρουσιάζει



σταδιακή αύξηση στο βενζόλιο, το ακετονιτρίλιο, τη μεθανόλη, την αιθανόλη και την ακετόνη. Είναι επίσης διαλυτή στα υδάτινα αλκαλικά διαλύματα.

## 2.5.2 Βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης

Οι ζεαραλενόνες βιοσυντίθενται μέσω ενός πολυκετιδικού μονοπατιού από τα είδη *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* και *Fusarium crookwellense*. Η βιοσυνθετική οδός αρχίζει με το FgPKS4, έναν αναγωγικό PKS, το οποίο καταλύει την συμπύκνωση ενός ακέτυλο-CoA με πέντε μονάδες μηλότυλ-CoA, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός εξακετιδίου. Μέσα από διάφορες αντιδράσεις οι οποίες φαίνονται στην εικόνα 2.7 το εξακετίδιο μετασχηματίζεται σε ζεαραλενόλη και αυτό με την σειρά του σε ζεαραλενόνη μέσω της δράσης του ενζύμου ισοαμυλική-αλκοολική οξειδάση (ZEB1) (Kim et al., 2005; Gaffoor et al., 2005).



**Εικόνα 2.7:** Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ζεαραλενόνης (πηγή: <http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm>).

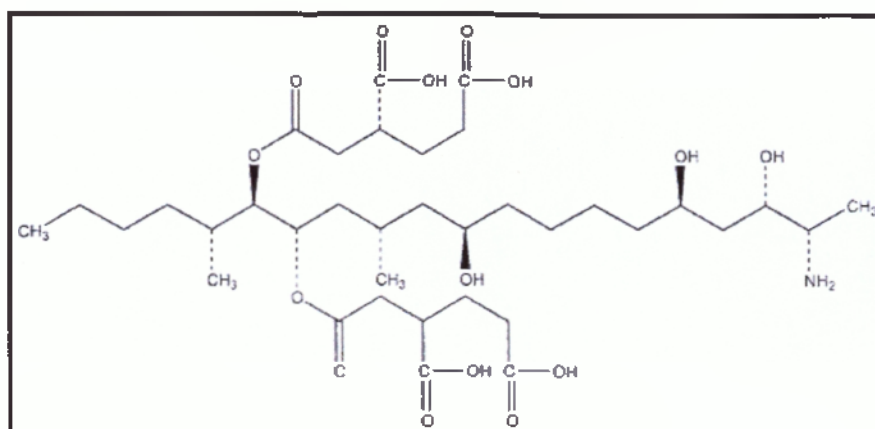
## 2.6 ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ

### 2.6.1 Γενικά στοιχεία

Οι Φουμονισίνες περιγράφηκαν και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά το 1988. Το πιο άφθονα παραγόμενο μέλος της οικογένειας των φουμονισινών είναι η φουμονισίνη ΒΙ. Πιστεύεται ότι συντίθενται με συμπύκνωση του αμινοξέος αλανίνη μέσω ενός οξικού προδρόμου. Οι φουμονισίνες παράγονται από έναν μεγάλο αριθμό ειδών του γένους *Fusarium*, τα *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium nygamai*. Το κυριότερο είδος υψηλής οικονομικής σημασίας είναι το *Fusarium verticillioides*, το οποίο αναπτύσσεται στο καλαμπόκι τόσο στον βλαστικό όσο και στον αναπαραγωγικό ιστό, συνήθως χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό. Ωστόσο όταν οι καιρικές συνθήκες, η ζημιά από τα έντομα και ο κατάλληλος μύκητας είναι παρόντες, μπορεί να προκαλέσει ξήρανση των νεαρών φύλλων και σήψη του στελέχους των φυτών. Τα περισσότερα στελέχη του *Fusarium verticillioides* δεν παράγουν την τοξίνη, γι' αυτό το λόγο η παρουσία των μυκήτων δεν σημαίνει και παραγωγή φουμονισινών. Παρόλο που είναι φυτοτοξική, η φουμονισίνη ΒΙ δεν είναι απαραίτητη για την παθογένεση των φυτών (Bennett & Klich, 2003).

### 2.6.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες φουμονισινών

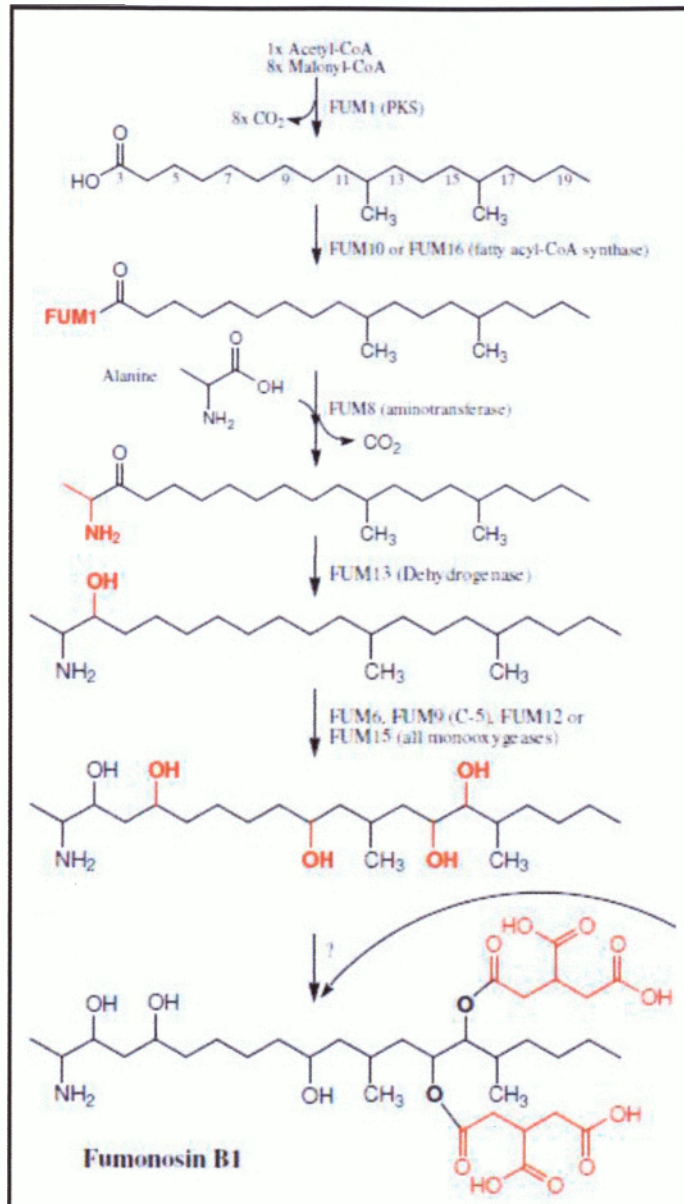
Οι Φουμονισίνες είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτές, πολικές ενώσεις που είναι διαλυτές στο νερό και τα διαλύματα ύδατος της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου, αλλά δεν είναι διαλυτοί στους μη πολικούς διαλύτες και σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες. Δεν περιέχουν αρωματικό δακτύλιο ή χρωμοφόρες περιοχές, ώστε να είναι εύκολη η ανίχνευσή τους παρουσιάζονται ιδιαίτερα σταθερές σε ένα πλήθος χημικών διαδικασιών και αλλαγών στη θερμοκρασία. Η χημική δομή της Φουμονισίνης ΒΙ δίνεται στην εικόνα 2.8.



Εικόνα 2.8: Χημικός τύπος της Φουμονισίνης B1 (πηγή: Bennett & Klich, 2003).

### 2.6.3 Βιοσύνθεση Φουμονισινών

Η βιοσύνθεση της φουμονισίνης έχει περιγραφεί στο *F. moniliforme*, αλλά πιστεύεται πως είναι παρόμοιο με το βιοσυνθετικό μονοπάτι στο *F. graminearum*. Διελεύκανση για το γενετικό υπόβαθρο της βιοσύνθεσης της φουμονισίνης δόθηκε ακολουθούμενη από μελέτες το 1999 και το 2001, οι οποίες προσδιόρισαν ένα σύμπλεγμα πέντε γονιδίων που απαιτούνται για την σύνθεση. Στη συνέχεια η χαρτογράφηση και ο χαρακτηρισμός αυτών των γονιδίων είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση 16 συν-εκφραζόμενων γονιδίων υπεύθυνα για την εξαιρετικά πολύπλοκη βιοσυνθετική οδό η οποία περιλαμβάνει μια iPKS, συνθάσες λιπαρών οξέων και πολυάριθμες και ποικίλες κατηγορίες τροποποιητικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των μονοοξυγεασών, αφυδρογονασών, μια αμινοτρανσφεράση και μια διοξυγενάση (εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Βιοσυνθετικό μονοπάτι φουμονισίνης B1 (πηγή: Proctor et al., 2003)

## 2.7 ΚΙΤΡΙΝΙΝΗ

### 2.7.1 Γενικά

Η κιτρινίνη είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον νηματώδη μύκητα *Penicillium citrinum* πριν από τον Δεύτερο

παγκόσμιο πόλεμο. Στη συνέχεια εντοπίστηκε σε πάνω από δώδεκα είδη *Penicillium* και σε διάφορα είδη *Aspergillus* συμπεριλαμβανομένων συγκεκριμένων στελεχών όπως το *Penicillium camemberti* που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριού και του *Aspergillus oryzae* όπου χρησιμοποιείται στην παραγωγή σάκε και σάλτσα σόγιας. Πιο πρόσφατα, η κιτρινίνη απομονώθηκε από τα είδη *Monascus ruber* and *Monascus purpureus*, βιομηχανικά είδη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κόκκινων χρωστικών ουσιών (Bennett and Klich, 2003).

Λόγο των αντιβακτηριδιακής δράσης, η κιτρινίνη ερευνήθηκε ως αντιβιοτικό, αλλά οι σχετικές έρευνες τοξικότητας έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος δευτερογενής μεταβολίτης δρά στα ζώα ως νεφροτοξίνη.

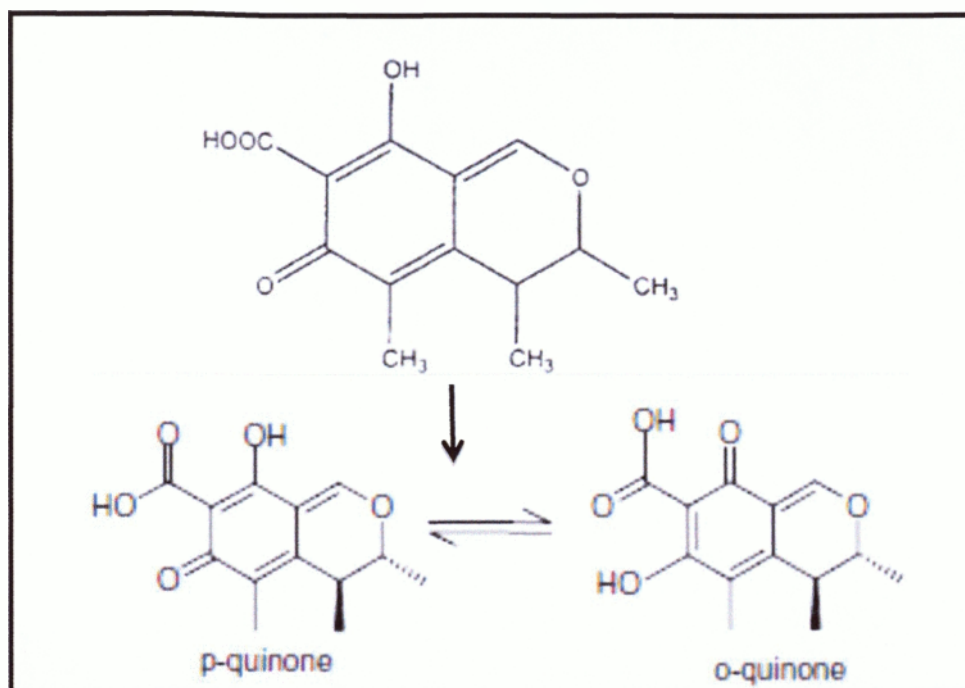
Το σιτάρι, η βρώμη, το καλαμπόκι, το κριθάρι και το ρύζι έχουν όλα αναφερθεί ότι περιέχουν κιτρινίνη. Μέσω ανοσολογικών δοκιμασιών, κιτρινίνη βρέθηκε σε ορισμένα χορτοφαγικά τρόφιμα τα οποία χρωματίζονται με χρωστικές του *Monascus*. Επίσης η τοξίνη αυτή έχει βρεθεί σε φυσικά παρασκευασμένα λουκάνικα της Ιταλίας. Αν και τακτικά η κιτρινίνη συνδέεται με τα τρόφιμα που καταναλώνει ο άνθρωπος, ωστόσο η σημασία της για την ανθρώπινη υγεία είναι ακόμη άγνωστη (Xu et al., 2006).

## 2.7.2 Φυσικό-χημικές ιδιότητες

Η κιτρινίνη ( $C_{13}H_{14}O_5$ ) είναι ένας όξινος λεμονί κρύσταλλος με μέγιστη υπεριώδης απορρόφηση στα 250nm και 333nm (σε μεθανόλη). Έχει σημείο τήξης τους 172°C. Είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό αλλά πολύ καλά διαλυτό σε αραιό υπεροξείδιο του νατρίου, οξικό ανθρακικό νάτριο, καυστικό νάτριο, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, αιθανόλη και γενικά στους περισσότερους πολικούς οργανικούς διαλύτες. Είναι ικανή για τον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων και μπορεί να υποβαθμιστεί με όξινο ή αλκαλικό διάλυμα ή με θέρμανση. Είναι μια κινόνη μεθιδίου με δυο ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου (εικόνα 2.10). Η κιτρινίνη κρυσταλώνει σε μια ασταθή δομή, με την p-κινόνη και την o-κινόνη δυο ταυτομερείς μορφές σε μια δυναμική ισορροπία στην στερεά κατάσταση. Σε μεθανόλη ή μίγματα χλωριούχου



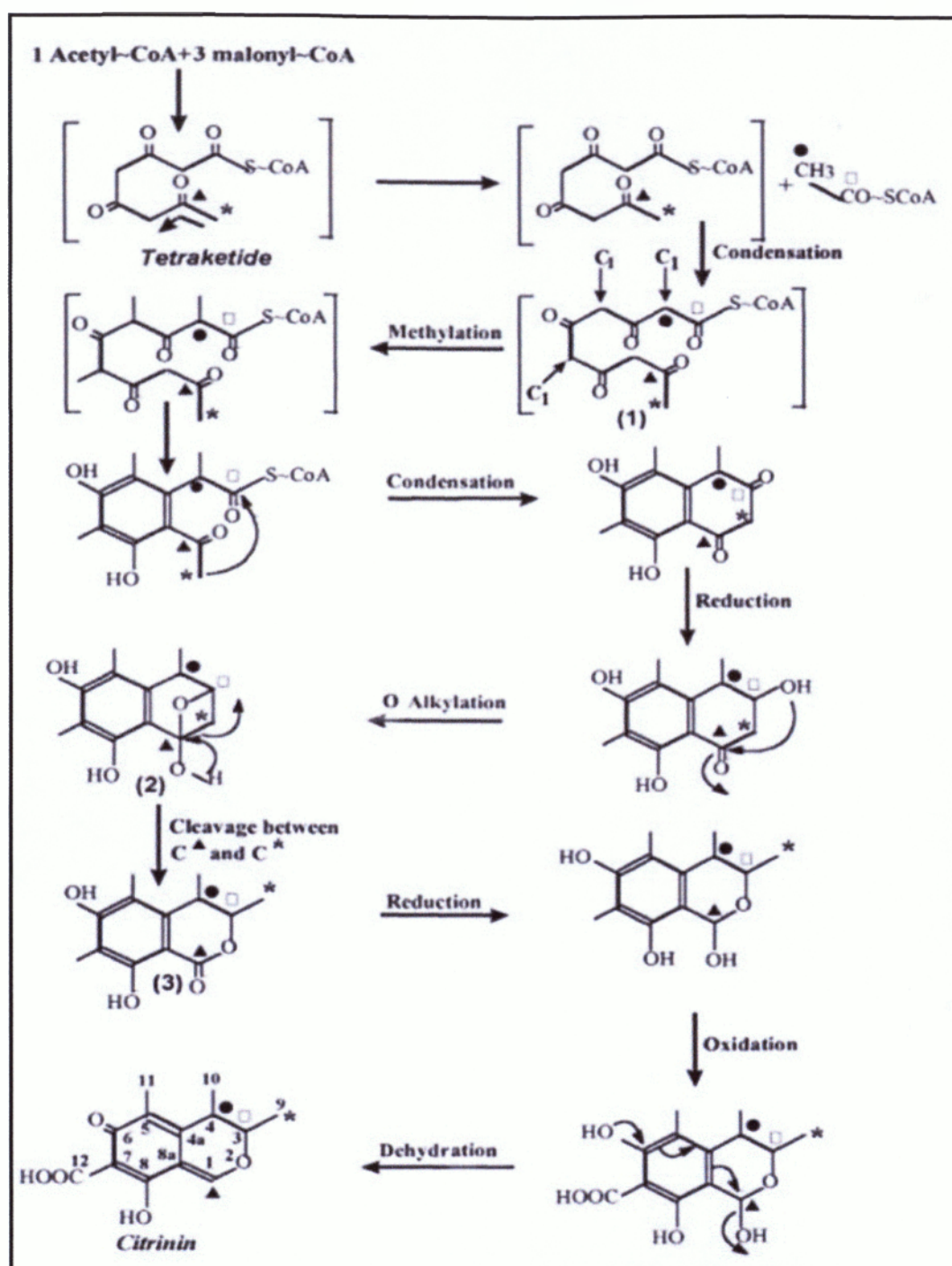
μεθυλενίου υφίσταται αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης (αντίδραση Michael). Η αντίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή και μετατοπίζεται προς φυσιολογική κιτρινίνη όταν η θερμοκρασία είναι αυξημένη μέσω χλωριούσου μεθυλενίου.



Εικόνα 2.10: Η χημική δομή της κιτρινίνης και των δυο ταυτομερών μορφών της, *p*-κινόνη και *o*-κινόνη (πηγή: Xu et al., 2006).

### 2.7.3 Βιοσύνθεση Κιτρινίνης

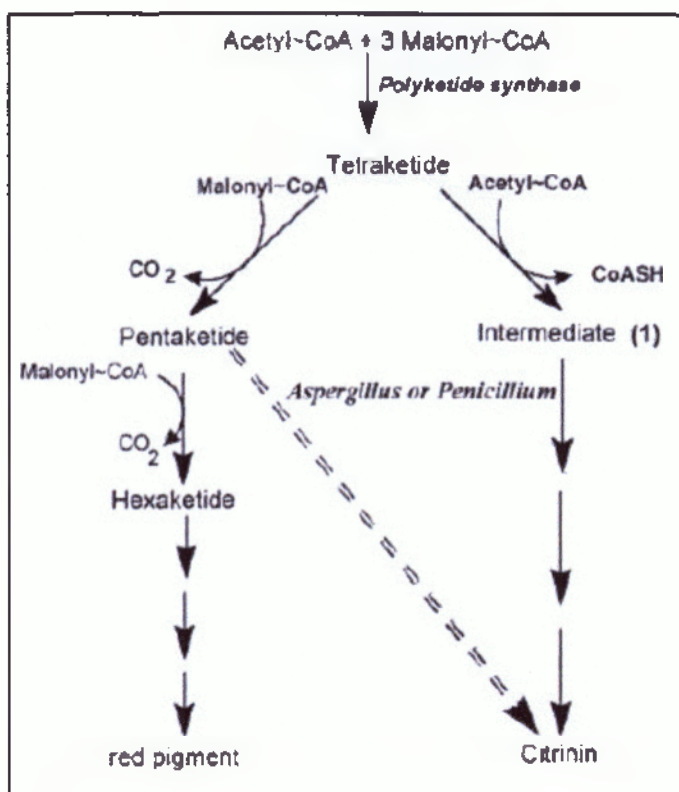
Το πολυκετιδιακό μονοπάτι είναι μια πολύ γνωστή οδός για την σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων τις μυκοτοξίνες από νηματώδεις μύκητες. Η τελευταία μελέτη στο βιοσυνθετικό μονοπάτι μέσω της τεχνικής NMR αποκάλυψε πως η βιοσύνθεση της κιτρινίνης προήλθε από ένα τετρακετίδιο στο νηματώδη μύκητα *Monascus ruber*, κάτι που διαφέρει από το πεντακετίδιο που έχει αποδειχθεί για τα είδη *Penicillium* και *Aspergillus* (εικόνα 2.11 και 2.12).



Εικόνα 2.11: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής κιτρινίνης στο μύκητα *Monascus ruber* σύμφωνα με τον Hajjaj et al., 1999.

Επιπλέον, η παραγωγή κιτρινίνης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως τον εφοδιασμό οξυγόνου, τις πηγές άνθρακα και αζώτου, τα λιπαρά οξέα και

περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η δραστηκότητα του νερού, η θερμοκρασία καθώς και οι μέθοδοι αποθήκευσης και συντήρησης του εμπορεύματος.



**Εικόνα 2.12:** βιοσύνθεση κιτρινίνης και κόκκινων χρωστικών από το *Monascus ruber*. Το τοξικό μονοπάτι παραγωγής από τα *Penicillium* και *Aspergillus* δίνεται με το διακεκομμένο βέλος (πηγή: A. M. Abou-Zeid, 2012)

#### 2.7.4 Τοξικότητα και σταθερότητα κιτρινίνης

Ως μια από τις μυκοτοξίνες, η κιτρινίνη έχει αντιβιοτική, βακτηριοστατική, αντιμυκητιακή και αντιπρωτοζωϊκή δράση. Επίσης είναι γνωστή ως νεφροτοξίνη σε ένα ευρύ φάσμα ειδών. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η κιτρινίνη προκαλεί πολλαπλές επιδράσεις στην μιτοχονδριακή λειτουργία του νεφρού και τη βιοσύνθεση μακρομορίων, οι οποίες έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η κιτρινίνη εμφανίζεται να δρά συνεργιστικά μαζί με μια άλλη νεφροτοξίνη, την ωχρατοξίνη Α, στα τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τα φρούτα και το κρέας. Για την αποφυγή της άμεσης ή έμμεσης πρόσληψης κιτρινίνης, είναι σημαντικό να

αναπτυχθούν μέθοδοι αποτοξίνωσης κατά τη διάρκεια της επεξεργασία τροφίμων. Έρευνα για την θερμική αποσύνθεση και αποτοξίνωση έδειξε ότι, υπό την παρουσία μιας μικρής ποσότητας νερού, θερμαίνοντας την κιτρινίνη στους 130°C προκάλεσε μια σημαντική μείωση στην τοξικότητα των κυττάρων (Xu et al., 2006).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### «ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ»

#### 3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η ανίχνευση των μυκοτοξινών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρουν στην υγεία ανθρώπων και ζώων η ύπαρξή τους στα τρόφιμα ή τις ζωοτροφές. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι ζωτικής σημασίας το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες (Gilbert et al., 2002). Εάν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο ή αντίστροφα προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές δημιουργώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο. Νομοθετικά (Καν. 882/2004 Παρ.3), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια:

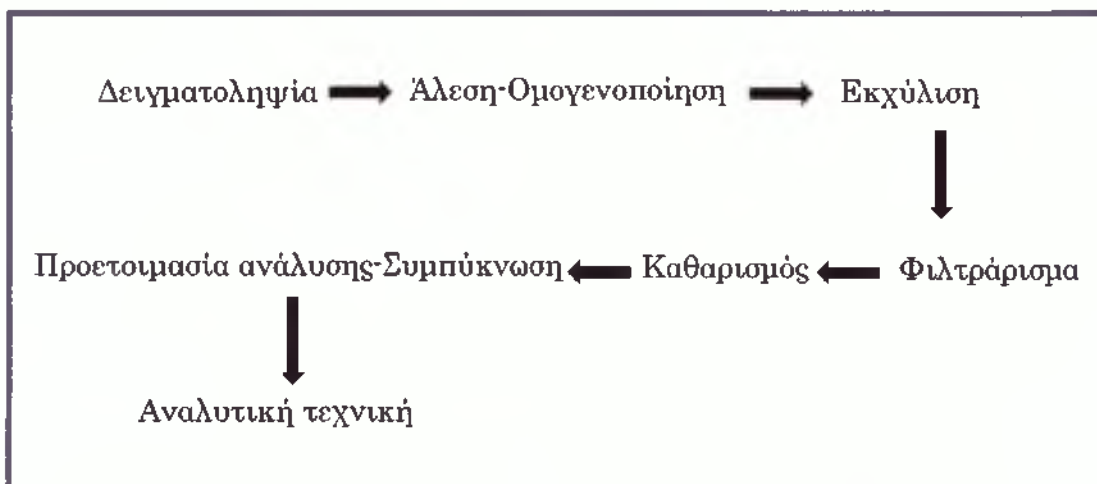
- |                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| 1. ορθότητα,           | 7. αναπαραγωγιμότητα, |
| 2. ευκολία εφαρμογής,  | 8. ανάκτηση,          |
| 3. όριο ανίχνευσης,    | 9. επιλεκτικότητα,    |
| 4. όριο προσδιορισμού, | 10. ευαισθησία,       |
| 5. ακρίβεια,           | 11. γραμμικότητα,     |
| 6. επαναληψιμότητα,    | 12. αβεβαιότητα.      |



Για την ανάλυση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of Analytical Communities). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών λαμβάνοντας υπ' όψιν τα θεσμοθετημένα όρια.

Είναι επίσης αναγκαίο τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους με ποσοστά απόδοσης όπως απαιτούνται από τη νομοθεσία (Καν 401/2006). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα προσδιορισμού, η χρήση των οποίων εξαρτάται από την υλικοτεχνική υποδομή που έχουν τα διάφορα εργαστήρια, τις οικονομικές τους δυνατότητες, τον χρόνο της ανάλυσης και την ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης μεθόδου.

Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο της ύπαρξης μυκοτοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των μυκοτοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και τέλος ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός, με διάφορες μεθόδους (Maroto et al., 2005) (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Τοπικό διάγραμμα ροής προσδιορισμού μυκοτοξινών (Maroto et al., 2005)

## 3.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία αφορά την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας, στο οποίο θα γίνει και η ανάλυση. Η δειγματοληψία είναι το πιο σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης δεδομένου ότι οι μυκοτοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα. Στον ευρωπαϊκό κανονισμό που καθορίζεται ο τρόπος δειγματοληψίας για τον έλεγχο των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αναφέρεται επίσης ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια με την οποία καθορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών, τα οποία κατανέμονται κατά τρόπο ανομοιόμορφο σε μία παρτίδα, ειδικότερα σε παρτίδα τροφίμων με σωματίδια μεγάλου μεγέθους (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006).

- ❖ **Προετοιμασία δείγματος.** Η προετοιμασία αποσκοπεί στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια και να επιτευχθεί καλύτερη εκχύλιση από τον διαλύτη. Η άλεση του δείγματος και η δημιουργία μικρών σωματιδίων ομογενοποιεί το δείγμα, στάδιο το οποίο αν και χρονοβόρο είναι απολύτως απαραίτητο και βασικό στην ανάλυση.

## 3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα διάφορα υποστρώματα ή τρόφιμα. Λόγω της διαφορετικής φύσης των προϊόντων που είναι δυνατό να μολυνθούν από μυκοτοξίνες, δεν υπάρχει μία μοναδική μέθοδος κατάλληλη για όλα τα προϊόντα. Η εκχύλιση υγρού-στερεού είναι μία από τις συνήθεις διαδικασίες στην ανάλυση μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα. Η εκχύλιση, κατά ένα μεγάλο μέρος εξαρτάται από τις φυσικο-χημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες και ουσιαστικά βασίζεται στη διαλυτότητα των μυκοτοξινών σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες. Για παράδειγμα, υλικά με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και χρωστικές απαιτούν μία πιο εκλεκτική εφαρμογή, η οποία ακολουθείται από εκτεταμένες μεθόδους καθαρισμού για τον προσδιορισμό της μυκοτοξίνης. Ο διαλύτης θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να εκχυλίζει μόνο αυτό που

θέλουμε να αναλύσουμε –μυκοτοξίνη- με την προσθήκη όσο το δυνατό λιγότερων χημικών ενώσεων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδρασή τους στο τελικό στάδιο της ανάλυσης.

Για την εκχύλιση, χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή μίγματα τους όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη, λόγω του ότι οι μυκοτοξίνες είναι διαλυτές σε μετρίως ή ελαφρώς πολικούς διαλύτες. Επίσης, η χρήση μικρών ποσοτήτων νερού σε συνδυασμό με τους προαναφερόμενους διαλύτες υγραίνει το υπόστρωμα αυξάνοντας έτσι τη διείσδυση των οργανικών διαλυτών στο δείγμα άρα βελτιώνει την εκχύλιση της μυκοτοξίνης. Οι πιο συνήθεις διαλύτες για την εκχύλιση μυκοτοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι μίγματα χλωροφορμίου-νερού, μεθανόλης-νερού, μεθανόλης-ακετονιτριλίου- νερού και ακετονιτριλίου νερού (Aghamohammadi et al., 2007).

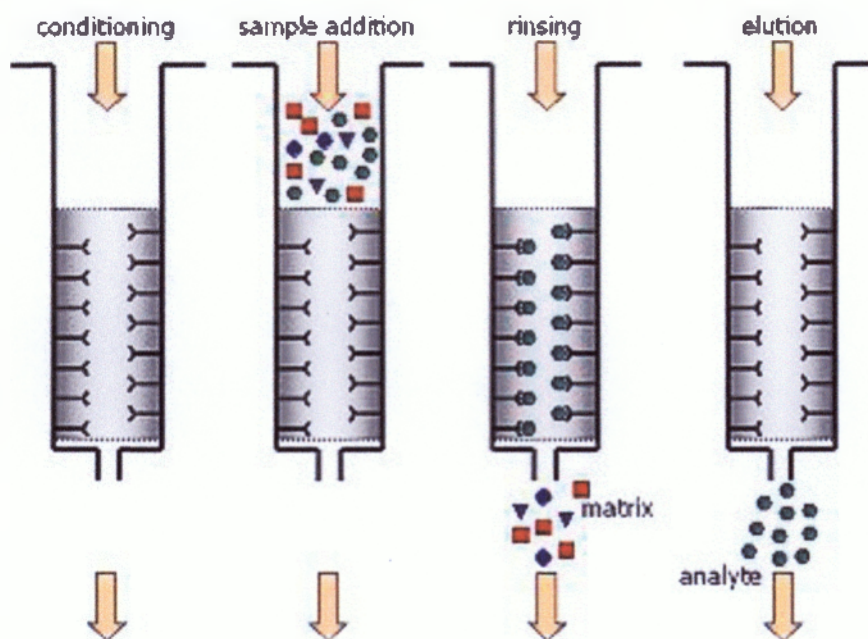
### **3.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ**

Οι περισσότερες μέθοδοι που κυρίως χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μυκοτοξινών βασίζονται συνήθως σε μία διαδικασία καθαρισμού, ο οποίος πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση. Γενικότερα, όπου ο καθαρισμός αποτελεί απαραίτητο στάδιο της διαδικασίας, χρησιμοποιούνται διαχωριστές υγρού-υγρού (φίλτρα) ή πιο πρόσφατα συσκευές εκχύλισης στερεής φάσης (solid phase extraction cartridges) και στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC). Οι τελευταίες, αποτελούν το πιο σύγχρονο εργαλείο καθαρισμού για τις αναλύσεις μυκοτοξίνης (εικόνα 3.2). Μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι πολύ εξειδικευμένα για μυκοτοξίνες ακινητοποιούνται επάνω σε σεφαρόζη και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε μικρές στήλες. Η προς εξέταση τοξίνη συλλέγεται με έκλουση με κατάλληλο διαλύτη. Έτσι, τα εκχυλίσματα από το δείγμα του τροφίμου περνούν μέσα από τη στήλη και τελικά παραλαμβάνεται ένα εντελώς καθαρό εκχύλισμα ελεύθερο από άλλες ουσίες (European Mycotoxin Awareness Network, 2007).

Οι στήλες ανοσοσυγγένειας έχουν δείξει πολλά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε διάφορα τρόφιμα λόγω του ότι δίνουν τη δυνατότητα μεγαλύτερων όγκων εκχυλίσματος του δείγματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου.

Επιπλέον, δεν είναι απαιτητικές όσον αφορά την ικανότητα και την εμπειρία που απαιτείται από το χρήστη. Ως μοναδικό μειονέκτημα είναι το κόστος, λόγω του ότι είναι μιας χρήσης (Gilbert et al., 2002).

Ο ρυθμός ροής του υγρού της εκχύλισης από τα διάφορα φίλτρα καθαρισμού είναι πολύ σημαντικός για την απόδοση της εκχύλισης και την παραλαβή όσο το δυνατό πιο καθαρής μυκοτοξίνης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όσο μειώνεται ο ρυθμός ροής και αυξάνει έτσι ο χρόνος του καθαρισμού, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης λόγω του ότι ο χρόνος επαφής του διαλύτη και του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος. Το διάλυμα που εκχυλίζεται μετά και τον καθαρισμό συλλέγεται και συμπυκνώνεται για την περαιτέρω ανάλυση.



*Εικόνα 3.2: Βασική αρχή λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας (πηγή: European Mycotoxin Awareness Network).*

### 3.5. ΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Για την ανάλυση μυκοτοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι διαθέσιμες διάφορες μέθοδοι και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως TLC, HPLC, RIA, ELISA, SPR και

ανοσοδοκιμές. Εκτενέστατα για την ανάλυση μυκοτοξίνης χρησιμοποιούνταν η τεχνική ανάλυσης με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC-Thin Layer Chromatography) και είχε προταθεί ως επίσημη μέθοδος ανάλυσης αφλατοξινών για κελυφωτά φιστίκια από τον AOAC7 (Association of Official Analytical Chemists). Αργότερα, σημειώθηκε μία σημαντική αύξηση στη χρήση της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), η οποία έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης-HPLC. Πλέον, η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η HPLC για την ανάλυση αφλατοξίνης, αλλά και άλλων μυκοτοξινών (π.χ. πατουλίνης σε χυμό μήλου, ωχρατοξίνης σε αραβόσιτο), λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με την μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent). Μεταξύ των άλλων οι τεχνικές ανοσοδιαγνωστικής όπως η ELISA και η RIA επιδεικνύουν ταχύτητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων, εντούτοις η χρήση τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως συμπληρωματική.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της HPLC έχει αυξηθεί με αποτέλεσμα να έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες για την εφαρμογή της στην ανάλυση αφλατοξινών, αλλά και έχει γίνει αποδεκτή από τις επίσημες μεθόδους ανάλυσης AOAC για μυκοτοξίνες. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου ανάλυσης με HPLC φαίνεται να είναι η δυνατότητα αυτοματοποίησης όπως επίσης η ταχύτητα και η υψηλή ανάλυση (Pearson et al., 1999). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η υπεροχή και επικράτηση της HPLC ως μεθόδου για την ανάλυση μυκοτοξινών σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους και ιδιαίτερα τις ανοσοχημικές είναι ο υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας και ακρίβειάς της. Η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει εφαρμοστεί σε μια σειρά υποστρωμάτων και τροφίμων για τον έλεγχο της παρουσίας σε αφλατοξίνες όπως σιτηρά, βαμβακόσπορο, κρασί, αραβόσιτο, ξηροί καρποί, μπαχαρικά κ.α. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει κόστος και απαιτεί πιο εξειδικευμένο και έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό.

### 3.5.1. Κλασικές αναλυτικές τεχνικές

Ο όρος κλασική τεχνική συνήθως αναφέρεται σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς οι οποίοι είναι συνδυασμένοι με τον κατάλληλο ανιχνευτή. Οι



ποσοτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών σε τρόφιμα περιλαμβάνουν ανοσοχημικές στήλες, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) ή Αέρια Χρωματογραφία (G.C) σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών όπως ανιχνευτές φθορισμού (FLD), ιονισμού φλόγας (FID), συλλήψεως ηλεκτρονίων (ECD), ανιχνευτές υπεριώδους (UV) ή ακόμα και φασματοσκοπία μάζας (MS).

### 3.5.2. Υγρή χρωματογραφία / Φασματοσκοπία μάζας (LC/MS)

#### 3.5.2.1 NP-HPLC και RP-HPLC

Τα πρώτα χρόνια εφαρμογής της μεθόδου χρησιμοποιούνταν η HPLC κανονικής φάσης με σύστημα ανίχνευσης για απορρόφηση στο UV. Γρήγορα αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ικανοποιητική για τον προσδιορισμό αφλατοξίνης σε επίπεδα νανογραμμαρίων (ng). Λόγω του ότι οι αφλατοξίνες φθορίζουν, ένα σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης θεωρήθηκε καταλληλότερο, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου. Ένα όμως από τα πιο σημαντικά προβλήματα είναι η εξάρτηση της ικανότητας φθορισμού των κυρίων αφλατοξινών (B1, B2, G1, G2) από τη σύνθεση του διαλύτη. Η NP-HPLC από την δεκαετία του '70 σταμάτησε να χρησιμοποιείται μετά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης, λόγω μειωμένης επαναληψιμότητας των χρόνων συγκράτησης όταν το νερό ή οργανικοί διαλύτες μεταβάλλουν την υγρασία του χρωματογραφικού μέσου (silica ή αλουμίνα).

Σήμερα, η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως HPLC χωρίς να επεξηγείται ιδιαίτερα. Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη-πολική στατική φάση (συνήθως silica στο οποίο έχει εφαρμοστεί RMe<sub>2</sub> SiCl, όπου R είναι αλκύλιο όπως C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> ή C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) και μία υδατική μέτρια πολική κινητή φάση. Το σύστημα RP-HPLC αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ευκολίας στο χειρισμό και της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση.

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα: α) δοχείο κινητής φάσης-διαλύτης, β) αντλία, γ) σύστημα εισαγωγής δείγματος, δ) στήλη, ε) ανιχνευτής και στ) καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής.

Το δοχείο ή τα δοχεία κινητής φάσης ή φάσεων είναι συνήθως γυάλινης κατασκευής και χωρητικότητας τουλάχιστον 500ml. Στο σωλήνα τροφοδοσίας προσαρμόζεται ειδικό φίλτρο (2μm) που παρεμποδίζει την μεταφορά σωματιδίων που μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα στην αντλία. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και να έχει απαρεωθεί.

Η αντλία είναι η καρδιά του συστήματος HPLC. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης και συνδυάζεται με σύστημα για την βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλυση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλυση η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.

Η έγχυση του δείγματος γίνεται με σύριγγα. Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-500μl. Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη. Η ποιότητα της βαλβίδας κρίνεται κατ' αρχήν από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος. Σημαντικό ρόλο παίζει η κεφαλή, γιατί από το σχήμα της εξαρτάται η κατανομή ταχυτήτων της κινητής φάσης, μέσα στη στήλη. Φυσικά σημασία έχει και η ποιότητα των υλικών κατασκευής, τα οποία θα πρέπει να είναι από αδρανή ως προς την χρησιμοποιούμενη κινητή φάση υλικά. Επίσης, υπάρχουν βαλβίδες εισαγωγής που η λειτουργία τους ελέγχεται αυτόματα από την κεντρική μονάδα ελέγχου του συστήματος HPLC, αν και πολλοί χρήστες προτιμούν για διάφορους λόγους χειροκίνητο χειρισμό.

Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης για να αντέχει στις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια λειτουργίας του συστήματος. Το

μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100cm. Συνήθως κατασκευάζονται στήλες μήκους 25-30cm.

Η στατική φάση μπορεί αν επικαλυφθεί στο αδρανές υλικό: α) φυσικά, κατόπιν διάλυσης της στατικής φάσης στον κατάλληλο διαλύτη, προσθήκης του αδρανούς υλικού, ανάμειξης και απομάκρυνσης του διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό ή β) χημικά, οπότε προκύπτει η λεγόμενη δεσμευμένη στατική φάση, όπου συνήθως χρησιμοποιούνται υποστρώματα με βάση την πυριτική γη επί της οποίας με χημική αντίδραση προστίθεται η επιθυμητή ομάδα.

Ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν, ως ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί φωτόμετρο, διαφορικό διαθλασίμετρο, ηλεκτροχημικός ανιχνευτής και φθορισμόμετρο. Ο καταγραφέας αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσιάσεως του χρωματογραφήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί καταγραφέα είναι εφοδιασμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή (Λιοδάκης 1986, Πολυσίου 1989, Χατζηιωάννου 1998, Ταραντίλης και Πολυσίου, 2001).

### **3.5.5.2 LC/MS**

Την τελευταία δεκαετία η LC/MS αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την ποιοτική ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών. Παρόλα αυτά η σημαντική αυτή εξέλιξη δε συνέβη μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Συγκρινόμενη με τις κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους ανίχνευσης όπως UV, η φασματοσκοπία μάζας μπορεί να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και επιλεκτικότητα (αν και ο ανιχνευτής φθορισμού μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητος για τις αφλατοξίνες). Επιπροσθέτως είναι δυνατό να διερευνήσει τη μοριακή δομή μεταβολιτών (κρυμμένες μυκοτοξίνες-masked mycotoxins) [138] και να παρακάμψει τελείως τα στάδια της παραγοντοποίησης και του καθαρισμού που είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και ελλοχεύουν κινδύνους για εργαστηριακά λάθη. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μικρή ποσότητα του αρχικού προπαρασκευαστικού δείγματος. Υπάρχει κίνδυνος μείωσης της ακρίβειας της μεθόδου εξαιτίας της τελείως απρόβλεπτης επίδρασης των συστατικών που

συνυπάρχουν στο αρχικό δείγμα με την αναλυόμενη ουσία. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός μεθόδων που έχουν σαν βάση την LC/MS (Zollner P., Mayer-Helm B., 2006).

### **3.2.3.2 Μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών**

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη μεθόδων που αφορούν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC-MS/MS. Αυτή η τάση ήταν αποτέλεσμα της ανακάλυψης ότι πολλές μυκοτοξίνες μπορούσαν να συνυπάρχουν σε ένα υπόστρωμα καθώς επίσης και ότι παρουσίαζαν συνεργιστική δράση με αποτέλεσμα να θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου. Επιπροσθέτως ήταν εξαιρετικά επιθυμητή η ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα επέτρεπε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων σχεδόν των μυκοτοξινών πραγματοποιώντας μια και μόνο ανάλυση. Αυτό θα μείωνε εξαιρετικά το κόστος αλλά και τον χρόνο της ανάλυσης. Αν και η φασματοσκοπία μάζας συχνά προσφέρει επαρκή επιλεκτικότητα και ευαισθησία, η εφαρμογή της στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μυκοτοξινών, παρεμποδίστηκε μόνο από την διαφορετικότητα που παρουσιάζουν στις χημικές ιδιότητες τους οι τοξίνες όπως (οξύτητα, βασικότητα, πολικότητα). Για αυτό τον λόγο έπρεπε να υπάρξουν συμβιβασμοί ως προς την επιλογή της κινητής φάσης, του μέσου εκχύλισης αλλά και για τις πειραματικές συνθήκες (Creppy et al., 2004).

Το αρχικό ερέθισμα για την ταυτόχρονη ανάλυση μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC/MS προήλθε από τον τομέα της μυκητολογίας. Εκεί η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιήθηκε για να αναγνωρίσει συγκεκριμένα είδη χρησιμοποιώντας τους μεταβολίτες τους. Η τεράστια ανάπτυξη των βάσεων δεδομένων για την ποιοτική ανίχνευση μυκοτοξινών στην LC/MS, οδήγησε στην ανάπτυξη και ποσοτικών μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τοξινών σε υλικά κατασκευής κτηρίων αλλά και σε είδη διατροφής.

Ενώ η προηγούμενη μέθοδος είχε το μειονέκτημα της μικρής ανάκτησης για κάποιες αναλυόμενες ουσίες, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσίασε εξαιρετική ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην επεξεργασία που υφίσταται η πρώτη ύλη, αλλά και στην δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης με

το υπόστρωμα, έχοντας σαν σκοπό την αντιστάθμιση των επιδράσεων που οφείλονται σε αυτό. Μερικά χρόνια αργότερα η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία στον ταυτόχρονο προσδιορισμό αφλατοξινών και ωχρατοξίνης A, μετά από μια πολύ μικρή τροποποίηση του διαλύτη εκχύλισης. Μετά από αυτή την αρχική φάση οι επιστήμονες στόχευσαν στην ανάλυση τοξινών που προέρχονταν από τον *Fusarium*. Ο Royer και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ταυτόχρονη ποσοτική ανάλυση ζεαραλενόνη, φουμοσίνη B1, δεοξυνιβαλενόλη σε καλαμπόκι. Το όριο ανίχνευσης ήταν πολύ κατώτερο από αυτό που πρότεινε η Ευρωπαϊκή Ένωση. Υπήρχε όμως το πρόβλημα της χαμηλής ανάκτησης της ζεαραλενόνης.

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι εξαρτώνται άμεσα από τον τρόπο καθαρισμού αλλά και από το μέσο εκχύλισης. Υπάρχουν όμως κάποιες κατηγορίες τοξινών που δεν είναι συμβατές με τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (πχ οι φουμοσίνες δεν προσδιορίζονται από τις μεθόδους των Tanaka και Ren. Συγκεκριμένα στις συγκεκριμένες εργασίες δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν ούτε αλκαλοειδή εργοτίνης ούτε κρυμμένες μυκοτοξίνες. Για να ξεπεράσουν αυτό το εμπόδιο, κάποιες από τις υπάρχουσες μεθόδους παρακάμπτουν το στάδιο του καθαρισμού και εισάγουν στο LC/MS ακατέργαστο εκχύλισμα. Αυτό προφανώς αυξάνει τις απαιτήσεις για την επιλεκτικότητα του ανιχνευτή καθώς επίσης και την ανάγκη για έρευνα των επιδράσεων του υποστρώματος, κυρίως όταν αναλύονται τρόφιμα. Ο Spanjer και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν 22 μυκοτοξίνες σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα μίγμα ακετονιτρίλιο/νερό και στη συνέχεια αραιώθηκαν με νερό λίγο πριν την εισαγωγή τους στο LC/MS. Επίσης πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένος έλεγχος για κάθε συνδυασμό αναλυόμενης ουσίας/υποστρώματος. Με αυτό τον τρόπο συγκεντρώθηκαν επαρκή στοιχεία που υπέδειξαν ότι η συγκεκριμένη ανάλυση είναι πράγματι εφικτή και ταυτόχρονα αρκετά ευαίσθητη για τον προσδιορισμό της ποσότητας των περισσότερων μυκοτοξινών που προβλέπεται από την νομοθεσία (Rundberget et al., 2002).



### 3.5.3. Ανοσοχημικές τεχνικές

Ταχείς μέθοδοι οι οποίες βασίζονται σε ανοσοχημικές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν στάδια καθαρισμού ή στάδια εμπλουτισμού της αναλυόμενης ουσίας. Η ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για το γρήγορο έλεγχο των περισσότερων μυκοτοξινών, ειδικά για τον έλεγχο των πρώτων υλών. Αν και οι δοκιμές ELISA εμφανίζουν υψηλή εξάρτηση από το υπόστρωμα, τα πλεονεκτήματα της είναι η μεγάλη ταχύτητα, η ευκολία της λειτουργίας της και η ευαισθησία. Οι δοκιμές ELISA είναι διαθέσιμες στο εμπόριο για τις περισσότερες από τις σημαντικότερες μυκοτοξίνες.

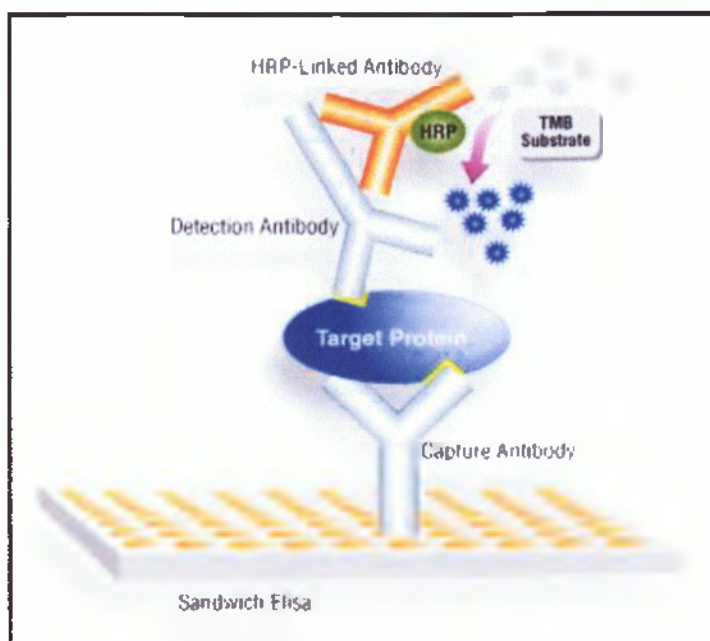
Εναλλακτικές της ELISA αποτελούν μέθοδοι που αποτελούνται από ένα αριθμό ανοσοαισθητήρων ή μέθοδοι που χρησιμοποιούν ανοσοχημικές πλατφόρμες.

#### 3.5.3.1 ELISA

Η ELISA (Enzyme-linkedimmunosorbentassay) είναι μία διαδομένη μορφή αναλυτικής βιοχημικής δοκιμής η οποία χρησιμοποιεί ένα υπό-είδος ετερογενούς και στερεάς φάσης ενζυματικής ανοσοανίχνευσης (EIA) με σκοπό την ανίχνευση μίας ουσίας, συνήθως ενός αντιγόνου, σε ένα υγρό δείγμα. Η υλοποίηση μίας τέτοιας δοκιμής προϋποθέτει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με εξειδίκευση σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Η διαδικασία ανίχνευσης και αξιολόγησης της παρουσίας ενός αντιγόνου στο εκάστοτε δείγμα είναι η εξής:

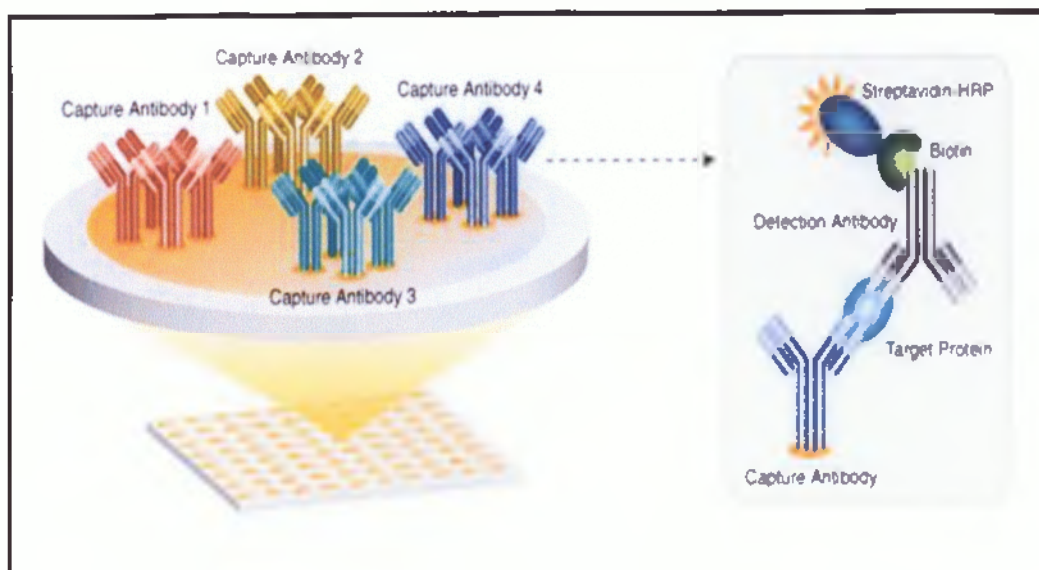
Σε πρώτο στάδιο, το δείγμα με έναν άγνωστο αριθμό αντιγόνων ακινητοποιείται πάνω σε μία στερεή βάση/πλάκα. Έπειτα προστίθεται το κατάλληλο αντίσωμα ανίχνευσης για το είδος των αντιγόνων του δείγματος σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένο με ένα ένζυμο ή μπορεί να ανιχνευθεί με τη σειρά του από ένα δευτερεύον αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα ένζυμο με βιο-σύζευξη. Ανάμεσα σε κάθε στάδιο, η πλάκα πλένεται με ένα ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού ώστε να απομακρυνθούν τυχούσες πρωτεΐνες ή αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, προστίθεται στην πλάκα ένα

ενζυματικό υπόστρωμα για να παράγει ένα ορατό σήμα, το οποίο υποδεικνύει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Το σήμα αυτό είναι συνήθως η αλλαγή χρώματος του υποστρώματος.



*Εικόνα 3.3: Αναπαράσταση της μεθόδου ELISA*

Στην κλασική εκδοχή της, μια μέτρηση με την τεχνική ELISA αναγνωρίζει και ποσοτικοποιεί μόνο έναν αναλύτη ανά δείγμα. Για τις ανάγκες μιας «συστημικής» προσέγγισης, όμως, κάτι τέτοιο δεν είναι αρκετό, καθώς θα έπρεπε για κάθε μετρούμενο σε κάθε διαφορετικό υπό μελέτη ερέθισμα (stimulus), να πραγματοποιείται μια ξεχωριστή μέτρηση. Μια τέτοια διαδικασία θα ήταν εξαιρετικά χρονοβόρα και απαιτητική γι' αυτό και χρειάστηκε να αναπτυχθούν ειδικές τεχνολογίες για την εκτέλεση πολυπλεκτικών (multiplexed) μετρήσεων. Πολυπλεκτική (multiplexed) ονομάζεται μια μέτρηση κατά την οποία μετρούνται στο ίδιο δείγμα και ταυτόχρονα πολλοί αναλύτες (τυπικά πάνω από έναν) (<https://biotech-ntua.wikispaces.com/+ELISA+assay>).



*Εικόνα 3.4: Αρχή λειτουργίας Multiplexed ELISA*

### 3.5.4. Άλλες τεχνικές

Οπτικές μέθοδοι, όπως η φασματοσκοπία FT-Raman αποτελεί μία αρκετά αποτελεσματική τεχνική όσον αφορά την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων κρυσταλλικών μορφών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι απαιτεί πολύ μικρή προετοιμασία δείγματος, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα εμφάνισης μετασχηματισμών στερεής κατάστασης των μετασταθών κρυσταλλικών μορφών, καθώς το σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος έχουν πολύ μικρή επίδραση. Οι συγκεκριμένες τεχνικές παρουσιάζονται να είναι πολύ υποσχόμενες για την γρήγορη και μη καταστροφική ανάλυση μυκοτοξινών σε σιτηρά. Οι συγκεκριμένες προσεγγίσεις επιτρέπουν την ελαχιστοποίηση του δείγματος εισαγωγής. Εντούτοις μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η έλλειψη υλικών αναφοράς αλλά και η μεγάλη επίδραση του υποστρώματος.

Η φασματοσκοπία Raman ασχολείται με το φαινόμενο της μεταβολής της συχνότητας, όταν το φως σκεδάζεται από μόρια. Το μέγεθος της μεταβολής αυτής αναφέρεται ως συχνότητα Raman και το σύνολο των χαρακτηριστικών συχνοτήτων ενός σκεδάζοντος είδους αποτελούν το φάσμα Raman του είδους αυτού.

Η φασματοσκοπία Raman είναι κυρίως φασματοσκοπία εκπομπής και το φασματόμετρο που χρησιμοποιείται είναι σχεδόν παρόμοιο με αυτό της ορατής περιοχής του φωτός. Η βασική διαφορά βρίσκεται στην πηγή της ακτινοβολίας. Σε παλαιότερες εποχές χρησιμοποιούνταν λάμπες υδραργύρου, αλλά σήμερα οι φθηνές πηγές ακτινών λέιζερ προκάλεσαν ριζικές αλλαγές στη μέθοδο Raman. Οι πηγές ακτινών λέιζερ δίνουν μια στενή, υψηλής ακρίβειας μονοχρωματική ακτίνα φωτός, που μπορεί να συγκεντρωθεί σε ένα μικρό δείγμα (1ml) και που περιέχει σχετικά μεγάλη ενέργεια, μέσα σε πολύ μικρή περιοχή συχνοτήτων.

Παλαιότερα απαιτούνταν 10-20ml δείγματος και η μέθοδος καταγραφής του φάσματος διαρκούσε αρκετό χρόνο. Η λάμπα υδραργύρου χρησιμοποιείται μόνο για αέρια δείγματα ουσιών. Το δείγμα της ουσίας διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη και τοποθετείται σε λεπτούς δειγματοληπτικούς σωλήνες που είναι σφραγισμένοι στο ένα άκρο. Η ακτινοβολία των ακτινών λέιζερ προσπίπτει κατά μήκος του σωλήνα. Στερεές ουσίες υπό μορφή σκόνης ή σε διαφανή πλακίδια είναι επίσης κατάλληλες για μελέτη με ακτίνες λέιζερ.

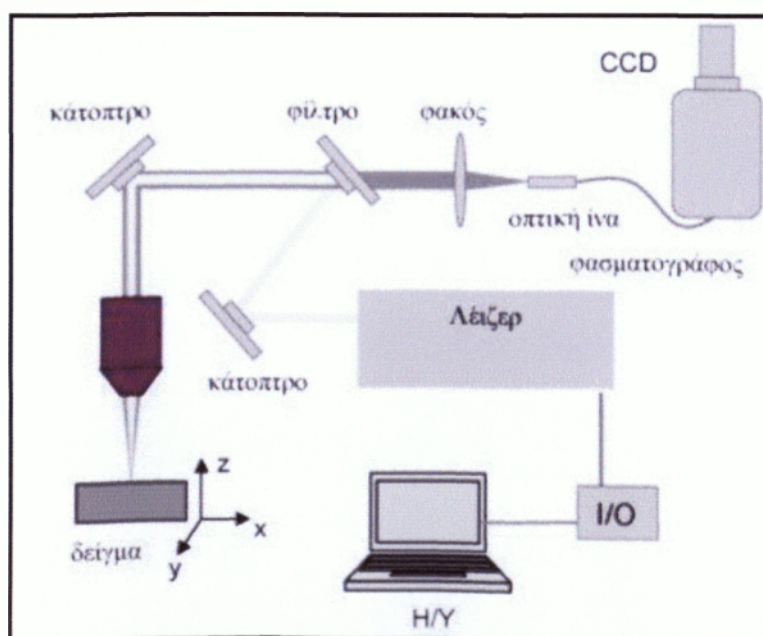
Επίσης υπάρχουν και άλλα πλεονεκτήματα των ακτινών λέιζερ, όπως ότι λειτουργούν σε χαμηλότερες συχνότητες και δεν προκαλούν φθορισμό του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό η διάχυση Rayleigh περιορίζεται σημαντικά και μπορεί κανείς να μελετήσει το φάσμα Raman μέχρι και την περιοχή των  $20\text{cm}^{-1}$  (περιοχή που είναι δύσκολο να μελετηθεί με τη φασματοσκοπία IR). Η ακτινοβολία που διαχέεται από το δείγμα κατευθύνεται με καθρέπτες σε ένα φασματόμετρο που λειτουργεί στην περιοχή του ορατού. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από ένα πρίσμα χαλαζία ή φράγμα περίθλασης, όπως στο φασματόμετρο IR. Η ακτινοβολία, στην περίπτωση των λέιζερ ανιχνεύεται με ένα φωτοηλεκτρικό ανιχνευτή, του οποίου τα σήματα μετά από ενίσχυση καταγράφονται σε οθόνη H/Y όπου μπορούν να επεξεργασθούν, να ερμηνευθούν με σύγκριση (τράπεζα φασμάτων) και μετά να εκτυπωθούν.

Με το φάσμα Raman λαμβάνονται σχεδόν οι ίδιες πληροφορίες για τη δομή των χημικών μορίων όπως και στις φασματοσκοπικές μεθόδους IR και μικροκυμάτων, με μόνο μειονέκτημα τη φτωχή διακριτική ικανότητα των φασματικών γραμμών. Τα φασματόμετρα Raman έχουν πολλές πρακτικές εφαρμογές σε τεχνολογικά εργαστήρια (πολυμερή, αρχαιολογία κ.λπ).



*Εικόνα 3.5: Φασματόμετρο Raman*

Οι τεχνικές φασματοσκοπίας Raman έχουν σημαντικές εφαρμογές σε πολλούς κλάδους της επιστήμης. Βιοχημικές μεταβολές μπορούν να μελετηθούν με την μικροσκοπική εικονοποίηση φασμάτων. Με τη φασματοσκοπία Raman εξετάζονται οι αλληλεπιδράσεις των δονήσεων δεσμών με το φως (λείζερ) και παρέχονται χρήσιμες πληροφορίες για το ενδο-περιβάλλον σύνθετων συστημάτων. Οι πληροφορίες αυτές εικονοποιούνται και καθίσταται πιο εύκολη η μελέτη τους (Καρούντζος Γ., 2003). Μια τυπική πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις με την τεχνική Raman φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



*Εικόνα 3.6: Πειραματική διάταξη Raman*



Η διάταξη αποτελείται από τα εξής βασικά στοιχεία:

- (i) Λέιζερ, το οποίο ως επί το πλείστον είναι συνεχούς λειτουργίας.
- (ii) Οπτικά στοιχεία για την καθοδήγηση (κάτοπτρα) και εστίαση της δέσμης (φακούς εστίασης).

Συνήθως για την εστίαση στο προς ανάλυση δείγμα χρησιμοποιείται αντικειμενικός φακός μέσω του οποίου πραγματοποιείται και η συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Επίσης είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλου φίλτρου (edge filter) πριν την είσοδο της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman στο φασματογράφο, το οποίο υποβάλλει την ακτινοβολία σκέδασης Rayleigh στο μήκος κύματος του λέιζερ και επιτρέπει τη διέλευση και ανίχνευση μόνο της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman (Stokes), η οποία αντιστοιχεί σε μήκος κύματος  $\lambda > \lambda_{\text{LASER}}$ .

Αυτό το φίλτρο είναι απαραίτητο γιατί οι κορυφές Raman είναι δυνατόν να εμφανίζονται κοντά στη γραμμή του λέιζερ και να μην είναι δυνατόν να γίνουν διακριτές αν η γραμμή τις επικαλύπτει λόγω της έντασης της, δεδομένου ότι η σκέδαση Rayleigh είναι πολύ εντονότερη της σκέδασης Raman.

- (iii) Οπτική ίνα για την συλλογή και μεταφορά της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στην είσοδο του φασματογράφου.
- (iv) Απεικονιστικό φασματογράφο.
- (v) Ανιχνευτή CCD για την καταγραφή του σήματος εκπομπής.
- (vi) Ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό για τον έλεγχο του πειράματος και την απεικόνιση των φασμάτων.

Μια διαφορετική προσέγγιση επιχείρησε ο Logrieco και οι συνεργάτες του. Πτητικές οργανικές ενώσεις, μικρού μοριακού βάρους, που ελευθερώθηκαν σαν προϊόντα του δευτερεύοντος μεταβολισμού των μυκήτων προσροφούνται σε μια σειρά από ειδικούς χημικούς αισθητήρες και μετρώνται με αισθητήρες οξειδίων μετάλλου (Pettersson et al., 2003).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### «ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»

Τα είδη των μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες είναι εξαιρετικά κοινά και μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και κάτω από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Όσον αφορά τα γεωργικά προϊόντα, η σοβαρότητα της μόλυνσης τείνει να ποικίλει από χρονιά σε χρονιά, με βάση τις καιρικές συνθήκες και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η αφλατοξίνη, για παράδειγμα, είναι συνήθως χειρότερη κατά τα έτη ξηρασίας όπου τα φυτά είναι πιο επιρρεπή σε ζημιές από έντομα και άλλες προσβολές. Τα γεωργικά προϊόντα μολύνονται με μυκοτοξίνες σε όλο τον κόσμο, μάλιστα εκτιμάται πως το 1/4 της παγκόσμιας παραγωγής κάθε χρόνο είναι μολυσμένο σε κάποιο βαθμό από μυκοτοξίνες.

#### 4.1 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή και σε σημεία αργότερα. Το πρόβλημα της μόλυνσης των τροφίμων με μυκοτοξίνες επιδεινώνεται όταν οι συνθήκες του χειρισμού, της αποθήκευσης και γενικότερα των μεθόδων επεξεργασίας των τροφίμων ευνοούν την ανάπτυξη τοξικογενών μυκήτων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι οι μυκοτοξίνες βρίσκονται πολύ εύκολα στα τρόφιμα. Ο Kuiper-Goodman, κορυφαία φιγούρα στον τομέα αξιολόγησης επικίνδυνων ουσιών, κατατάσσει τις μυκοτοξίνες ως τον σημαντικότερο χρονίο παράγοντα κινδύνου και μάλιστα υψηλότερα από τις συνθετικές

προσμείξεις, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα τροφίμων και τα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων.

Οι οικονομικές συνέπειες από τη μόλυνση μυκοτοξινών είναι μεγάλες. Καλλιέργειες με μεγάλες ποσότητες μυκοτοξινών συχνά πρέπει να καταστρέφονται. Εναλλακτικά, μολυσμένες καλλιέργειες μετατρέπονται σε ζωοτροφές και δίνονται στα ζώα. Όμως το να δίνεις μολυσμένες τροφές σε ευπαθή ζώα μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, ασθένειας και θανάτου. Επιπλέον, καταναλώνοντας τα ζώα μολυσμένες τροφές μπορεί να παράγουν κρέας και γάλα που να περιέχει τοξικά κατάλοιπα. Για παράδειγμα, οι αφλατοξίνες στις ζωοτροφές μεταβολίζονται από τις αγελάδες σε αφλατοξίνη M1, η οποία στη συνέχεια εκκρίνεται στο γάλα. Επίσης, η ωχρατοξίνη A συσσωρεύεται στους ιστούς των χοίρων μέσω της τροφής. Η ικανότητα διάγνωσης και επαλήθευσης των μυκοτοξινών είναι μια πολύ σημαντική πτυχή στο πρόβλημα των μυκοτοξινών στα τρόφιμα (Bennett and Klich, 2003).

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) στο 25% των δημητριακών καρπών που παράγονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, καταγράφεται μόλυνση από μυκοτοξίνες (CAST 1989). Οι δημητριακοί καρποί αποτελούν σημαντικό μέρος τόσο του ανθρώπινου διατροφολογίου, όσο και εκείνου των αγροτικών ζώων και χρησιμοποιούνται συστηματικά από τη βιομηχανία ζωοτροφών. Ο άνθρωπος μολύνεται άμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων φυτικής προέλευσης ή έμμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων ζωικής προέλευσης. Η παγκόσμια εξάπλωση του προβλήματος των μυκοτοξικών, η επικινδυνότητα για τη υγεία του ανθρώπου και των ζώων και οι οικονομικές απώλειες της κτηνοτροφικής παραγωγής καθιστούν την έρευνα για τις μυκοτοξίνες επίκαιρη και αναγκαία.

Οι αυξημένες πιθανότητες μόλυνσης του ανθρώπου από μυκοτοξίνες μέσω της τροφής του, και οι ακόλουθοι κίνδυνοι για την υγεία του, έχουν κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα στη μελέτη των μυκοτοξινών. Ιδιαίτερα επιβαρυντική για τον άνθρωπο είναι η αφλατοξίκωση (κυρίως η χρόνια έκθεση σε αφλατοξίνες), η οποία συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του ήπατος και νεφροπάθειες. Ως τοξίνες με πιθανή καρκινογόνο δράση έχουν θεωρηθεί η ωχρατοξίνη A (νεοπλασίες του

ουροποιητικού συστήματος), οι φουμονισίνες (καρκίνος του οισοφάγου) και η ZON (νεοπλασίες του ενδομητρίου) (Frank et al., 1991; Kuiper-Goodman et al., 1987).

Από τα ζώα, ο χοίρος συγκαταλέγεται μεταξύ των πλέον ευπαθών ζώων στη μόλυνση από μυκοτοξίνες. Παχυνόμενοι χοίροι που κατανάλωσαν στην διατροφή τους αφλατοξίνες (κυρίως B1 και ίχνη G1, G2 και B2) σε συγκεντρώσεις από 0,02 έως 1,48 mg/kg τροφής παρουσίασαν μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους και βλάβες στα ηπατικά κύτταρα. Ο Huff και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους των παχυνόμενων χοίρων των οποίων το σιτηρέσιο ήταν μολυσμένο με αφλατοξίνη ή/και Ωχρατοξίνη A (2 mg/kg τροφής). Μάλιστα η μείωση του ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους ήταν μεγαλύτερη όταν συνυπήρχαν και οι δύο τοξίνες, γεγονός που επιβεβαιώνει την συνεργιστική δράση τους.

Τα τελευταία χρόνια έχει επέλθει μια δραματική αύξηση της επίπτωσης του *Aspergillus* στον άνθρωπο, ως αποτέλεσμα της όλο και πιο δραστηκής ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Ο *A. fumigatus* έχει αναδειχθεί στον πλέον σημαντικό αερομεταδιδόμενο παθογόνο μύκητα στις αναπτυγμένες χώρες. Η λοίμωξη του αναπνευστικού από *Aspergillus* εμπλέκεται με αλλεργικές αντιδράσεις, όπως στο άσθμα και την πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας, αλλά και με αποικισμό του βρογχικού δένδρου, με επακόλουθη αλλεργική βρογχοπνευμονική ή διηθητική ασπεργίλλωση. Παρά τις νεότερες εξελίξεις στη μελέτη του μύκητα αυτού, υπάρχουν πολλές άγνωστες πτυχές στη συμπεριφορά του και στην παθογένεια των νόσων που προκαλεί. Εξαιτίας της έλλειψης αυτής της γνώσης, η αντιμετώπιση των σχετιζόμενων με το μύκητα παθήσεων γίνεται συνήθως εμπειρικά και με δυσκολία. Για την καλύτερη κατανόηση των παθήσεων αυτών θα πρέπει να ανασυνταχθούν οι στρατηγικές της διάγνωσης, της επιδημιολογίας, της θεραπείας και της παθογένειάς τους (Δημητρόπουλος, Φιλίππου 2008).

## 4.2 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

### 4.2.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις μυκοτοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006). Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των διαφόρων μυκήτων και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι μυκοτοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Συνιστάται επομένως να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο εφικτό επίπεδο. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε κάποιες συγκεκριμένες τοξίνες (αφλατοξίνη Β1).

Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη Μ1 θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη Β1, είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητά της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και ιδίως από μικρά παιδιά. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006).

Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές.

Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες, συνεπώς δεν μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη. Συνεπώς, η Ε.Ε. έχει θεσπίσει



νομοθετικά όρια στα υλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές. Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των μυκοτοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών (Maroto et al., 2005):

- ❖ Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια (International Programm on Chemical Safety–IPCS, [www.who.int/pcs/](http://www.who.int/pcs/))
- ❖ Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer–IARC, [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr))
- ❖ Κοινή FAO/WHO Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives and Contaminants–JECFA, [www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm](http://www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm).)

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα. Επιπρόσθετα αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις. Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σε μυκοτοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων. Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν μυκοτοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από μυκοτοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνσή τους.

#### 4.2.2 Παγκόσμια Νομοθεσία

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ορίων, όπως και στην Ε.Ε. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως. Στις ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, όπου η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί σε συνδυασμό με την βελτίωση της ποιότητας ζωής παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια όσον αφορά τον έλεγχο των αφλατοξινών. Αντίθετα στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναπτυσσόμενων χωρών, κύριο μέλημα αποτελεί η καταπολέμηση της φτώχειας και των ασθενειών με αποτέλεσμα να μην έχουν καθιερωθεί, ευρέως, κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες γενικότερα ή να μην είναι το ίδιο αυστηροί.

Εντούτοις, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφορετικά όρια ανάμεσα στα διάφορα κράτη. Για παράδειγμα, αναφέρεται ότι στις Η.Π.Α. το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20ppb για τρόφιμα και ζωοτροφές, ενώ στα κράτη της Ε.Ε. στα 4ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό σημαίνει ότι στην ΕΕ τα όρια είναι 5 φορές χαμηλότερα απ' ό τι στις Η.Π.Α. Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια, που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών (Yu et al., 2008).

## 4.4 ΕΠΙΤΡΕΠΟΜΕΝΑ ΟΡΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

*Πίνακας 4.1: Επιτρεπόμενα όρια μυκοτοξινών στην Ευρώπη και την Αμερική*

<b>Mycotoxins</b>	<b>ΕΥ</b>	<b>USA</b>
Aflatoxins B1,B2, G1, G2	2 ppb B1 4 ppb B1,B2, G1, G2 20 ppb ζωοτροφές	20 ppb για τροφές 100-300 ppb ζωοτροφές
Aflatoxin M1	0,5 ppb για γάλα	0,5 ppb για γάλα
Ochratoxin A (OTA)	10 µg/kg σταφίδες, σταφύλια 2 µg/l κρασί και χυμούς σταφ. 5 µg/kg σπόρους δημητριακών 3 µg/kg προϊόντα σιτηρών 0,5 µg/kg παιδικές τροφές	No regulation in the USA
Fumonisin	4 mg/kg FB1 στα σιτηρά 1 mg/kg τρόφιμα με σιτηρά 0,2 mg/kg για παιδικές τροφές με βάση σιτηρά 5-100 ppm ζωοτροφές	2-4 ppm για τροφές 5-100 ppm για ζωοτροφές
Zearalenone (ZEA)	100 µg/kg για σιτηρά εκτός καλαμπόκι 350 µg/kg για καλαμπόκι 75 µg/kg για άλευρα εκτός καλαμπόκι 20 µg/kg για βρεφικές τροφές	No regulation in the USA 1 ppm (προτείνεται)
Deoxynivalenon (DON/F2)	400-500 ppb for human and animal	1ppm για δημητριακά 5-10 ppm για δημητριακά για ζωοτροφές
Patulin	50 ppb χυμό μήλων 25 ppb νωπά φρούτα 10 ppb παιδικές τροφές	No regulation in the USA
Other mycotoxins		No regulation in the USA

*Πηγή: Μάρκογλου,*

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω μπορούμε να πούμε πως οι μυκοτοξίνες αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα για την ασφάλεια των τροφίμων και κατ' επέκταση την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Ωστόσο είδαμε πως η παρουσία ή απουσία μυκοτοξινών εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες περιβάλλοντος κατά την αποθήκευση, συντήρηση και επεξεργασία των τροφίμων.

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενής μεταβολίτες μυκήτων του γένους *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium*. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 300 μυκοτοξίνες με τις πιο σημαντικές να είναι οι αφλατοξίνες, η ωχρατοξίνη Α, η πατουλίνη, οι φουμονισίνες και τα τριχοθηκένια. Οι περισσότερες είναι νεφροτοξίνες με τερατογόνο και καρκινογόνο δράση. Έρευνες έχουν δείξει πως κάποια προϊόντα μπορεί να περιέχουν περισσότερες από μια μυκοτοξίνες οι οποίες δρουν συνεργιστικά στη μόλυνση. Χαρακτηριστικό των μυκοτοξινών είναι πως είναι σχετικά σταθερές σαν μόρια με αποτέλεσμα να βρίσκονται ακόμη και σε επεξεργασμένα προϊόντα και να είναι δύσκολη η μείωσή τους μέσω ειδικών μεθόδων.

Η πρόσληψη των μυκοτοξινών από τον άνθρωπο και τα ζώα γίνεται μέσω της τροφής καθώς μπορεί να βρεθούν στα τρόφιμα μυκοτοξίνες σε υψηλά σύμφωνα με τα επιτρεπόμενα όρια. Επειδή η μόλυνση των τροφίμων από μυκοτοξίνες είναι αναπόφευκτη καθώς οι μύκητες που τις παράγουν μολύνουν εύκολα τα τρόφιμα, έχουν θεσπιστεί κάποια επιτρεπόμενα όρια μυκοτοξινών στα τρόφιμα, όρια, τα οποία είναι ασφαλή για τον άνθρωπο.

Το πρόβλημα όμως δεν έχει επιπτώσεις μόνο στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων αλλά έχει και οικονομικές επιπτώσεις. Σύμφωνα με συνεχείς ελέγχους που γίνονται στις καλλιέργειες μετά την συγκομιδή περίπου το ένα τέταρτο των καλλιεργειών παγκοσμίως έχει μολυνθεί από μυκοτοξίνες σε υψηλά επίπεδα με αποτέλεσμα την καταστροφή τους και κατ' επέκταση την οικονομική καταστροφή των παραγωγών.

Λόγω των προβλημάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην έρευνα για την καλύτερη κατανόηση των μυκοτοξινών, στις μεθόδους ανίχνευσης στα τρόφιμα και της περαιτέρω αποτοξίκωσης αυτών. Οι μέθοδοι ανίχνευσης των μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι πολλές και έχουν εξελιχθεί με την πάροδο των χρόνων και την συνεχή έρευνα. Σήμερα η πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με την μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent).

Βέβαια, το ζητούμενο είναι να μειωθούν τα κρούσματα μόλυνσης των καλλιεργειών και των τροφίμων από μυκοτοξίνες, για το λόγο αυτό μεγάλη σημασία παίζει η πρόληψη. Οι συνθήκες περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας στο χωράφι, οι συνθήκες κατά την συγκομιδή, αποθήκευση και συντήρηση των προϊόντων αλλά και οι συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία αυτών αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες προσβολής από του μυκοτοξικογόνους μύκητες και την παραγωγή μυκοτοξινών. Αν γίνει προσπάθεια ελέγχου των παραγόντων που αναφέρθηκαν παραπάνω τότε είναι σίγουρο πως θα μειωθούν και τα επίπεδα μυκοτοξινών στα τρόφιμα, τα οποία θα είναι πλέον ασφαλή για κατανάλωση.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Abou-Zeid A. M. (2012):** Review on Citrinin: Synthetic Methods, Molecular Biosynthesis and Effect of Plant Extracts. *British Microbiology Research Journal* 2(2): 108-122, Tanta- Egypt.
2. **Adams R. Martin and Moss O. Maurice (2008):** Food Microbiology. 3rd Edition RCS Publishing.
3. **Aghamohammadi M., J.hashemi, G.Asadi Kram, N.Alizadeh (2007):** «Enhanced synchronous spectrofluorimetric determination of aflatoxin B 1 in pistachio samples using multivariate analysis», *Analytica Chimica Acta* 582, p.288-294
4. **AOAC Official Method (1988):** «Standards for Aflatoxins-Thin LayerChromatographic Methods», M 1 -First Action 1981 Final Action 1988, 49.2.03, 971.22
5. **Astoreca, A., C. Magnoli, C. Barberis, M. Combina, S.M. Chiacchiera and A. Dalcero (2007):** Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus section nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. *Sci. Total Environ.*, 388: 16-23.
6. **Baker, S. E. & Bennett, J. (2008).** An overview of the genus *Aspergillus*. In *The Aspergilli*: pp. 3–14, Edited by S. A. Osmani & G. H. Goldman, Mycology, 26, CRC Press.
7. **Bennett J. W. and Klich M. (2003):** Mycotoxins. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, July 2003, Vol. 16, No. 3, p. 497–516
8. **Blaney BJ (1985):** Mycotoxins in crops grown in different climatic regions of Queensland, Trichothecenes and Other Mycotoxins. Edited by J Lacey, pg. 97-108.
9. **Burgess L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P., Backhouse D. (1994):** Laboratory Manual for *Fusarium* Research. University of Sydney. Sydney.
10. **Cabañes Javier Francisco, Bragulat Maria Rosa and Castellá Gemma (2010):** Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*. *Toxins* 2010, 2, 1111-1120; doi:10.3390/toxins2051111
11. **Creppy E.E., P.Chiarappa, I.Baudrimont, P.Boracci, S.Moukha, M.R. Carratu (2004):** Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: Are in

- vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. *Toxicology* 201, pp. 115- 123
12. **Gaffoor,I., Brown,D.W., Plattner,R., Proctor,R.H., Qi,W.H., and Trail,F. (2005):** Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryotic Cell* 4: 1926-1933.
  13. **Gilbert J., E.Anklam (2002):** Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs, *Trends in analytical chemistry*, 21, p.468-486,
  14. **Hajjaj H, Klaebe A, Loret MO, Goma G, Blanc PJ, et al. (1999):** Biosynthetic Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance. *Appl Environ Microbiol* 65: 311–314.
  15. **Jaimeza J., C.A. Fentea ,\*, B.I. Vazqueza, C.M. Francoa, A. Cepedaa, G. Mahuzierb, b P. Prognon (2000):** Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 882, pg. 1–10.
  16. **Khoury André and Atoui Ali (2010):** Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* 2010, No. 2, pg. 461-493, doi:10.3390/toxins2040461, Lebanon.
  17. **Kim,Y.T., Lee,Y.R., Jin,J.M., Han,K.H., Kim,H., Kim,J.C. et al. (2005b):** Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* 58: 1102-1113
  18. **Kuiper-Goodman T., P.M.Scott, H.Watanabe (1987):** Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7: 253-306,
  19. **Leslie J.F., Summerell B.A. (2006):** *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Ltd, Iowa.
  20. **Maroto A., R.Boque, J.Riu, It.Ruisanchez, M.Odena (2005):** Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests, *Anal. Bioanal Chem* 382, p.1562-1566
  21. **Moretti N. Antonio (2009):** TAXONOMY OF FUSARIUM GENUS, A CONTINUOUS FIGHT BETWEEN LUMPERS AND SPLITTERS. Institute of Sciences of Food Production, ISPA-CNR, Bari, Italy. No. 117, pg. 7—13.
  22. **Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W.F.O. (1983):** *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State Univ., Press, University Park.

23. **Pearson S.M., A.A.G.Candlish, K.E.Aidoo & J.E.Smith (1999):** Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection, *Biotechnology Techniques* 13: 97-99,
24. **Proctor,R.H., Brown,D.W., Plattner,R.D., and Desjardins,A.E. (2003):** Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 237-249.
25. **Puel Olivier, Galtier Pierre and Oswald P. Isabelle (2010):** Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 2010, 2, 613-631; doi:10.3390/toxins2040613.
26. **Raper B. Kenneth and Dorothy I. Fennell (1965):** *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
27. **Rundberget T., A.L.Wilkins (2002):** Determination of Penicillium mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 964, pp. 189-197
28. **Scudamore K.A.:** «Principles and applications of mycotoxin analysis» *Mycotoxins*, Taplow, Maidenhead, Berkshire UK, Chapter 7 p.157-178
29. **Sekar P., Yumnam N. and Ponmurugan K. (2008):** Screening and Characterization of Mycotoxin Producing Fungi from Dried Fruits and Grains. *Advanced Biotech*, pg. 12-15, Research Article, Tamil Nadu, India.
30. **Suárez-Quiroz M., O. Gonzalez-Ríos, M. Barel, B. Guyot, S. Schorr-Galindo, and J.P. Guiraud (2004):** Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee, *Food Microbiology*, Vol. 21, pp 629-634.
31. **Summerell B.A., Salleh B., Leslie J.F. (2003):** A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87: 117–128.
32. **Tsitsigiannis I. Dimitrios., Dimakopoulou Myrto, Antoniou P. Polymnia and Tjamos C. Eleftherios (2012):** Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*, Vol. 51, No. 1, pg. 158–174
33. **Xu, B.-J., Jia, X.-Q., Gu, L.-J., Sung, C.K. (2006):** Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17, 271-285.
34. **Yu J., G.A.Payne, B.C.Campbell, B.Guo, T.E.Cleveland, J.F.Robens, N.P.Keller, J.W.Bennett, W.C.Nierman (2008):** *Mycotoxin Production and*

- Prevention of Aflatoxin Contamination in Food and Feed, Ch.27, p.457-472, Gustavo H.Goldman & Stephen A.Osmani «The Aspergilli», Mycology, 26, CRC Press,
35. **Βακαλουνάκης Δ.Ι., 2006.** Ασθένειες των κολοκυνθοειδών. Διάγνωση και αντιμετώπιση. Βακαλουνάκης, Ηράκλειο, Κρήτης. 480 σελ.
  36. **Ηλιόπουλος Α. 2004** Γενική φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
  37. **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006** της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου 2006 «για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα».
  38. **Μάρκογλου, Δημητρόπουλος Χ., Φιλίππου Ν. 2008.** Τα πολλά πρόσωπα του *Aspergillus fumigatus* και οι επιπτώσεις του στον άνθρωπο. Αρχές Ελληνικής Ιατρικής, 25(3):295-307.
  39. **Παναγόπουλος, Γ. Χ., 1995.** «Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών». Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα
  40. **Παπαδοπούλου Μ. 200** . Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Φυτοπαθολογίας. ΤΕΙ Καλαμάτας.
  41. **Τζάμος Ελευθέριος. 2007.** Φυτοπαθολογία. Β έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης Α. Ε. Αθήνα.
  42. **Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.** Μυκοτοξίνες: Ένας σημαντικός παράγοντας στην παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών τροφίμων. 2008. Περιλήψεις 14<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Φυτοπαθολογικού Συνέδριου. 7-10 Οκτωβρίου 2008. *Pantazis Royal* – Δαλαμανάρα Αργολίδας. σ. 12- 13
  43. **Χριστίας Χ. 1999.** Μυκητολογία. Εκδόσεις ΑγροΤύπος Α. Ε. Αθήνα.

❖ *Διαδικτυακοί τόποι*

1. <http://www.insectimages.org>
2. <http://faculty.ccbcmd.edu/>
3. [http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson\\_r/A\\_flavus3.html](http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/A_flavus3.html)
4. <http://www.lgl.ch/>
5. <http://www.mycology.adelaide.edu.au>

6. <http://www.gov.mb.ca/agriculture>
7. <http://www.plantmanagementnetwork.org>
8. [http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_aflatoxins.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxins.htm)
9. [www.mycotoxins.org](http://www.mycotoxins.org)
10. <http://en.wikipedia.org>
11. <http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm>
12. European Mycotoxin Awareness Network, 2007
13. [www.who.int/pcs/](http://www.who.int/pcs/)
14. [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)
15. [www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm](http://www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm)