

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
(ΤΕΙ) ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα: Συμβολή στην επιδημιολογία του μύκητα  
*Aspergillus* spp. στους συκεώνες του Νομού Μεσσηνίας**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΣΑΧΑΝΣΑΧΗΣ**



**Καλαμάτα 2017**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ**

**(ΤΕΙ) ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΜΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα: Συμβολή στην επιδημιολογία του μύκητα  
*Aspergillus* spp. στους συκεώνες του Νομού Μεσσηνίας**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΣΑΧΑΝΣΑΧΗΣ**

**Εξεταστική επιτροπή**

**Αναπληρωτής καθηγητής Βασίλειος Δημόπουλος**

**Αναπληρωτής καθηγητής Αναστάσιος Κώτσιρας**

**Επίκουρος καθηγητής Κωνσταντίνος Δελής**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σκοπός τις εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επιδημιολογίας του μύκητα *Aspergillus* spp. στους συκεώνες του Νομού Μεσσηνίας αλλά και της Λακωνίας, και εκπονήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος Αρχιμήδης III του ΤΕΙ Πελοποννήσου, με θέμα «Στρατηγική της αντιμετώπισης του προβλήματος των αφλατοξινών στα ξηρά σύκα στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης διαχείρισης της καλλιέργειας της συκιάς» και χρηματοδότηση από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Εκπαίδευση και δια Βίου Μάθηση» 2007 – 2013.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ Δημήτρη Αντωνόπουλο για την άριστη συνεργασία και τις γνώσεις που πήρα από αυτόν, την Δρ Ελένη Μανωλοπούλου και την κύρια Έλσα Τσιαβτάρη για την άψογη συνεργασία μας. Ευχαριστώ επίσης την κα Σοφία Αγριοπούλου για τη μέτρηση των αφλατοξινών με τη μέθοδο LC-MS.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες των ευχαριστιών μου, στον αγαπητό μας καθηγητή, Δρ Βασίλειο Δημόπουλο για την άριστη συνεργασία και τις πολύτιμες γνώσεις που αποκομίσαμε εργαζόμενοι στο πλάι του.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	4
1.1. Η καλλιέργεια της συκιάς.....	5
1.2. Αφλατοξίνες .....	11
1.3. Ο μύκητας <i>Aspergillus spp.</i> ....	14
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	21
3.1. Χωροταξική κατανομή του πληθυσμού <i>Aspergillus spp.</i> .....	21
3.2. Αφλατοξικογόνο ικανότητα του ενδημικού πληθυσμού του <i>Aspergillus spp.</i> .....	25
3.3. Προσαρμοστικότητα του ενδημικού πληθυσμού του <i>Aspergillus spp.</i> .....	32
3.4. Επιδημιολογία του ενδημικού πληθυσμού του <i>Aspergillus spp.</i> .....	41
Συμπεράσματα .....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συκιά καλλιεργείται στις ανατολικές μεσογειακές περιοχές της Ευρώπης και Αφρικής, καθώς και στις νοτιοδυτικές περιοχές της Ασίας από τους πανάρχαιους ακόμα χρόνους. Σήμερα η συκιά είναι μια σημαντική δενδρώδης καλλιέργεια σε πολλά μέρη της υφελίου και κυρίως σε χώρες που συνορεύουν με τη Μεσόγειο, την Ερυθρά και την Αραβική θάλασσα.

Η συκιά ευδοκμεί γενικά σε υποτροπικές και τροπικές περιοχές, ακόμα και σε ήπιες κλιματικά περιοχές της εύκρατης ζώνης. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής σύκων είναι οι Ισπανία, Ιταλία, Τουρκία, Ελλάδα, Πορτογαλία και ΗΠΑ. Η παγκόσμια παραγωγή ξηρών και νωπών σύκων ανέρχεται σε 1.200.000 και 200.000 ton αντίστοιχα.

Στην Ελλάδα η συκιά καλλιεργείται συστηματικά, κυρίως στην Πελοπόννησο, Στερεά Ελλάδα και Εύβοια, στα νησιά του Αιγαίου, στα Επτάνησα και στην Κρήτη. Διάσπαρτα δέντρα, απαντώνται σε όλα τα διαμερίσματα της χώρας. Για την παραγωγή ξηρών σύκων, η συκιά καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία, τη Λακωνία, την Εύβοια και νησιά του Αιγαίου.

Οι αφλατοξίνες παράγονται από το μύκητα *Aspergillus* spp. που προσβάλλει τα σύκα σε όλα τα στάδια, πάνω στο δένδρο, στο έδαφος και κατά τη διάρκεια ξήρανσης στα αλώνια. Η μείωση της υγρασίας του σύκου κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, δημιουργεί ένα στρεσάρισμα του μύκητα με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή αφλατοξινών. Η παρουσία αφλατοξινών στα ξηρά σύκα επηρεάζεται από την τεχνική ξήρανσης. Έχει αναφερθεί ότι σε συνθήκες περιβάλλοντος που “στρεσάρουν” την ανάπτυξη του *Aspergillus* spp., η παραγωγή των αφλατοξινών αυξάνεται (Δημόπουλος και συν., 2008). Είναι επίσης γνωστό ότι ο ρυθμός πτώσης της υγρασίας ενός νωπού προϊόντος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μυκήτων και κατά συνέπεια, στην περίπτωση προσβολής των ξηρών σύκων από τον *Aspergillus* spp. επηρεάζει και την παραγωγή αφλατοξινών.

Η διαδικασία ξήρανσης των σύκων γίνεται παραδοσιακά στον ήλιο, οπότε δεν έχουμε κάποιον έλεγχο στο ρυθμό μεταβολής της υγρασίας. Ταυτόχρονα, λόγω

του μεγάλου αριθμού μικρών παραγωγών όπου ο καθένας διαχειρίζεται την ξήρανση των σύκων του, με δικό του τρόπο και σε δικό του χώρο, μέχρι να τα παραδώσει σε κάποιον έμπορο ή στη συνεταιριστική οργάνωση (ΣΥΚΙΚΗ). Για τους λόγους αυτούς δεν έχει επιτευχθεί η ανάπτυξη και εφαρμογή ενός ενιαίου πρωτοκόλλου ξήρανσης που να λαμβάνει υπόψιν του και το πρόβλημα των αφλατοξινών.

## 1.1. Η καλλιέργεια της συκιάς

### Βοτανική ταξινόμηση

Η συκιά ανήκει στην οικογένεια *Moraceae*, στο γένος *Ficus*, υπογένος *Eusyce* και στο είδος *F. Carica* (L). Η οικογένεια *Moraceae* περιλαμβάνει 60 γένη και πάνω από 2.000 είδη δένδρων, αναρριχώμενων θάμνων και ποωδών φυτών.

Το είδος *F. carica* είναι ένα θηλυκοδίοικο είδος, που περιλαμβάνει δυο ευκρινείς τύπους δένδρων, την αρρενοσυκιά που είναι μόνοικη δηλαδή έχει αρσενικά και θηλυκά άνθη και την ημεροσυκιά, που έχει μόνο θηλυκά άνθη.

Η καλλιεργούμενη συκιά είναι δένδρο φυλλοβόλο, μετρίου έως μεγάλου μεγέθους, με μαλακό ξύλο. Τα φύλλα είναι απλά, μεγάλα, παχιά , τρίλοβα έως πεντάλοβα, μακρόμισχα, με τραχεία επιφάνεια (χνουδωτά στην κάτω επιφάνεια). Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, τους ξυλοφόρους και τους μικτούς καρποφόρους που έχουν σχήμα κωνικό και τους απλούς ανθοφόρους με σφαιρικό σχήμα. Οι ξυλοφόροι και οι μικτοί σχηματίζονται επάκρια ή πλάγια των βλαστών ενώ οι απλοί ανθοφόροι μόνον πλάγια. Τα άνθη της συκιάς είναι μικροσκοπικά και πολυάριθμα. Υπάρχουν τέσσερις διάφοροι τύποι ανθέων, τα μακρόστυλα θηλυκά της ημεροσυκιάς τα αρσενικά των ερινεών της αρρενοσυκιάς, τα βραχύστυλα θηλυκά της αρρενοσυκιάς και τα θηλυκά της παρθενοκαρπικής συκιάς. Τα άνθη της παρθενοκαρπικής συκιάς δεν παράγουν γύρη ούτε έχουν ωοθήκες επιδεκτικές γονιμοποίησης αλλά εξελίσσονται σε εδώδιμο καρπό. Κάθε μακρόστυλο θηλυκό

άνθος αποτελείται από μια μονόχωρη ωοθήκη, με μια σπερματική βλάστη που, αν γονιμοποιηθεί, εξελίσσεται σε δρυπόμορφο αχάινιο που συνήθως αποκαλείται σπέρμα και περιβάλλεται από εύσαρκο τοίχωμα όπου είναι ο αληθινός καρπός της συκιάς. Το μακρόστυλο άνθος έχει τέσσερα ή πέντε μικροσκοπικά πέταλα και στύλο πολύ μεγαλύτερο σε μήκος από εκείνο των θηλυκών ανθέων της αρρενοσυκιάς. Τα αρσενικά άνθη έχουν μακρύτερο ποδίσκο από τα θηλυκά, πέντε πέταλα, πέντε στήμονες και μια ατροφική ωοθήκη. Η αρρενοσυκιά χαρακτηρίζεται από συκώνια που περιέχουν βραχύστηλα θηλυκά άνθη καθώς και αρσενικά άνθη, από τα οποία τα θηλυκά είναι διατεταγμένα στο μεγαλύτερο μέρος του εσωτερικού χώρου και τα αρσενικά συγκεντρωμένα γύρω από το εσωτερικό κορυφαίο τμήμα του συκωνίου. Η ημεροσυκιά χαρακτηρίζεται από συκώνια που περιέχουν μόνο μακρόστυλα θηλυκά άνθη. Η συκιά μπαίνει σε παραγωγική καρποφορία από τον 3<sup>ο</sup> έως 4<sup>ο</sup> χρόνο της ηλικίας της. Η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται σε 40 έως 50 έτη. (Ποντικής, 1996)

## **Επικονίαση και Γονιμοποίηση**

Όπως προαναφέρθηκε το σύκο είναι μια κοίλη ανθοταξία με πολυάριθμα θηλυκά άνθη στο εσωτερικό της τοίχωμα. Ο καρπός για να ωριμάσει πρέπει τα άνθη της ανθοταξίας του να γονιμοποιηθούν με γύρη από κάποια εξωτερική πηγή. Η φύση, για το σκοπό αυτό, ήτοι τη μεταφορά της γύρης από την αρρενοσυκιά στην ανθοταξία και την επικονίαση των ανθέων της, έχει επιλέξει ένα πολύ εξειδικευμένο έντομο της συκιάς, τον ψήνα (*Blastophaga grossorum*). Χωρίς επικονίαση, οι καρποί αυξάνουν σε μέγεθος μέχρι να αποκτήσουν διάμετρο περίπου 2 cm, κιτρινίζουν, συρρικνώνονται και πέφτουν πριν ακόμα ωριμάσουν.

Η επικονίαση (ερανισμός) αρχίζει από τα τέλη Μαΐου και συνεχίζεται μέχρι και τον Ιούνιο. Τα ενήλικα θηλυκά άτομα βγαίνουν από τα αρρενόσυκα και μπαίνουν στα θηλυκά άνθη της ήμερης συκιάς για να γεννήσουν τα αυγά τους. Κατά την είσοδο τους από τον οφθαλμό του σύκου, η γύρη που μεταφέρει με το σώμα του ο ψήνας διασκορπίζεται στα θηλυκά άνθη, με αποτέλεσμα να γονιμοποιηθούν και σχηματιστούν ζωτικοί σπόροι. Στα άνθη αυτά ο ψήνας δεν μπορεί να τοποθετήσει αυγά, γιατί η κατασκευή του άνθους τον εμποδίζει να φτάσει μέχρι την ωοθήκη. Στην προσπάθειά του να φτάσει στην ωοθήκη για να γεννήσει τα αυγά του

μεταφέρει γύρη σε όλα τα άνθη και έτσι εξασφαλίζεται η γονιμοποίηση όλων των ανθέων και η καρπόδεση (Ποντικής, 1996).

## **Κλίμα και έδαφος**

Η συκιά είναι ένα φυλλοβόλο δέντρο. Τα ώριμα δέντρα μένουν χωρίς φύλλα κατά τη διάρκεια του χειμώνα αλλά οι οφθαλμοί τους έχουν τόσο μικρό λήθαργο που αν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ήταν πάνω από 15°C το δέντρο θα βλάστανε συνέχεια.

Η συκιά δεν αντέχει σε χαμηλές θερμοκρασίες. Θερμοκρασίες μικρότερες των 0°C συνήθως προκαλούν ζημιές στο υπέργειο ενώ σε θερμοκρασίες μικρότερες των -10°C καταστρέφεται ακόμα και το ριζικό σύστημα. Η συκιά παράγει καρπούς καλής ποιότητας όταν η θερμοκρασία του καλοκαιριού κυμαίνεται γύρω στους 30°C. Θερμοκρασίες πάνω από 40°C αλλοιώνουν την ποιότητά τους και τα σύκα γίνονται δερματώδη και σκληρά.

Βροχές κατά την περίοδο ωρίμανσης των καρπών είναι ανεπιθύμητες διότι ο καρπός σχίζεται στην κάτω πλευρά του και χάνει την εμπορική του αξία ενώ ταυτόχρονα εισέρχονται και μικροοργανισμοί όπου καταστρέφουν το σύκο.

Από εδαφικής πλευράς το δέντρο είναι ικανό να αναπτυχθεί σε ξηρά, αμμώδη, χαλικιώδη, και πετρώδη εδάφη αρκεί να υπάρχουν ρωγμές για να αναπτυχθούν οι ρίζες. Προτιμά ασβεστόχρα εδάφη και είναι ανθεκτικό στην υψηλή αλατότητα. Βεβαίως το δέντρο αποδίδει πολύ καλύτερα όταν καλλιεργείται σε γόνιμα και καλά στραγγιζόμενα εδάφη (Ποντικής, 1996).

## **Πολλαπλασιασμός**

Η συκιά πολλαπλασιάζεται πολύ εύκολα με χειμερινά ξυλοποιημένα μοσχεύματα, με φυλλοφορά μοσχεύματα, με εναέριες καταβολάδες και με την τεχνική *in vitro*. Επίσης πολλαπλασιάζεται και με ενοφθαλμισμό με ανεστραμμένο T σε ετήσιους ζηηρούς βλαστούς αυστηρά κλαδεμένων δένδρων ή με πλακίτη εμβολιασμό με



βλαστούς μεγαλύτερης ηλικίας. Πιο κατάλληλη εποχή για εμβολιασμούς, θεωρείται το Φθινόπωρο.

Ο πολλαπλασιασμός της με σπόρο χρησιμοποιείται μόνον όταν επιδιώκουμε να δημιουργήσουμε νέες ποικιλίες. Οι μικροί σπόροι μπορεί να τοποθετηθούν σε θερμαινόμενο θερμοκήπιο όπου βλαστάνουν σε χρονικό διάστημα περίπου 2 μηνών. Οι σπόροι πρέπει να σπέρνονται αμέσως μετά την εξαγωγή τους από τους υπερώριμους καρπούς. Ο διαχωρισμός από τη σάρκα γίνεται εύκολα με εμβάπτιση αυτής σε νερό για μερικές μέρες. Στο διάστημα αυτό οι γόνιμοι σπόροι πέφτουν στον πυθμένα του δοχείου με το νερό, ενώ οι κούφιοι παραμένουν στην επιφάνεια του νερού και απομακρύνονται εύκολα (Βασιλακάκης, 2007).

## Ποικιλίες

Οι σημαντικότερες ελληνικές ποικιλίες της μονόφορης συκιάς είναι (Βασιλακάκης 2007):

- **Καλαμών ή Τσαπελοσυκιά που ανήκει στην ποικιλία Calymirna** και της οποίας ο καρπός έχει μέτριο μέγεθος, φλοιό ανοικτοπράσινο, κίτρινη σάρκα και τα σύκα της προορίζονται για ξερά.
- **Βασιλικά ή Σύκα της Αττικής** της οποίας οι καρποί είναι μεγάλοι, πράσινοι με σκούρες μωβ ραβδώσεις, ωριμάζουν τον Αύγουστο και καταναλώνονται νωποί.
- **Κύμης** της οποίας ο καρπός έχει μέγεθος μέτριο έως μεγάλο, ο φλοιός είναι πράσινος, η σάρκα κόκκινη, ωριμάζουν στα τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρίου και καταναλώνονται είτε ως ξηρά είτε ως νωπά.

## Ξήρανση και αποθήκευση

Η ξήρανση των προϊόντων είναι μια από τις παλαιότερες αλλά και καλύτερες μεθόδους συντήρησης. Με αυτή τη μέθοδο απομακρύνεται μεγάλο μέρος της υγρασίας του γεωργικού προϊόντος με αποτέλεσμα τη μείωση της μικροβιολογικής

δραστηριότητας και την ελαχιστοποίηση των φυσικοχημικών αλλαγών κατά την αποθήκευσή του. Ταυτόχρονα, με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται νέα προϊόντα με νέα ποιοτικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά. Η ξήρανση επιφέρει σημαντική μείωση του βάρους και του όγκου, ελαχιστοποιώντας τη συσκευασία, την αποθήκευση και το κόστος μεταφοράς (Okos et al., 1992).

Η ξήρανση των γεωργικών προϊόντων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Ο πιο οικονομικός και πιο γνωστός τρόπος είναι με ξήρανση με έκθεση στον ήλιο. Με αυτή την διαδικασία χιλιάδες τόνοι προϊόντων βγαίνουν στην αγορά ως αποξηραμένοι. Είναι μια αργή και επίπονη διαδικασία λόγω των κλιματικών συνθηκών.

Στην περίπτωση των σύκων, η διαδικασία αυτή γίνεται με το προϊόν μας να τοποθετείτε στο έδαφος πάνω σε ένα δίχτυ και σε περίπτωση βροχής να σκεπάζεται με ένα διαφανές πανί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα άμεση ρύπανση του προϊόντος μας από τη σκόνη, προσβολές από ζώα και μικροβιακές μολύνσεις. Όμως παρά τα πολλά μειονεκτήματα, η αποξηρανση στον ήλιο εξακολουθεί να εφαρμόζεται σε χώρες όπου οι κλιματικές συνθήκες είναι ευνοϊκές.

Η ξήρανση με θερμό αέρα είναι κοινή μέθοδος για την αφυδάτωση των τροφίμων. Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι η ξήρανση με θερμό αέρα, λόγω της παρατεταμένης έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες ξήρανσης, οδηγεί σε σημαντική υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των φυτικών οργάνων, όπως του χρώματος, των θρεπτικών συστατικών, της γεύσης, της υφής, προκαλεί δε σοβαρή συρρίκνωση, μείωση του όγκου, της ικανότητα επανυδάτωσης, και μετανάστευση διαλυμένων ουσιών από το εσωτερικό του τρόφιμου στην επιφάνεια (Bouiraout, et al., 1994; Yongsawatdigul & Gunasekaran, 1996; Feng & Tang, 1998; Maskan, 2000, Xanthopoulos et al., 2007, 2009). Όμως η μέθοδος αυτή έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία, (Barbosa-Ca & Vega-Mercado, 1996) διότι έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την ξήρανση στον ήλιο, όπως: (α) καλύτερες συνθήκες υγιεινής, λόγω της μείωσης της μόλυνσης από τη σκόνη και άλλα ξένα σώματα, (β) ικανότητα ρύθμισης των παραμέτρων ξήρανσης, (γ) η ξήρανση δεν εξαρτάται από τη βροχή ή τις αλλαγές του καιρού, (δ) μικρότερος χρόνος αφυδάτωσης και (ε) χαμηλότερο κόστος εργασίας.

Η λυοφιλίωση (ξηράνση με κατάψυξη) είναι μια δαπανηρή διαδικασία και είναι κατάλληλη μόνο για προϊόντα υψηλής αξίας. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η βλαβερή επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων (Ratti, 2001). Τα παραγόμενα προϊόντα χαρακτηρίζονται για τη διατήρηση της δομής τους (Karathanos et al., 1996), τη μικρή ή αμελητέα συρρίκνωση, την καλή ενυδάτωση, παρουσιάζουν όμως γευστική υποβάθμιση λόγω απώλειας των πτητικών ουσιών (Flink, 1975).

Το σύκο είναι ένα από τα πιο σημαντικά είδη φρούτων στην περιοχή της Μεσογείου. Είναι ιδιαίτερα ευπαθές, ακόμη και σε συνθήκες ψύξης (Hardenburg et al., 1986, Piga et al., 1995), και έτσι σχεδόν όλη η παγκόσμια παραγωγή διατηρείται σε αφυδατωμένη (ξηρά) μορφή. Η ξήρανση στον ήλιο είναι η συμβατική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απόκτηση αποξηραμένων σύκων, απαιτώντας μόνο χαμηλό κεφάλαιο, απλό εξοπλισμό και χαμηλών εισροών ενέργεια. Σύμφωνα με τους Piga et al., (2004) η μέθοδος αυτή παράγει σύκα με πολύ καλές οργανοληπτικές ιδιότητες.

Με την διαδικασία της ξήρανσης έχουμε μείωση του βάρους και του όγκου που είχε το προϊόν μας με αυτό το τρόπο επιτυγχάνουμε την αποθήκευση σε μικρότερους χώρους καθώς και μικρότερες συσκευασίες πώλησης πληρώνοντας λιγότερα μεταφορικά.

## 1.2. Αφλατοξίνες

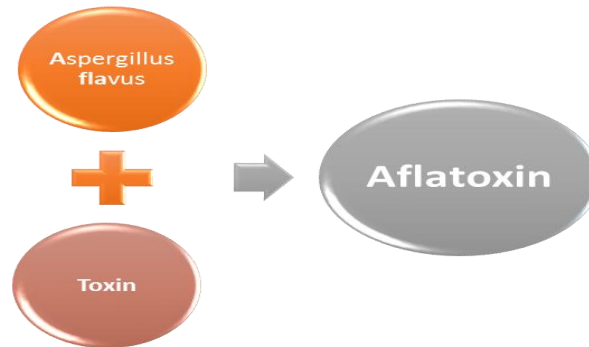
### Το πρόβλημα των αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες (aflatoxins) αποτελούν μια ομάδα από τις πιο τοξικές ουσίες που απαντώνται στη φύση και παράγονται κυρίως από μύκητες του γένους *Aspergillus* spp. και κυρίως από τα είδη *A. flavus*, *A. Parasiticus*, *A. carbonarius* και *A. nomius*. Είναι ουσίες ιδιαίτερα τοξικές για τον άνθρωπο και τα ζώα και μπορούν να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες (χρόνια τοξίνωση, καρκινογένεση, μεταλλάξεις) ακόμα και τον θάνατο. Οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος γεωργικών προϊόντων, αλλά κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα στα αράπικα φιστίκια, στα σύκα και στα αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά και σε τυριά, όταν υπάρξουν κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Επίσης μπορεί να εμφανισθούν και σε ζωοτροφές (καλαμπόκι, ενσηρωμένα σιτηρά), με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται και στο γάλα ζώων που έχουν τραφεί με αυτές.

Το πρόβλημα των αφλατοξινών αναγνωρίστηκε σε διατροφικό πρόβλημα το 1960 όταν εμφανίστηκε νέκρωση του ήπατος σε πουλερικά από την οποία πέθαναν περίπου 100.000 πτηνά. Αρχικά τα αίτια αυτής της περίεργης ασθένειας ήταν άγνωστα γι' αυτό και ονομάστηκε «Turkey 'X' disease». Αργότερα διαπιστώθηκε ότι αιτία ήταν η ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus* στις ζωοτροφές. Για τη διαπίστωση του αιτίου αυτής της αρρώστιας συνεργάστηκαν πολλές ομάδες ειδικών όπως κτηνίατροι, παθολόγοι, μικροβιολόγοι, διαιτολόγοι, χημικοί, βιοχημικοί και άλλοι. Βρέθηκε ότι όλες οι εκτροφές στις οποίες παρουσιάστηκε η ασθένεια, προμηθεύονταν φυράματα από το ίδιο εργοστάσιο ζωοτροφών. Όταν η ασθένεια παρουσιάστηκε και σε εκτροφές που έπαιρναν ζωοτροφές από κάποιο άλλο εργοστάσιο σε άλλη περιοχή διαπιστώθηκε ότι και τα δυο εργοστάσια χρησιμοποιούσαν για την παρασκευή των ζωοτροφών ένα κοινό συστατικό, και συγκεκριμένα αραχιδόπιτα από τη Βραζιλία.

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

απομονώθηκε μια εξαιρετικά τοξική ουσία που πήρε το όνομά της από το μύκητα ((A)spergillus (f) flavus -(t)oxin, αφλατοξίνη), (<http://www.ellinikigeorgia.gr/aflatoxini-exthros-gala/>).



### Φυσικοχημικές ιδιότητες των αφλατοξινών

Χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα των αφλατοξινών είναι ο έντονος φθορισμός των διαλυμάτων τους υπό την επίδραση ακτινοβολίας στην περιοχή της υπεριώδους. Από την ιδιότητα αυτή προκύπτει το γράμμα που χαρακτηρίζει τις αφλατοξίνες των ομάδων Β και Γ. Οι αφλατοξίνες της ομάδας Β ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_{2a}$ ) χαρακτηρίζονται από έντονο κυανό (Blue, Β) φθορισμό ( $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$ ), ενώ οι αφλατοξίνες της ομάδας Γ ( $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_{2a}$ ) από έντονο πράσινο (Green, Γ) φθορισμό ( $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$ ). Οι αφλατοξίνες  $M_1$  και  $M_2$  είναι μεταβολίτες των αφλατοξινών  $B_1$  και  $B_2$  και βρίσκονται στο γάλα (Milk, Μ) ανθρώπων και θηλαστικών ζώων που έχουν τραφεί με τροφές μολυσμένες με αφλατοξίνες. ([http://chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_aflatoxin.htm](http://chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxin.htm)).

Η επίδραση διάφορων φυσικών και χημικών παραγόντων στις αφλατοξίνες έχει εξετασθεί αρκετά ώστε να διαπιστωθεί το κατά πόσο είναι δυνατόν να απαλλαχθούν οι τροφές από αυτές με κάποια φυσική ή χημική διαδικασία. Σε ξηρή κατάσταση είναι σταθερές μέχρι το σημείο τήξης τους. Αντίθετα, παρουσία υγρασίας σύντομα καταστρέφονται, πιθανώς με υδρόλυση. Σε αλκαλικό περιβάλλον οι αφλατοξίνες υδρολύονται όμως σε αλλαγή του περιβάλλοντος σε όξινο, η αντίδραση είναι αντιστρεπτή. Διάφορες ισχυρά οξειδωτικές ουσίες (υποχλωριώδες νάτριο, υπερμαγγανικό κάλιο, χλώριο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπερβορικό νάτριο) φαίνεται ότι αλλοιώνουν το μόριο των αφλατοξινών, τα προϊόντα όμως της αντίδρασης δεν έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί.

## **Τοξικότητα των αφλατοξινών**

Η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων στις αφλατοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε **αφλατοξίκωση** (aflatoxicosis), μια παθολογική κατάσταση που εκδηλώνεται με μια μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων. όπως: δυσκολία στην κατάποση, αίσθημα πνιγμού, υψηλή πίεση, ρινορραγίες, ναυτία, διάρροια, καρδιακή αρρυθμία, ταχυκαρδία, αλλεργίες, κατάθλιψη, σύγχυση, κόπωση, καρκίνο, ακόμα και το θάνατο. Η μεγάλη αυτή ποικιλία των συμπτωμάτων καθιστά δύσκολη τη διάγνωση της αφλατοξίκωσης. Γενικά οι αφλατοξίνες έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και ανοσοκατασταλτικές ουσίες. Η αφλατοξίνη B<sub>1</sub> θεωρείται ως το ισχυρότερο γνωστό καρκινογόνο του ήπατος με αποδεδειγμένη γονοτοξικότητα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η καρκινογόνος δράση του είναι περίπου 1.000 φορές ισχυρότερη του βενζοπυρενίου, ενός πολυκυρηνικού υδρογονάνθρακα που αποτελεί το δραστικότερο μεταλλαξιογόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων ([http://chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_aflatoxin.htm](http://chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxin.htm)).

### 1.3. Ο μύκητας *Aspergillus spp.*

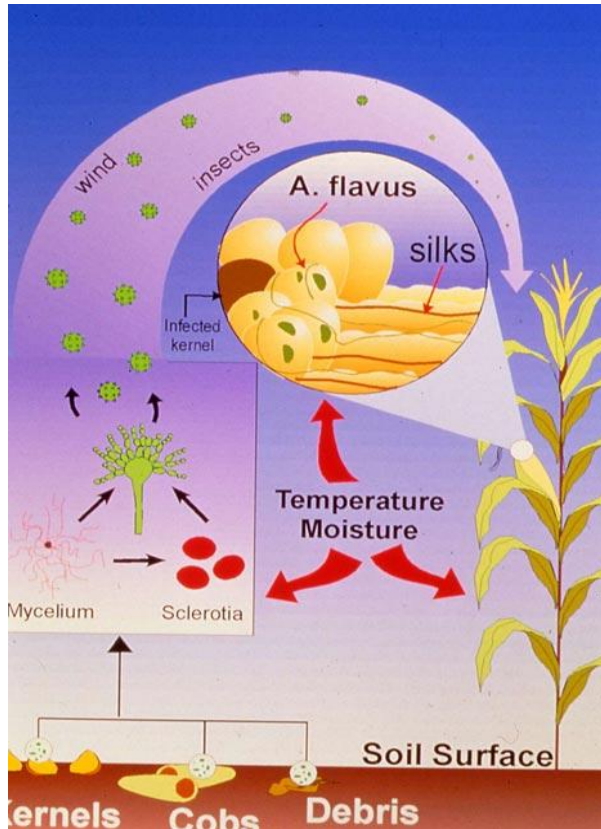
Το γένος *Aspergillus spp.* ταξινομείται στην οικογένεια Moniliaceae της Τάξης Moniliales. των Δευτερομυκήτων. (Deuteromycotina). Είναι κοσμοπολίτικο είδος και περιλαμβάνει περίπου 200 είδη. Βρίσκεται στο έδαφος, τον αέρα καθώς και σε αποθηκευμένα προϊόντα. Τα πιο συνηθισμένα είδη είναι τα *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. glaucus* και *A. nomius*. Η τέλεια μορφή του δεν είναι γνωστή αλλά σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των διαφραγμάτων (septa) του μυκηλίου του και των κονιδίων του φαίνεται να ανήκει στους Ασκομύκητες. Και πράγματι σε ορισμένα είδη (*A. glaucus*) έχει παρατηρηθεί, κάτω από ειδικές συνθήκες, ο σχηματισμός ασκοσπορίων.

#### Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα

Ο *Aspergillus spp.* είναι προαιρετικό παράσιτο και μπορεί να αναπτύσσεται σε μεγάλο αριθμό θρεπτικών υποστρωμάτων. Συνήθως αναπτύσσεται σαπροφυτικά σε νεκρή οργανική ύλη συμβάλλοντας στην ανακύκλωση των διαφόρων αποσυντιθέμενων οργανικών υλικών. Σε συνθήκες κατάλληλης υγρασία και θερμοκρασίας ο μύκητας μπορεί να εκδηλώσει παρασιτική συμπεριφορά σε ζωντανούς φυτικούς ιστούς. Διαχειμάζει είτε ως μυκήλιο είτε με τη μορφή σκληρωτίων σε νεκρή οργανική ύλη στο έδαφος. Τα σκληρώτια είτε βλαστάνουν σχηματίζοντας υφές ή παράγουν κονιδιοφόρους. Οι κονιδιοφόροι έχουν χαρακτηριστικό σχήμα με επάκρια χαρακτηριστική κεφαλή και φέρουν κονίδια σε αλυσίδες. Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, σφαιρικά, χρώματος πρασινοκίτρινου, διαμέτρου 3-6 μm, με ακανθώδη επάρματα. Η διασπορά τους γίνεται με τον άνεμο ή τα έντομα (ξηροσπόρια) σε καρπούς όπου βλασταίνουν και μολύνουν. (Εικόνα 3.1.). Στη συκιά, η μόλυνση των καρπών γίνεται σε μεγάλο βαθμό και μέσω του ψήνα που εισέρχεται στο εσωτερικό κατά τη γονιμοποίηση των σύκων.

Ο μύκητας *Aspergillus spp.* ευνοείται από χαμηλή υγρασία και υψηλή θερμοκρασία (ξηροθερμικό περιβάλλον). Η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι οι 37°C. Ωστόσο μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα μεταξύ των

θερμοκρασιών 25 έως 42°C, και σε ειδικές περιπτώσεις από 12 έως 48°C.  
(<http://ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>)



**Σχήμα 3.1.** : Ο Βιολογικός κύκλος του *Aspergillus flavus*  
(Προσαρμογή από: [www.aspergillusflavus.org/aflavus/](http://www.aspergillusflavus.org/aflavus/))

### Η παραγωγή των αφλατοξινών από τον *Aspergillus spp.*

Στο πλαίσιο του ανταγωνισμού τους με άλλους σαπροφυτικούς ή παρασιτικούς μικροοργανισμούς, πολλά είδη ή διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες παράγουν αφλατοξίνες. Η παραγωγή αφλατοξινών παρατηρείται τόσο στη νεκρή οργανική ύλη όσο και στους ζωντανούς ιστούς και καθορίζεται τόσο από γονοτυπικά χαρακτηριστικά του μύκητα όσο και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία, pH).  
(<http://ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>)



Στην περίπτωση της συκιάς, το στρεσάρισμα των δέντρων από παρατεταμένες συνθήκες ξηρασίας ή υψηλές θερμοκρασίες που συνήθως επικρατούν την περίοδο πριν και κατά τη συγκομιδής Προσβολές των καρπών από έντομα, πουλιά ή τρωκτικά είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που ευνοούν τον παρασιτισμό από το μύκητα και την παραγωγή αφλατοξινών. Η κακή θρέψη, η υψηλή πυκνότητα φύτευσης της καλλιέργειας και ο ανταγωνισμός των ζιζανίων συνδέονται με την αυξημένη ανάπτυξη μυκήτων και το σχηματισμό αφλατοξινών.

(11)

Η σχετική υγρασία είναι από τους πιο σπουδαίους παράγοντες για την ανάπτυξη του *A. flavus* και την παραγωγή αφλατοξινών. Σε εργαστηριακές συνθήκες, η ελάχιστη σχετική υγρασία για την παραγωγή κονιδίων από τον *Aspergillus* spp. είναι 85% και για τη βλάστηση και την ανάπτυξή τους 80%. Τα ποσοστά αυτά μπορεί να μεταβάλλονται ανάλογα με το υπόστρωμα και τη θερμοκρασία. (Ζερφειρίδης, 1982).

Μετασυλλεκτικά, ο σχηματισμός των αφλατοξινών ευνοείται από υψηλές θερμοκρασίες και υψηλά ποσοστά υγρασίας στο χώρο αποθήκευσης. Το κατώτατο όριο σχετικής υγρασίας που απαιτείται προκειμένου ο *A. flavus* να παράξει αφλατοξίνες είναι 18% για τα αμυλούχα δημητριακά και 10% για τους ελαιούχους καρπούς, όπως τα φιστίκια και οι ηλιόσποροι. Τα κατώτατα και ανώτατα όρια θερμοκρασίας για την παραγωγή αφλατοξινών είναι 12-27°C, και 40-42°C αντίστοιχα. (Davis και Diener, 1970). Ο μύκητας *Aspergillus* spp. αναπτύσσεται και παράγει αφλατοξίνες ακόμη και όταν το οξυγόνο στην ατμόσφαιρα είναι ελάχιστο, ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> αναστέλλουν την ανάπτυξή του. Το μυρμηκικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως σαν μυκητοκτόνο σε αποθηκευμένες ζωοτροφές, όχι μόνο δεν αναστέλλει αλλά μάλλον προάγει την ανάπτυξη του μύκητα ακόμη και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

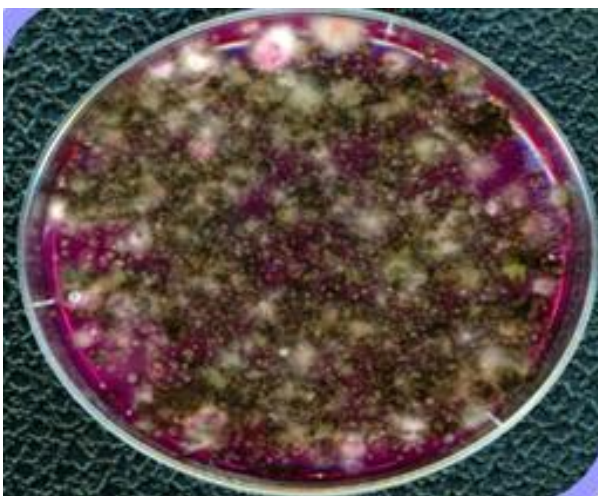
Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν:

- η καταγραφή του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp. στη Μεσσηνία,
- η μέτρηση της αφλατοξικογόνου ικανότητάς τους,
- η μέτρηση της παθογόνου δύναμή τους, και
- η καταγραφή της αναλογίας των τεσσάρων αφλατοξινών που παράγουν.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη μελέτη του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp. επελέγησαν 45 συκεώνες στις περιοχές καλλιέργειας της συκιάς της Νοτίου Πελοποννήσου και συγκεκριμένα 36 από τη Μεσσηνίας και 9 από τη Λακωνία. Η κατανομή έγινε με βάση την ποσότητα παραγωγής ξηρών σύκων κατά τη διετία 2010-12. Οι περιοχές των συκεώνων και οι γεωγραφικές τους συντεταγμένες δίνονται στον Πίνακα 2.1. του Παραρτήματος. Από τους συκεώνες ελήφθησαν δείγματα εδάφους για τον προσδιορισμό του πληθυσμού του *Aspergillus* spp. το καλοκαίρι (Ιούλιο - Αύγουστο) του 2013.

Από κάθε συκεώνα ελήφθησαν 6 υποδείγματα εδάφους (επαναλήψεις), εμβολιάστηκαν στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Modified Rose Bengal Chloramphenicol Agar (MRBCA) με dichloran και streptomycin, επώασθησαν στους 28° C για 6 ημέρες και καταμετρήθηκαν οι αποικίες του *Aspergillus* spp. που αναπτύχθηκαν (Εικόνα 2.1.). Η σύσταση του θρεπτικού υλικού MRBCA ήταν (συγκέντρωση σε g l<sup>-1</sup>): πεπτόνη 5,0, γλυκόζη 10,0, φωσφορικό κάλιο 1,0, θειικό μαγνήσιο 0,5, Rose-Bengal 0,05 και άγαρ 15,5. Θεωρώντας ότι κάθε αποικία προέρχεται από ένα κονίδιο ή ένα τμήμα μυκηλίου του μύκητα, για κάθε συκεώνα υπολογίσθηκε ο πληθυσμός του *Aspergillus* spp. και εκφράσθηκε σαν «αριθμός των μολυσματικών μονάδων» (Colony Forming Unit, CFU) ανά g εδάφους.



**Εικόνα 2.1.** Ανάπτυξη αποικιών του *Aspergillus* spp. μετά από εμβολιασμό 0,2 g εδάφους σε θρεπτικό υλικό MRBCA με dichloran και streptomycin και επώαση στους 28°C για 6 ημέρες.

Ο πληθυσμός του *Aspergillus* spp. χαρτογραφήθηκε και με εφαρμογή της μεθόδου χωροταξικής παρεμβολής κατά Barnes υπολογίσθηκε η κατανομή στην περιοχή καλλιέργειας της συκιάς στη Νότια Πελοπόννησο.

Για την *in vitro* μελέτη της αφλατοξικογόνου ικανότητας του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp. επιλεγμένες απομονώσεις εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό YES και επωάστηκαν στους 30°C για 8 ημέρες. Το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό είναι πλούσιο σε σάκχαρα κατά αναλογία με τα ξηρά σύκα και προάγει την παραγωγή των αφλατοξινών. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ήταν: (συγκέντρωση σε g l<sup>-1</sup>): σουκρόζη 150, εκχύλισμα ζύμης 20, άγαρ 20.

Για την εκχύλιση των αφλατοξινών από τα σύκα λόγω του μεγάλου ιξώδους και της δυσκολίας ομογενοποίησης των ξηρών σύκων σε σχέση με άλλα υποστρώματα στα οποία γίνεται προσδιορισμός αφλατοξινών, δοκιμάστηκαν διάφορες τεχνικές και η μέθοδος εκχύλισης σταθεροποιήθηκε στην εξής διαδικασία:

- Δείγμα ξηρών σύκων περίπου 300 g (20 – 25 τεμάχια).
- Τεμαχισμός κάθε σύκου σε 10 – 15 επιμέρους τεμάχια (περίπου 1 g).
- Ανάμιξη των επιμέρους τεμαχίων.
- Παραλαβή 20 g (20 – 25 επιμέρους τεμάχια).
- Τοποθέτησή τους σε ισχυρό ομογενοποιητή.
- Προσθήκη 100 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 80% v:v και NaCl 2,5% w:v.
- Ανάμιξη στις 3.000 rpm για 1 min.
- Διήθηση του μίγματος μέσω ηθμού Whatman.
- Αποθήκευση 15 ml διηθήματος σε σφραγισμένο φιαλίδιο στους 0°C μέχρι την ανάλυση.

Με βάση τη διαδικασία εκχύλισης προκύπτει μια αραιώση της πιθανής περιεκτικότητας των αφλατοξινών του δείγματος 1:5.

Για την εκχύλιση των αφλατοξινών από το υλικό της καλλιέργειας αποκόπτονταν 5 δίσκοι θρεπτικού υλικού διαμέτρου 0,8 cm και τοποθετούνταν για 15 min σε 5 ml μεθανόλης, ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση σε αναταράκτη για 30 sec και το αιώρημα διηθείτο μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,45 μm.

Ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στα εκχυλίσματα, τόσο από τα ξηρά σύκα, όσο και από το υλικό της καλλιέργειας έγινε με τη μέθοδο ELISA και τη χρήση kit προσδιορισμού του συνόλου των αφλατοξινών (Agra Quant Aflatoxin 1-20 ppb Romer Labs). Η αναλογία των τεσσάρων επιμέρους αφλατοξινών έγινε σε εκχυλίσματα από το υλικό καλλιέργειας σε επιλεγμένα στελέχη του *Aspergillus spp.* με τη χρήση LC-MS, και μέθοδο που περιγράφεται στο Παράρτημα.

Για τη μέτρηση της παραγωγής κονιδίων, επιλεγμένα στελέχη του *Aspergillus spp.* εμβολιάστηκαν σε τριβλία Petri στα δύο θρεπτικά υλικά (PDA και YES) και επωάστηκαν στους 28°C για 6 ημέρες. Δίσκος διαμέτρου ενός cm μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml απιονισμένο νερό και τα κονίδια αιωρήθηκαν στο νερό με ισχυρή ανάδευση για 30 sec σε αναταράκτη. Όγκος αιωρήματος 5 μl μεταφέρθηκε σε αιματοκυτόμετρο (Petroff-Hausser) και με τη χρήση μικροσκοπίου υπολογίστηκε η συγκέντρωση των κονιδίων ανά ml.

Για τον έλεγχο της μόλυνσης των σύκων εφαρμόστηκαν δύο τεχνικές. Κατά την πρώτη, οι καρποί τεμαχίζονταν σε μικρά τεμάχια, εμβολιάζονταν σε τριβλία με θρεπτικό υλικό CRBA, επωάζονταν στους 25°C για 4-5 ημέρες και καταμετρούνταν οι αποικίες του *Aspergillus spp.* που αναπτύσσονταν ανά τεμάχιο σύκου. Η μέθοδος αυτή δείχνει κυρίως τον πληθυσμό του μύκητα που βρίσκεται στην επιφάνεια των σύκων. Κατά τη δεύτερη, 3 σύκα βάρους περίπου 40 g ομογενοποιούνταν με 400 ml απεσταγμένο νερό σε ομογενοποιητή στο μέγιστο της ταχύτητας για 15 sec, 0,5 ml του πολτού καθώς και η 10-1 αραιώσή του εμβολιάζονταν σε τριβλία με θρεπτικό υλικό, επωάζονταν στους 25°C για 4-5 ημέρες και καταμετρούνταν οι αποικίες του *Aspergillus spp.* που αναπτύσσονταν. Η μέθοδος αυτή δείχνει το συνολικό πληθυσμό του μύκητα τόσο στο εξωτερικό όσο και στο εσωτερικό του σύκου. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις ανά συκεώνα και με τους κατάλληλους υπολογισμούς υπολογίζονταν οι cfu *Aspergillus spp.* / σύκο.

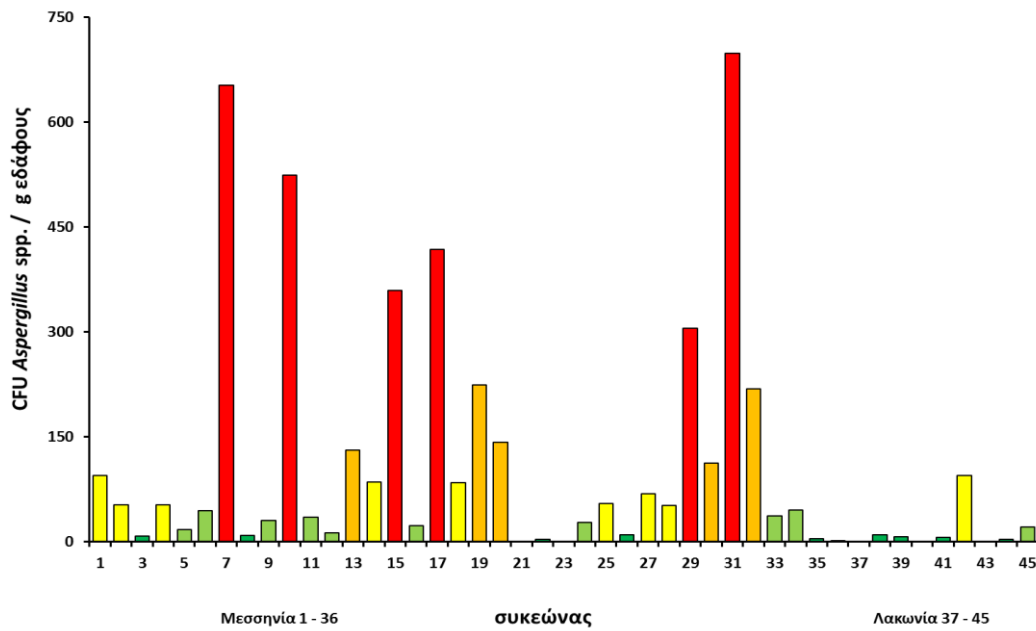
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά μελετήθηκε η χωροταξική κατανομή του πληθυσμού του *Aspergillus* spp. στις περιοχές καλλιέργειας της συκιάς στους νομούς Μεσσηνίας και Λακωνίας (Κεφάλαιο 3.1.). Σε επιλεγμένα στελέχη μελετήθηκε η αφλατοξικογόνος ικανότητά τους (Κεφάλαιο 3.2.). και η προσαρμοστικότητά τους (Κεφάλαιο 3.3.). Ακολούθησε η μελέτη της επιδημιολογίας του μύκητα (Κεφάλαιο 3.4.).

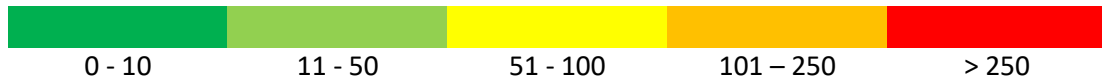
#### 3.1. Χωροταξική κατανομή του πληθυσμού *Aspergillus* spp.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή χωροταξική ανισοκατανομή του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp. και άρα αντιστοίχως διαφορετικά επίπεδα κινδύνου μόλυνσης των σύκων από το μύκητα. Ο πληθυσμός κάθε συκεώνα χαρακτηρίστηκε με βάση τον CFU g<sup>-1</sup> σαν: πολύ υψηλός, υψηλός, μέτριος, χαμηλός ή ελάχιστος και η κατανομή του δίνεται στο Διάγραμμα 3.1.1.

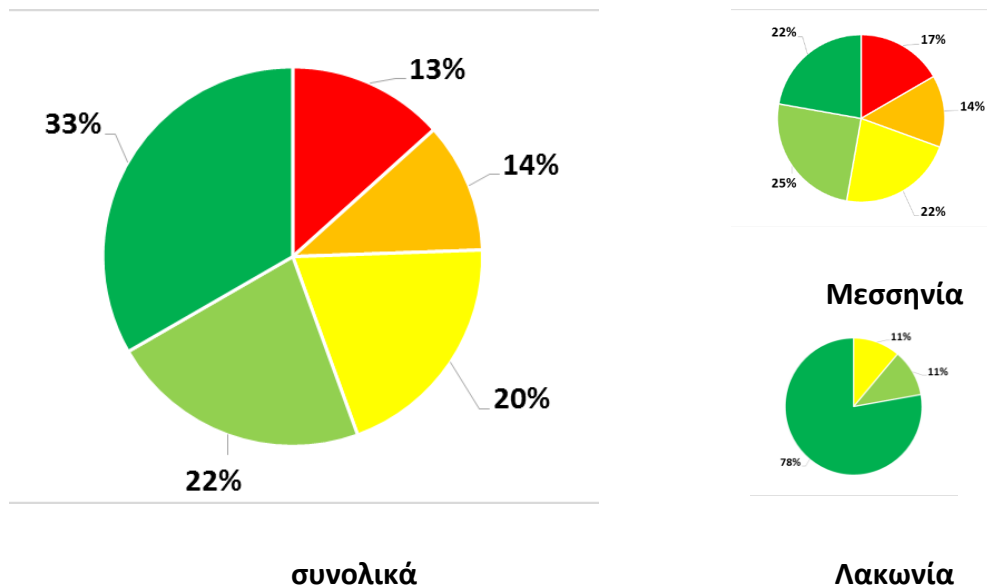
Το 1/3 των συκεώνων εμφανίσθηκαν να έχουν ελάχιστο πληθυσμό *Aspergillus* spp. και μάλιστα σε τρεις συκεώνες (δύο στη Λακωνία και έναν στη Μεσσηνία) δεν διαπιστώθηκε η παρουσία του μύκητα στο έδαφος. Ελάχιστος πληθυσμός *Aspergillus* spp. ανιχνεύθηκε στο 18% των συκεώνων της Μεσσηνίας και στο 78% αυτών της Λακωνίας. Υψηλός και πολύ υψηλός πληθυσμός *Aspergillus* spp. διαπιστώθηκε στο 24% των συκεώνων που μελετήθηκαν, όλοι στην περιοχή της Μεσσηνίας όπου αντιπροσωπεύουν το 31%. Τα ποσοστά του συνόλου των συκεώνων που μελετήθηκαν αλλά και χωριστά για τη Μεσσηνία και τη Λακωνία δίνονται στο Διάγραμμα 3.1.2.



κλίμακα κατηγοριοποίησης συκεώνων με βάση τις CFU *Aspergillus* spp. g<sup>-1</sup> εδάφους



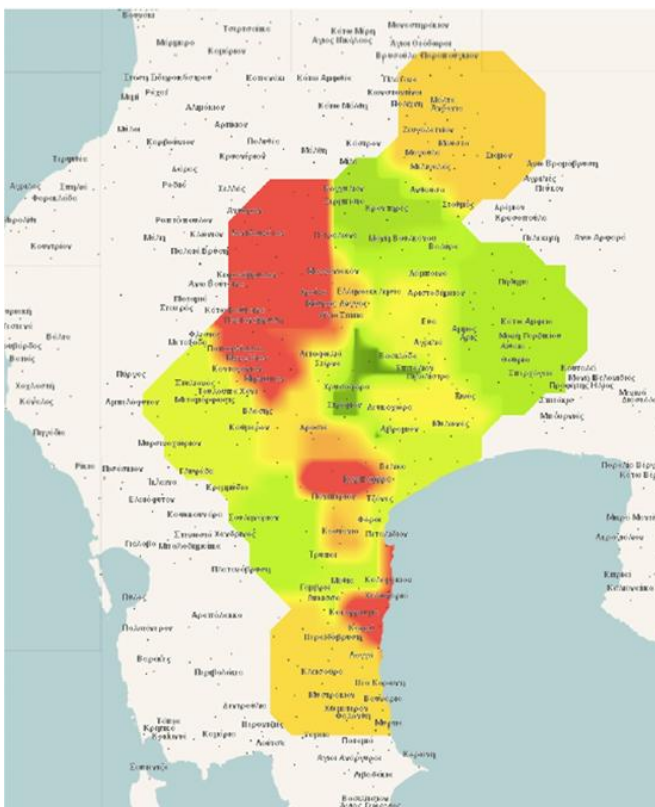
**Διάγραμμα 3.1.1.** Αριθμός μολυσματικών μονάδων του *Aspergillus* spp. (CFU g<sup>-1</sup> εδάφους) στους συκεώνες της Νοτίου Πελοποννήσου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο των 6 επαναλήψεων και η ταξινόμηση των συκεώνων έγινε με την παραπάνω κλίμακα.



**Διάγραμμα 3.1.2.** Ταξινόμηση σε κατηγορίες (%) με βάση τον πληθυσμό του *Aspergillus* spp. για το σύνολο των συκεώνων που μελετήθηκαν και χωριστά για τη Μεσσηνία και τη Λακωνία.

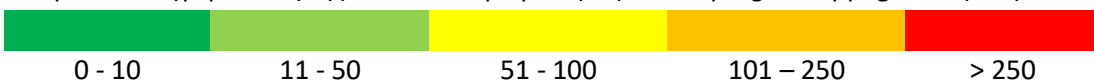
Σε ορισμένους συκεώνες με υψηλό πληθυσμό *Aspergillus* spp. παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των επαναλήψεων. Συγκεκριμένα, σε μια ή δύο επαναλήψεις του ίδιου συκεώνα καταμετρήθηκε ιδιαίτερα υψηλός αριθμός αποικιών του μύκητα. Αυτό δείχνει ότι μέσα στον ίδιο το συκεώνα μπορεί να υπάρχουν περιοχές που λειτουργούν ως «φωλιές» του *Aspergillus* spp. και τροφοδοτούν με μολύσματα και τον υπόλοιπο συκεώνα.

Ο πληθυσμός του *Aspergillus* spp. χαρτογραφήθηκε και με εφαρμογή της μεθόδου χρωταξικής παρεμβολής κατά Barnes υπολογίσθηκε η κατανομή στην περιοχή καλλιέργειας της συκιάς στη Νότια Πελοπόννησο (Χάρτες 3.1.1. και 3.1.2. για τη Μεσσηνία και τη Λακωνία αντίστοιχα).

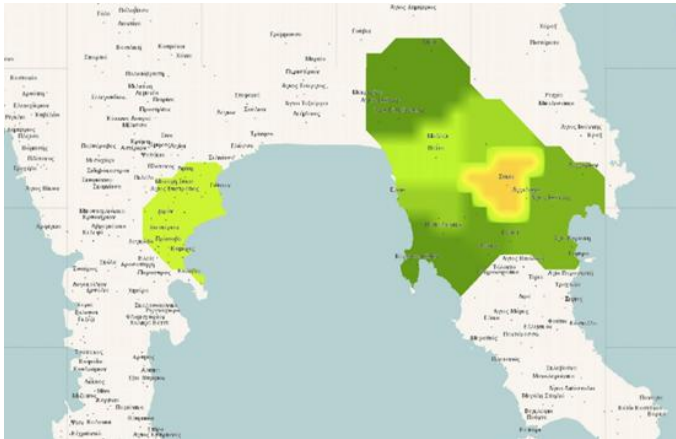


**Χάρτης 3.1.1.** Κατανομή του πληθυσμού του *Aspergillus* spp. στους συκεώνες της Μεσσηνίας με εφαρμογή της μεθόδου χρωταξικής παρεμβολής κατά Barnes.

κλίμακα κατηγοριοποίησης συκεώνων με βάση τις CFU *Aspergillus* spp.  $g^{-1}$  εδάφους

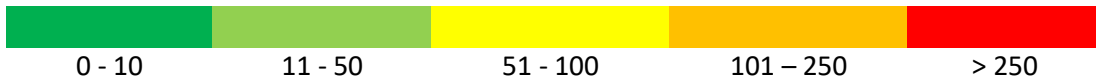






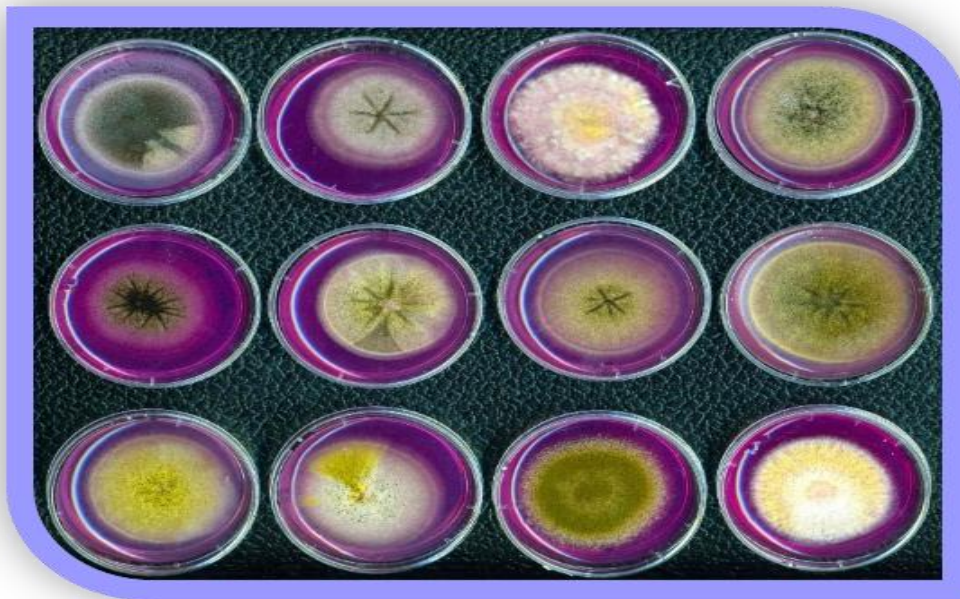
**Χάρτης 3.1.2.** Κατανομή του πληθυσμού του *Aspergillus* spp. στους συκεώνες της Λακωνίας με εφαρμογή της μεθόδου χωροταξικής παρεμβολής κατά Barnes.

κλίμακα κατηγοριοποίησης συκεώνων με βάση τις CFU *Aspergillus* spp. g<sup>-1</sup> εδάφους



Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν παρουσίαζαν μεγάλη μορφολογική παραλλακτικότητα κάτι πολύ συνηθισμένο για ενδημικούς πληθυσμούς. Από αυτές, δείγμα αντιπροσωπευτικό της μορφολογικής παραλλακτικότητας και αναλογικά με τον αριθμό των αποικιών κάθε συκεώνα, επανακαλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υλικό και απομονώθηκαν μονόσπορες καλλιέργειες (απομονώσεις) του μύκητα για περαιτέρω μελέτη (Εικόνα 3.1.1.). Για συκεώνες με αριθμό αποικιών μικρότερο από 10 αποικίες απομονώθηκε το 25%, με 11-50 αποικίες το 20%, με 51-100 αποικίες το 15% , για 101-250 αποικίες το 10% και για περισσότερες από 250 αποικίες το 5%. Συνολικά συλλέχθηκαν 450 απομονώσεις που αντιστοιχούσε περίπου στο 10% του συνόλου των αποικιών που καταμετρήθηκαν.

Σε 15 επιλεγμένους συκεώνες με μεγάλο, μέσο και χαμηλό επίπεδο πληθυσμού του *Aspergillus* spp. πραγματοποιήθηκε επαναληπτική δειγματοληψία το καλοκαίρι της επόμενης χρονιάς. Σε όλες τις περιπτώσεις καταμετρήθηκαν παρόμοιοι πληθυσμοί του μύκητα.



**Εικόνα 3.1.1.** Απομονώσεις του *Aspergillus* spp. σε θρεπτικό υλικό MRBCA, όπου είναι εμφανής η μορφολογική παραλακτικότητα τους.

### **3.2. Αφλατοξικογόνος ικανότητα του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp.**

Για την *in vitro* μελέτη της αφλατοξικογόνου ικανότητας του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp. επελέγησαν 209 απομονώσεις που εμβολιάσθηκαν σε θρεπτικό υλικό YES και επωάσθηκαν στους 30°C για 8 ημέρες. Ο προσδιορισμός του συνόλου των αφλατοξινών έγινε με τη μέθοδο ELISA και τη χρήση kit προσδιορισμού του συνόλου των αφλατοξινών.

Οι τιμές αφλατοξινών που προσδιορίσθηκαν κυμαίνονταν από 0 έως 627 ng μl<sup>-1</sup>. Να επισημανθεί ότι το ανώτατο επιτρεπτό όριο παρουσίας αφλατοξινών στα ξηρά

σύκα σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία είναι 6 και 10 ng μl<sup>-1</sup> για την B<sub>4</sub> και το σύνολο των αφλατοξινών (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) αντίστοιχα.

Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως προς την αφλατοξικογόνο δύναμή τους σε πέντε ομάδες σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.1. Τα στατιστικά στοιχεία των στελεχών κάθε κατηγορίας δίνονται στον Πίνακα 3.2.2.

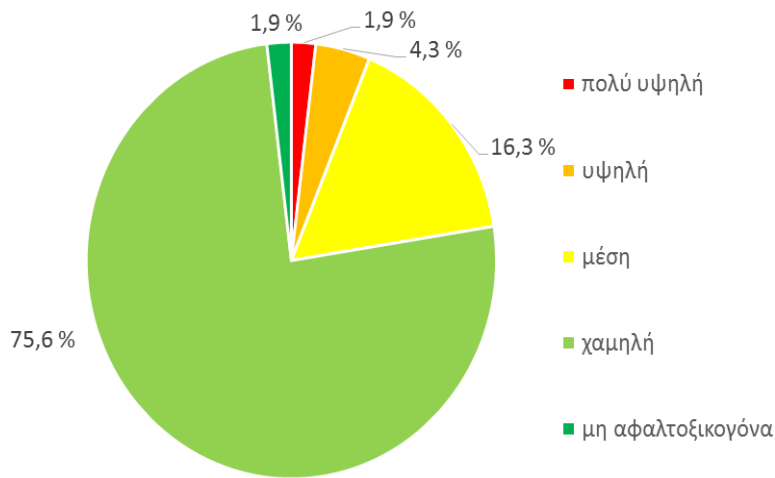
**Πίνακας 3.2.1.** Κατηγοριοποίηση των ενδημικών στελεχών του *Aspergillus* spp. με βάση την αφλατοξικογόνο δύναμή τους

αφλατοξικογόνος δύναμη	αφλατοξίνες (ng μl <sup>-1</sup> )
πολλή υψηλή	≥ 100,0
υψηλή	20,0 – 99,9
μέση	10,0 – 19,9
χαμηλή	1,0 – 9,9
μη αφλατοξικογόνα	< 1,0

**Πίνακας 3.2.2** Στατιστικά στοιχεία κατηγοριών ενδημικών στελεχών του *Aspergillus* spp. με βάση την αφλατοξικογόνο δύναμή τους.

κατηγορία	αφλατοξικογόνος δύναμη παραγωγή αφλατοξίνης (ng μl <sup>-1</sup> )				
	πολύ υψηλή	υψηλή	μέση	χαμηλή	μη αφλατοξικογόνα
ελάχιστο	199,3	21,8	10,0	2,3	0,0
μέγιστο	627,5	71,7	17,9	10,0	0,8
μέσος όρος	400,3	38,3	12,7	6,3	0,3

Η κατανομή των στελεχών στις κατηγορίες δίνεται στο Διάγραμμα 3.2.1.



### Διάγραμμα 3.2.1.

Κατανομή των στελεχών του *Aspergillus* spp. σε κατηγορίες με βάση την αφλατοξικογόνο δύναμη τους σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.1.

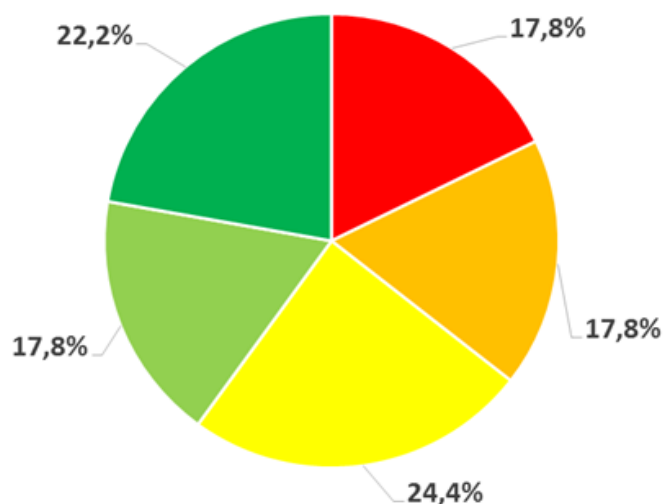
Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό (75,6%) των στελεχών του *Aspergillus* spp. που ενδημούν στην περιοχή καλλιέργειας της συκιάς στη Νότια Πελοπόννησο είναι χαμηλής αφλατοξικογόνου δύναμης και η συγκέντρωση της συνολικής αφλατοξίνης που παράγουν είναι κάτω από αυτή που ορίζεται σαν ανώτατο επιτρεπτό όριο στα ξηρά σύκα. Πολύ λίγα (1,9%) είναι πολύ υψηλής αφλατοξικογόνου δύναμης ενώ υπάρχουν και απομονώθηκαν μη αφλατοξικογόνα στελέχη σε ποσοστό 1,9%. Τα τελευταία μπορεί να αποτελέσουν τη γενετική βάση για την ανάπτυξη βιολογικής μεθόδου για τον έλεγχο του μύκητα και τη μείωση του κινδύνου παρουσίας αφλατοξινών στα ξηρά σύκα.

Με βάση την αφλατοξικογόνο δύναμη των στελεχών και τον πληθυσμό του *Aspergillus* spp. υπολογίστηκε ο συντελεστής επικινδυνότητας παρουσίας αφλατοξινών στα ξηρά σύκα για κάθε ένα από τους 45 συκεώνες χωριστά. Ο συντελεστής επικινδυνότητας υπολογίστηκε από τον πολλαπλασιασμό των μολυσματικών μονάδων *Aspergillus* spp. ανά g εδάφους με τον μέσο όρο της αφλατοξικογόνου ικανότητας των στελεχών που μελετήθηκαν για κάθε συκεώνα χωριστά. Οι συκεώνες ταξινομήθηκαν σε κατηγορίες σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.3.

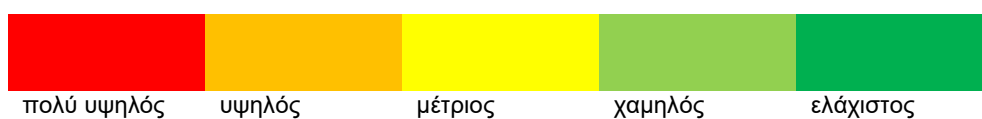
**Πίνακας 3.2.3.** Κατηγοριοποίηση συκεώνων με βάση το συντελεστή επικινδυνότητας παρουσίας αφλατοξινών στα ξηρά σύκα.

βαθμός επικινδυνότητας	τιμές συντελεστή
πολλή υψηλός	$\geq 400,0$
υψηλός	100,0 – 399,9
μέσος	25,0 – 99,9
χαμηλός	5,0 – 24,9
ελάχιστος	$< 5,0$

Η κατανομή των συκεώνων στις κατηγορίες επικινδυνότητας δίνεται στο Διάγραμμα 3.2.2.

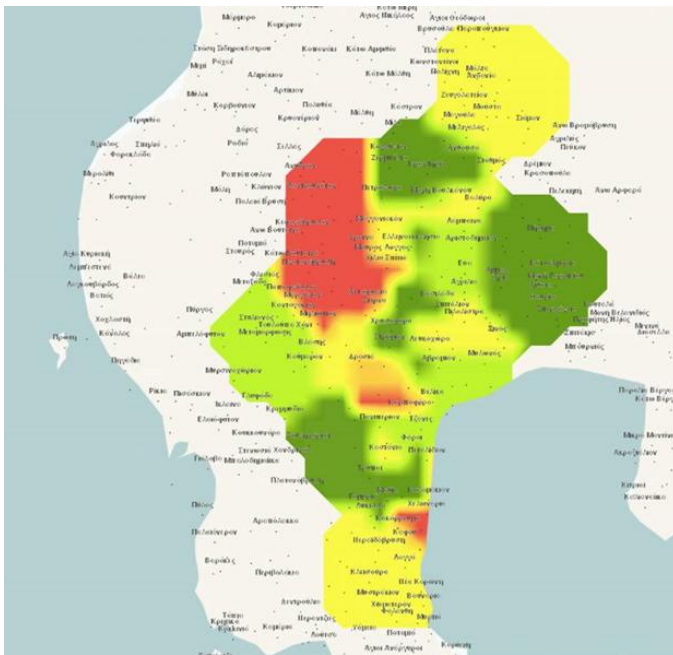


**Διάγραμμα 3.2.2.** Κατανομή των συκεώνων σε κατηγορίες με βάση το βαθμό επικινδυνότητας παρουσίας αφλατοξινών στα ξηρά σύκα με τον Πίνακα 3.2.3



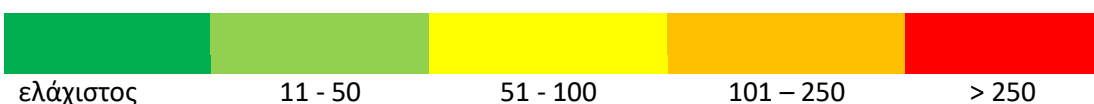
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το 35,6% των συκεώνων που μελετήθηκαν εμφανίζουν υψηλό έως πολύ υψηλό κίνδυνο παρουσίας αφλατοξινών στα ξηρά σύκα βάση τον πληθυσμό και την αφλατοξικογόνο δύναμη των ενδημικών στελεχών του *Aspergillus* spp. Στους συκεώνες αυτούς θα πρέπει να λαμβάνονται μεσοπρόθεσμα μέτρα περιορισμού του κινδύνου και μακροπρόθεσμα εξάλειψης του παθογόνου. Αντίθετα ένα ποσοστό 40% των συκεώνων εμφανίζει μικρό έως ελάχιστο κίνδυνο και οι συκεώνες αυτοί θα πρέπει να προστατευτούν από πιθανή μόλυνσή τους.

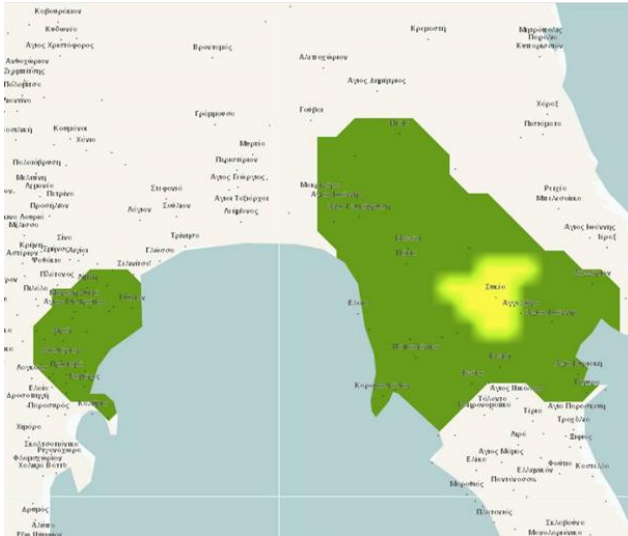
Η χωροταξική κατανομή του βαθμού επικινδυνότητας των συκεώνων παρουσιάζεται στους Χάρτες 3.2.1. και 3.2.2. για τη Μεσσηνία και τη Λακωνία αντίστοιχα.



**Χάρτης 3.2.1.** Κατανομή του κινδύνου μόλυνσης των ξηρών σύκων από τον *Aspergillus* spp. στους συκεώνες της Μεσσηνίας με εφαρμογή της μεθόδου χωροταξικής παρεμβολής κατά Barnes.

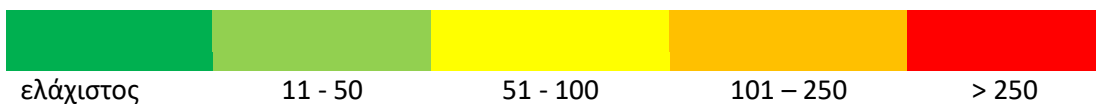
κλίμακα κατηγοριοποίησης συκεώνων με βάση τον κίνδυνο μόλυνσης των σύκων από τον *Aspergillus* spp.





**Χάρτης 3.2.2.** Κατανομή του κινδύνου μόλυνσης των ξηρών σύκων από τον *Aspergillus* spp. στους συκεώνες της Λακωνίας με εφαρμογή της μεθόδου χωροταξικής παρεμβολής κατά Barnes.

κλίμακα κατηγοριοποίησης συκεώνων με βάση τον κίνδυνο μόλυνσης των σύκων από τον *Aspergillus* spp.



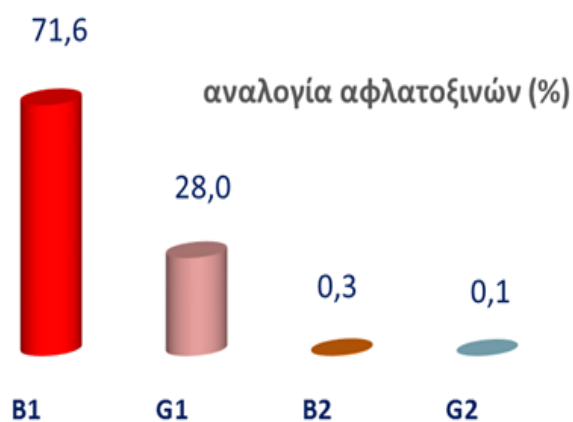
Εκχυλίσματα από το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας 44 στελεχών του *Aspergillus* spp. αναλύθηκαν και ως προς την αναλογία των τεσσάρων αφλατοξινών που παράγουν με τη χρήση χρωματογραφικής μεθόδου (LC-MS).

Από τα 44 στελέχη που μελετήθηκαν, 15 παράγουν μια αφλατοξίνη (9 την B<sub>1</sub> και 6 την G<sub>1</sub>), 24 παράγουν δύο (23 τις B<sub>1</sub>-G<sub>1</sub> και 1 τις B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>), 5 παράγουν τρεις (όλα τις B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>-G<sub>1</sub>) και 4 παράγουν και τις τέσσερις αφλατοξίνες (B<sub>1</sub>-G<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>-G<sub>2</sub>). Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αφλατοξινών στο υλικό της καλλιέργειας δίνονται στον Πίνακα 3.2.4.

**Πίνακας 3.2.4.** Αναλογία των αφλατοξινών B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub> που παράγουν τα 44 στελέχη του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν

Αφλατοξίνη	Στελέχη		Συγκέντρωση (ng μl <sup>-1</sup> )			Συνολική Αφλατοξίνη (%)
	αριθμός	%	ελάχιστο	μέγιστο	μέσος όρος	
B <sub>1</sub>	41	93,2	0,02	150,7	12,73	71,6
G <sub>1</sub>	37	84,1	0,04	54,1	5,51	28,0
B <sub>2</sub>	12	27,3	0,01	0,7	0,17	0,3
G <sub>2</sub>	6	13,6	0,05	0,2	0,10	0,1

Η αφλατοξίνη B<sub>1</sub> παράγεται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, σχεδόν τριπλάσιες από την G<sub>1</sub> που κυμαίνονται από 0,02 έως και 150 ng μl<sup>-1</sup>. Η G<sub>1</sub> παράγεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις που φτάνουν μέχρι και πάνω από 50 ng μl<sup>-1</sup>, ενώ οι B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub> παράγονται σε όλες τις περιπτώσεις σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συνολικά, τα ενδημικά στελέχη του *Aspergillus* spp. παράγουν κατά κυρίως την αφλατοξίνη B<sub>1</sub> (71,6 %) που είναι και η περισσότερο τοξική, σε μεγάλο ποσοστό την G<sub>1</sub> (28,0) που είναι η αμέσως επόμενη σε βαθμό τοξικότητας και τις άλλες δύο λιγότερο τοξικές αφλατοξίνες B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub> σε αμελητέα ποσοστά (Διάγραμμα 3.2.3).



**Διάγραμμα 3.2.3** Αναλογία παραγομένων αφλατοξινών που παράγουν τα 44 επιλεγμένα στελέχη των ενδημικών στελεχών του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν.



### **3.3. Προσαρμοστικότητα του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus spp.***

Για την αξιολόγηση της προσαρμοστικότητας των στελεχών - απομονώσεων του *Aspergillus spp.* μετρήθηκαν *in vitro* ο ρυθμός τη γραμμικής ανάπτυξης του μυκηλίου και η παραγωγή κονιδίων. Μελετήθηκαν 70 στελέχη με διαφορετικό επίπεδο παραγωγής αφλατοξινών προκειμένου να διερευνηθεί και η πιθανή συσχέτιση της προσαρμοστικότητας με την αφλατοξικογόνο δύναμη. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υλικά που επηρεάζουν διαφορετικά την ανάπτυξη του μύκητα και συγκεκριμένα τα PDA και YES.

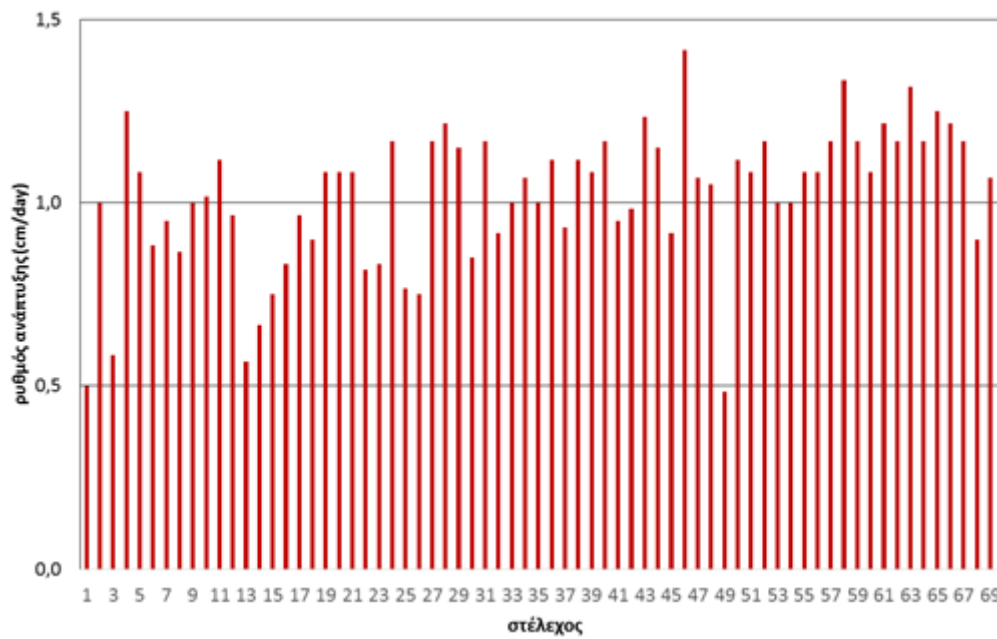
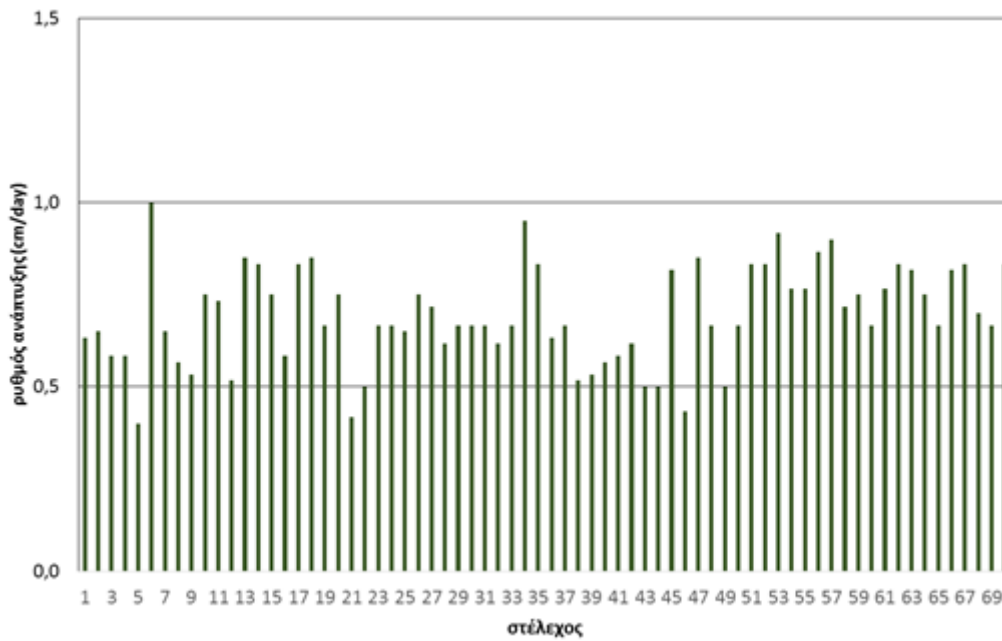
#### **Ρυθμός γραμμικής ανάπτυξης του μυκηλίου**

Τα 70 επιλεγμένα στελέχη του *Aspergillus spp.* εμβολιάσθηκαν σε τριβλία Petri στα δύο θρεπτικά υλικά (PDA και YES) και επωάσθηκαν στους 28°C. Η διάμετρος της αποικίας μετρήθηκε μετά από 2, 4 και 6 ημέρες. Ο ρυθμός ανάπτυξης στα μεσοδιαστήματα υπολογίστηκε από τη μεταβολή της διαμέτρου στη μονάδα του χρόνου σε cm ανά ημέρα (cm/day). Ταυτόχρονα υπολογίστηκε και ο συνολικός ρυθμός ανάπτυξης μετά από 6 ημέρες.

Οι ρυθμοί ανάπτυξης που υπολογίσθηκαν για τα θρεπτικά υλικά PDA και YES δίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.3.1. ενώ η κατανομή των συνολικών ρυθμών ανάπτυξης των στελεχών δίνονται στο Διάγραμμα 3.3.1.

**Πίνακας 3.3.1.** Διάμετρος αποικιών και ρυθμός γραμμικής ανάπτυξης των 70 στελεχών που μελετήθηκαν.

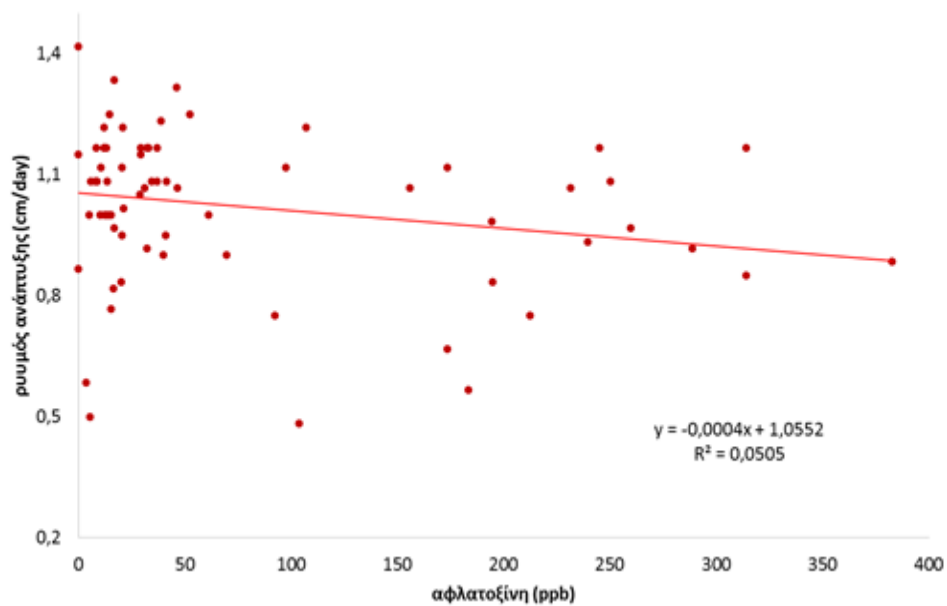
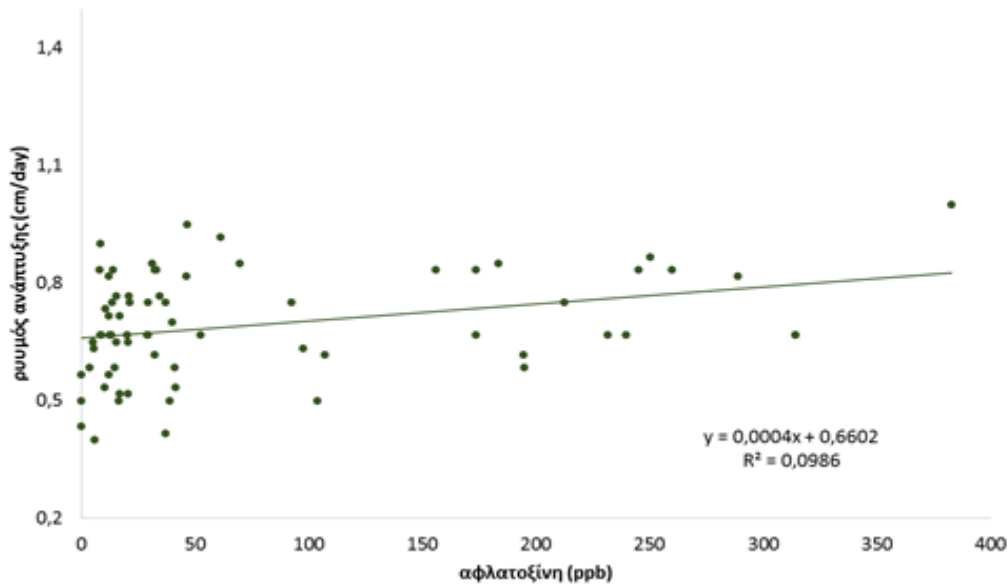
	χρόνος επώασης (ημέρες)						συνολικός ρυθμός cm/day
	2		4		6		
	διάμετρος cm	ρυθμός cm/day	διάμετρος cm	ρυθμός cm/day	διάμετρος cm	ρυθμός cm/day	
<b>PDA</b>							
ελάχιστο	0,5	0,25	1,9	0,30	2,4	0,10	0,40
μέγιστο	1,5	0,75	3,8	1,25	6,0	1,45	1,00
μέσος όρος	1,1	0,55	2,7	0,78	4,2	0,75	0,69
τυπική απόκλιση	0,2	0,12	0,5	0,24	0,8	0,28	0,13
<b>YES</b>							
ελάχιστο	0,1	0,05	1,9	0,70	2,9	0,40	0,48
μέγιστο	1,4	0,70	4,7	1,95	8,5	2,30	1,42
μέσος όρος	0,6	0,31	3,3	1,31	6,1	1,44	1,02
τυπική απόκλιση	0,4	0,20	0,6	0,24	1,1	0,43	0,19



**Διάγραμμα 3.3.1.** Ρυθμός ανάπτυξης *in vitro* μετά από 6 ημέρες ανάπτυξης του μυκηλίου σε θρεπτικό υλικό PDA (επάνω) και YES (κάτω) των 70 στελεχών του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ο ρυθμός ανάπτυξης διαφέρει μεταξύ των στελεχών αλλά και στα διαφορετικά υλικά. Γενικά ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών στο PDA σε σχέση με το YES είναι μεγαλύτερος τις πρώτες 2 ημέρες και μικρότερος μετά από 4 και 6 ημέρες. Όμως ο συνολικός ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγαλύτερος στο YES σε σχέση με το PDA.

Η συσχέτιση του συνολικού ρυθμού ανάπτυξης με την παραγωγή αφλατοξινών των 70 στελεχών στα θρεπτικά υλικά PDA και YES δίνονται στο Διάγραμμα 3.3.2. Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών και της αφλατοξικογόνου δύναμής τους σε κανένα από τα δύο θρεπτικά υλικά ( $R^2$  0,097 για το PDA και 0,050 για το YES).



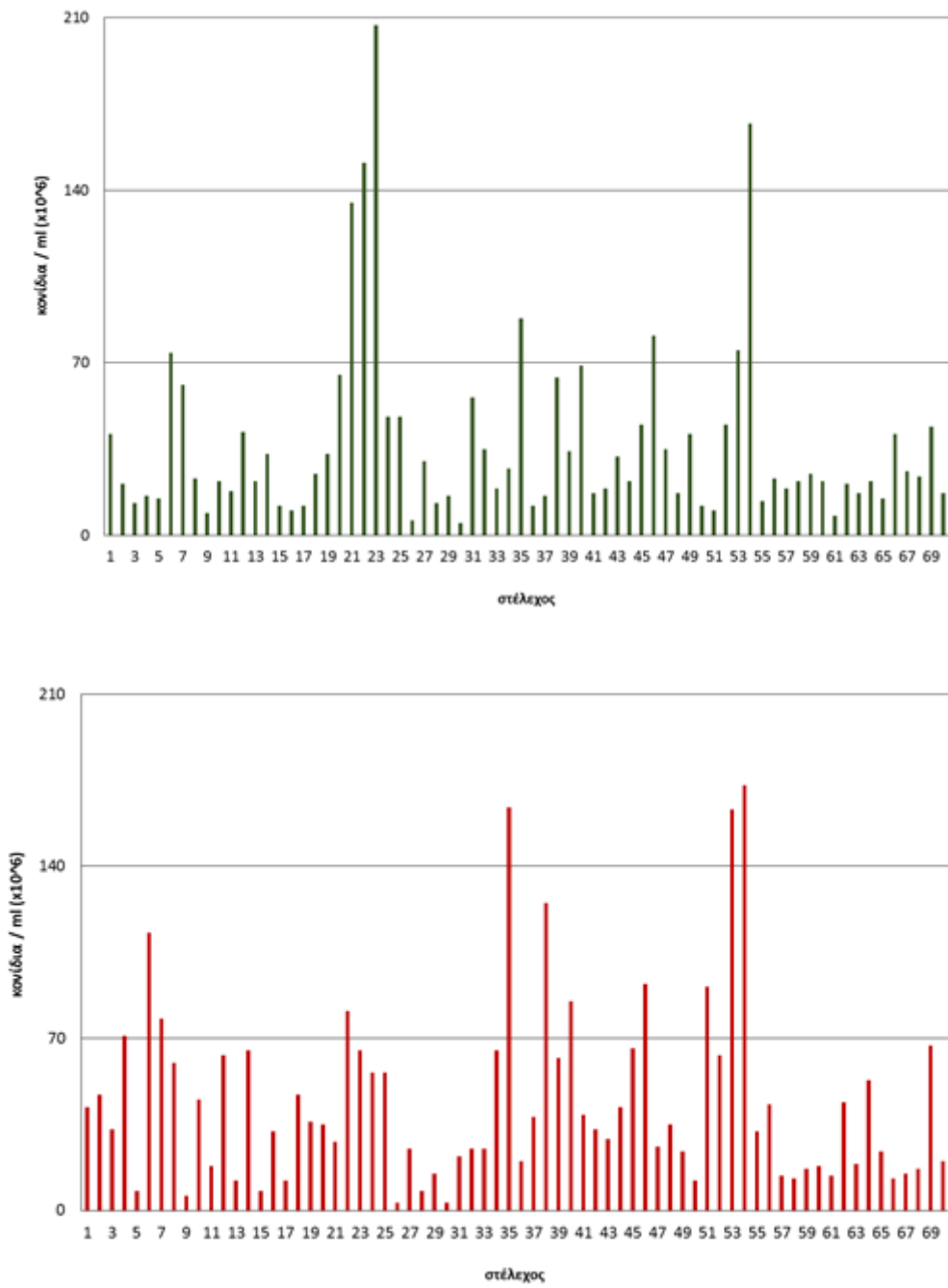
**Διάγραμμα 3.3.2.** Συσχέτιση του συνολικού ρυθμός ανάπτυξης του μυκηλίου μετά από 6 ημέρες σε θρεπτικό υλικό PDA (επάνω) και YES (κάτω) με το σύνολο των παραγομένων αφλατοξινών των 70 στελεχών του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν.

## Παραγωγή κονιδίων

Τα 70 επιλεγμένα στελέχη του *Aspergillus* spp. εμβολιάσθηκαν σε τριβλία Petri στα δύο θρεπτικά υλικά (PDA και YES) και επωάσθηκαν στους 28°C για 6 ημέρες. Δίσκος διαμέτρου ενός cm μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml απιονισμένο νερό και τα κονίδια αιωρήθηκαν στο νερό με ανάδευση για 30 sec σε αναταράκτη (vortex) στο μέγιστο της ταχύτητας. Όγκος αιωρήματος 5 ml μεταφέρθηκε σε αιματοκυτόμετρο (Petroff-Hausser) και με τη χρήση μικροσκοπίου υπολογίσθηκε η συγκέντρωση των κονιδίων ανά ml. Οι αριθμοί κονιδίων που υπολογίσθηκαν δίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.3.2. ενώ η παραγωγή κονιδίων ανά στέλεχος δίνονται στο Διάγραμμα 3.3.3.

**Πίνακας 3.3.2.** Αριθμός παραγομένων κονιδίων των 70 στελεχών του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν.

	Αριθμός κονιδίων (ανά ml) x 10 <sup>6</sup>	
	PDA	YES
ελάχιστο	5,0	3,0
μέγιστο	207,0	173,0
μέσος όρος	37,5	44,5
τυπική απόκλιση	37,5	37,2

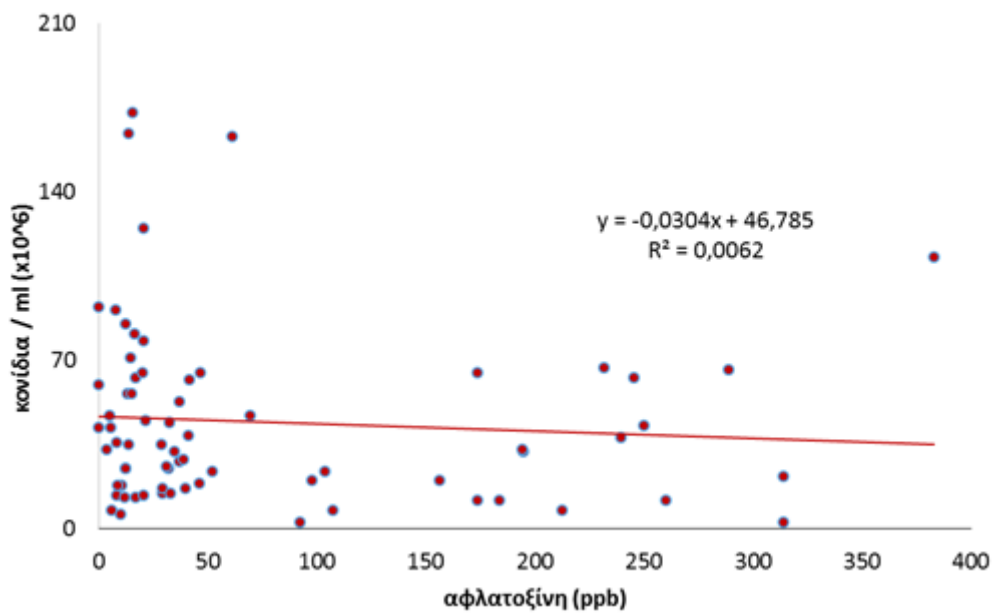
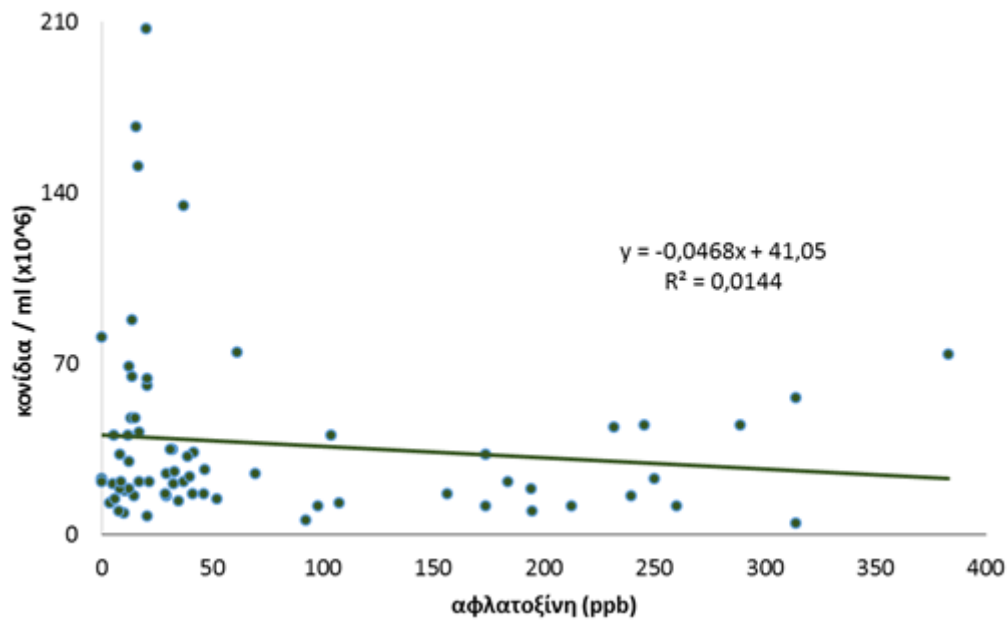


**Διάγραμμα 3.3.3.** Παραγωγή κωνιδίων μετά από 6 ημέρες ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό PDA (επάνω) και YES (κάτω) των 70 στελεχών του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ικανότητα παραγωγής των κονιδίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των στελεχών αλλά και στα διαφορετικά υλικά.

Η συσχέτιση του αριθμού των κονιδίων με την παραγωγή αφλατοξινών των 70 στελεχών για τα για τα θρεπτικά υλικά PDA και YES δίνονται στο Διάγραμμα 3.3.4. από όπου προκύπτει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κονιδιογένεσης και της αφλατοξικογόνου δύναμής τους σε κανένα από τα δύο θρεπτικά υλικά ( $R^2$  0,014 για το PDA και 0,006 για το YES αντίστοιχα).





**Διάγραμμα 3.3.4.** Συσχέτιση του του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων μετά από 6 ημέρες σε θρεπτικό υλικό PDA (επάνω) και YES (κάτω) με το σύνολο των παραγομένων αφλατοξινών των 70 στελεχών του *Aspergillus* spp. που μελετήθηκαν.

### 3.4. Επιδημιολογία του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus spp.*

Στο πλαίσιο της μελέτης της επιδημιολογίας του *Aspergillus spp.* μελετήθηκε η μόλυνση των σύκων από μύκητα πάνω στο δέντρο καθώς και μετά την πτώση τους στο έδαφος. Σύμφωνα με την επικρατούσα καλλιεργητική τεχνική στην περιοχή, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί και η μόλυνση των σύκων στα αλώνια κατά το στάδιο της ηλιοξήρανσής τους (Εικόνα 3.4.1.). Στο στάδιο αυτό, τα σύκα απλώνονται σε πλαστικά δίκτυα στο έδαφος και συχνά καλύπτονται με πλαστικά για την προστασία τους από δυσμενείς καιρικές συνθήκες.

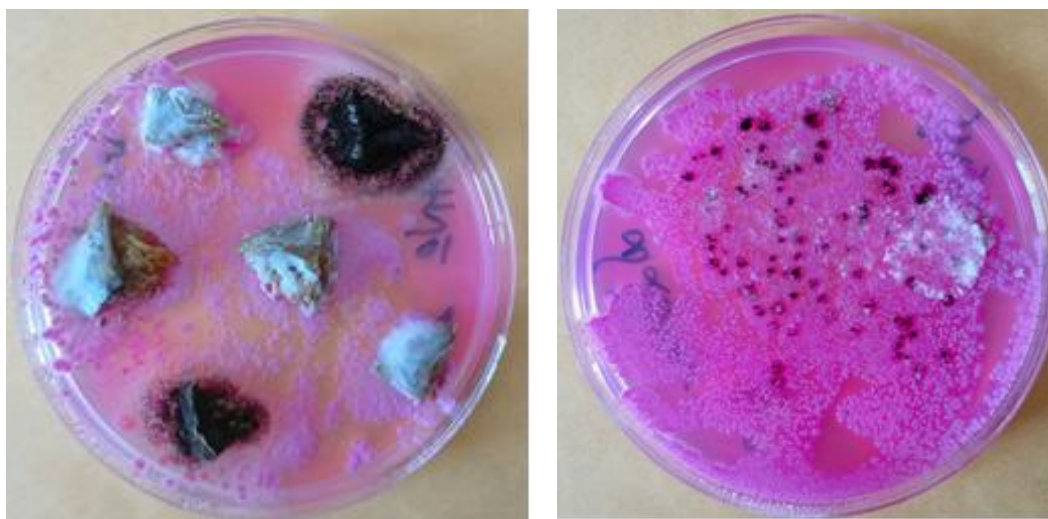


**Εικόνα 3.4.1.** Τεχνική της ξήρανσης των σύκων σε αλώνια στην περιοχή της Μεσσηνίας.

Για το σκοπό αυτό επελέγησαν 3 συκεώνες με μικρό (< 10 cfu/g) και 3 με μεγάλο (> 100 cfu/g) πληθυσμό *Aspergillus spp.* και συλλέχθηκαν σύκα πάνω από τα δένδρα και πεσμένα στο έδαφος. Ταυτόχρονα συλλέχθηκαν δείγματα εδάφους και σύκων στο τελικό στάδιο ξήρανσης από τα αλώνια συκεώνων με μικρό πληθυσμό

*Aspergillus* spp. στο έδαφος. Η συλλογή των σύκων έγινε στα μέσα Ιουλίου και μετά τα μέσα Αυγούστου του 2015.

Για τον έλεγχο της μόλυνσης των σύκων εφαρμόστηκαν δύο τεχνικές (Εικόνα 3.4.2.). Κατά την πρώτη, οι καρποί τεμαχίζονταν σε μικρά τεμάχια, εμβολιάζονταν σε τριβλία με θρεπτικό υλικό CRBA, επωάζονταν στους 25°C για 4-5 ημέρες και καταμετρούνταν οι αποικίες του *Aspergillus* spp. που αναπτύσσονταν ανά τεμάχιο σύκου. Η μέθοδος αυτή δείχνει κυρίως τον πληθυσμό του μύκητα που βρίσκεται στην επιφάνεια των σύκων. Κατά τη δεύτερη, 3 σύκα βάρους περίπου 40 g ομογενοποιούνταν με 400 ml απεσταγμένο νερό σε ομογενοποιητή στο μέγιστο της ταχύτητας για 15 sec, 0,5 ml του πολτού καθώς και η 10-1 αραιώσή του εμβολιάζονταν σε τριβλία με θρεπτικό υλικό, επωάζονταν στους 25°C για 4-5 ημέρες και καταμετρούνταν οι αποικίες του *Aspergillus* spp. που αναπτύσσονταν. Η μέθοδος αυτή δείχνει το συνολικό πληθυσμό του μύκητα τόσο στο εξωτερικό όσο και στο εσωτερικό του σύκου. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις ανά συκεώνα και με τους κατάλληλους υπολογισμούς υπολογίζονταν οι cfu *Aspergillus* spp. / σύκο.



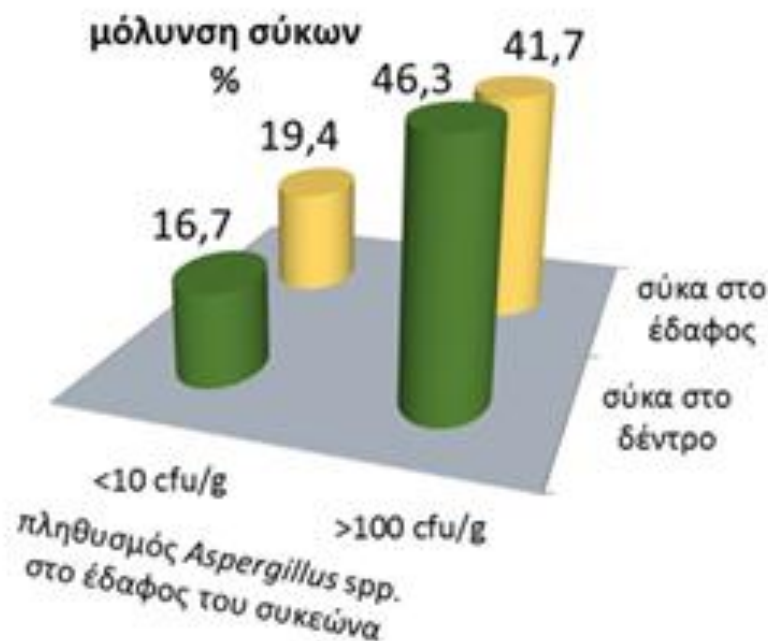
**Εικόνα 3.4.2.** Μέτρηση του πληθυσμού τους *Aspergillus* spp. στα σύκα με τη μέθοδο επώασης τεμαχίων του καρπού (αριστερά) και επώασης του πολτού ομογενοποιημένων καρπών (δεξιά). Οι μαύρες αποικίες δηλώνουν την παρουσία του μύκητα.

## Μόλυνση των σύκων πάνω στο δέντρο και το έδαφος

Η δειγματοληψία του Ιουλίου έδειξε πολύ μικρό ποσοστό μολυσμένων σύκων που συλλέχθηκαν πάνω από τα δέντρα. Συγκεκριμένα με τη μέθοδο των τεμαχίων των σύκων διαπιστώθηκε ότι, μόνο το 2,8% των σύκων στα δέντρα των συκεώνων με χαμηλό πληθυσμό *Aspergillus* spp. ήταν μολυσμένα. Το ποσοστό αυτό αυξανόταν σε 8,3% στους συκεώνες με υψηλό πληθυσμό *Aspergillus* spp. στο έδαφος. Αντίθετα, η μέτρηση των cfu στον πολτό των σύκων έδειξε σχεδόν μηδενικά επίπεδα μόλυνσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στο στάδιο ανάπτυξης που βρίσκονται τα σύκα στα μέσα του Ιουλίου στην περιοχή της Μεσσηνίας η μόλυνσή τους είναι πολύ μικρή και σχεδόν αποκλειστικά επιφανειακή. Την περίοδο αυτή δεν υπήρχε ικανοποιητικός αριθμός και κυρίως εμπορικά αποδεκτών σύκων στο έδαφος και κατά συνέπεια δεν έγινε συλλογή. Η δεύτερη συλλογή σύκων πραγματοποιήθηκε μετά τα μέσα Αυγούστου 2015, που συμπίπτει με την περίοδο μεταξύ του 1ου και του 2ου «χεριού» συγκομιδής των σύκων στην περιοχή της Μεσσηνίας.

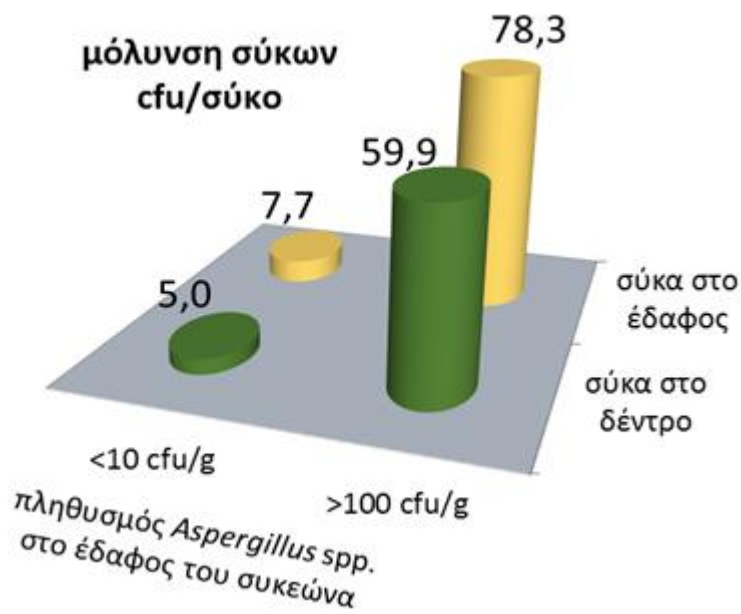
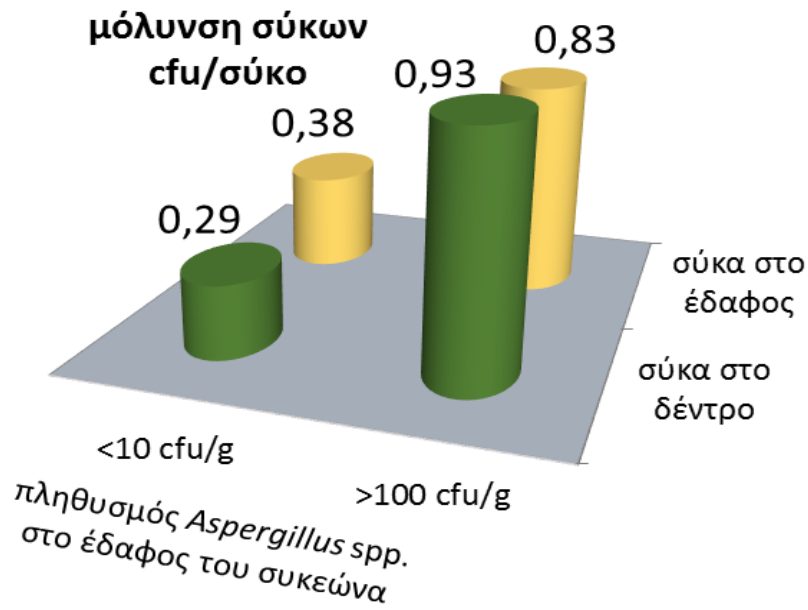
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν η μέτρηση των cfu γινόταν με τεμάχια η μόλυνση των σύκων πάνω στα δέντρα ήταν περίπου 2,5 φορές μεγαλύτερη (46,3%) στους συκεώνες με μεγάλο πληθυσμό *Aspergillus* spp. στο έδαφος σε σχέση με τους συκεώνες με μικρό πληθυσμό (16,7%). Παρόμοια και στην περίπτωση των σύκων που συλλέχθηκαν από το έδαφος όπου το ποσοστό των μολυσμένων σύκων ήταν σχεδόν διπλάσιο στους συκεώνες με μεγάλο πληθυσμό σε σχέση με αυτού με μικρό πληθυσμό του μύκητα (19,4 και 41,7% αντίστοιχα). Τα ποσοστά των σύκων που βρέθηκαν μολυσμένα στο δέντρο και στο έδαφος δίνονται στο Διάγραμμα 3.4.1.

---



**Διάγραμμα 3.4.1.** Μόλυνση των σύκων στο δέντρο και στο έδαφος σε συκεώνες με χαμηλό και υψηλό πληθυσμό του *Aspergillus* spp. ως % του συνόλου των σύκων που εξετάστηκαν.

Η μέτρηση των cfu με τεμάχια έδειξε ότι η μόλυνση των σύκων πάνω στα δέντρα ήταν περίπου τριπλάσια (0,93 cfu/σύκο) στους συκεώνες με μεγάλο πληθυσμό *Aspergillus* spp. στο έδαφος σε σχέση με τους συκεώνες με μικρό πληθυσμό (0,29 cfu/σύκο). Παρόμοιες τιμές παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση των σύκων που συλλέχθηκαν από το έδαφος (0,83 και 0,38 cfu/σύκο αντίστοιχα). Όταν η μέτρηση γινόταν στον πολτό των ομογενοποιημένων σύκων, οι τιμές των cfu αυξάνονταν δραματικά. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν 59,9 cfu/σύκο στους συκεώνες με μεγάλο πληθυσμό *Aspergillus* spp. στο έδαφος, σχεδόν δεκαπλάσιες σε σχέση με τους συκεώνες με μικρό πληθυσμό (5,0 cfu/σύκο). Παρόμοια, στα σύκα που συλλέχθηκαν από το έδαφος μετρήθηκαν τιμές 78,9 και 7,7 cfu/σύκο αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μέτρησης των cfu με τεμάχια και πολτό δίνονται στο Διάγραμμα 3.4.2.



**Διάγραμμα 3.4.2.** Μόλυνση των σύκων στο δένδρο και στο έδαφος σε συκεώνες με χαμηλό και υψηλό πληθυσμό του *Aspergillus* spp. σε cfu μετρημένων με τεμάχια σύκων (επάνω) και πολτό (κάτω) αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μόλυνση των σύκων τόσο στα δέντρα όσο και στο έδαφος είναι ανάλογη του πληθυσμού του *Aspergillus spp.* στο έδαφος του συκεώνα. Μάλιστα όταν η μέτρηση γίνεται στον πολτό των σύκων, κάτι το οποίο δίνει πιο ακριβείς μετρήσεις του αριθμού των cfu, η μόλυνση των σύκων τόσο στο δέντρο όσο και στο έδαφος φαίνεται να γραμμική. Συκεώνες με σχεδόν δεκαπλάσιο πληθυσμό του μύκητα στο έδαφος δίνουν περίπου δεκαπλάσιο αριθμό μολυσμένων σύκων τόσο στο δέντρο όσο και στο έδαφος. Ταυτόχρονα φαίνεται ότι η μόλυνση των σύκων γίνεται κυρίως πάνω στα δέντρα αν και το συνολικό μικροβιακό φορτίο τους φαίνεται να αυξάνεται κατά περίπου 50% μετά την πτώση τους στο έδαφος.

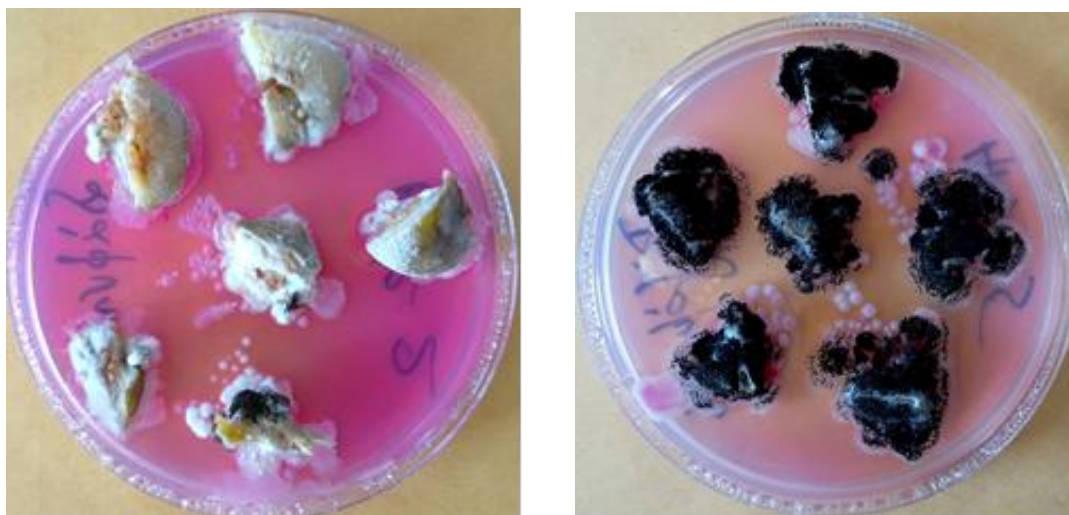
### Μόλυνση των σύκων στο αλώνι ξήρανσης

Ο χώρος ξήρανσης των σύκων στο συκεώνα, μελετήθηκε ως προς τον πληθυσμό του *Aspergillus spp.* στο έδαφος. Σε 3 συκεώνες με χαμηλό πληθυσμό του μύκητα (< 10 cfu/g εδάφους) διαπιστώθηκε ότι το έδαφος στα αντίστοιχα αλώνια είχαν δεκαπλάσιο πληθυσμό (Διάγραμμα 3.4.3.)



**Διάγραμμα 3.4.3.** Πληθυσμός του *Aspergillus spp.* σε cfu/g εδάφους στο συκεώνα και το αντίστοιχο αλώνι ξήρανσης των σύκων.

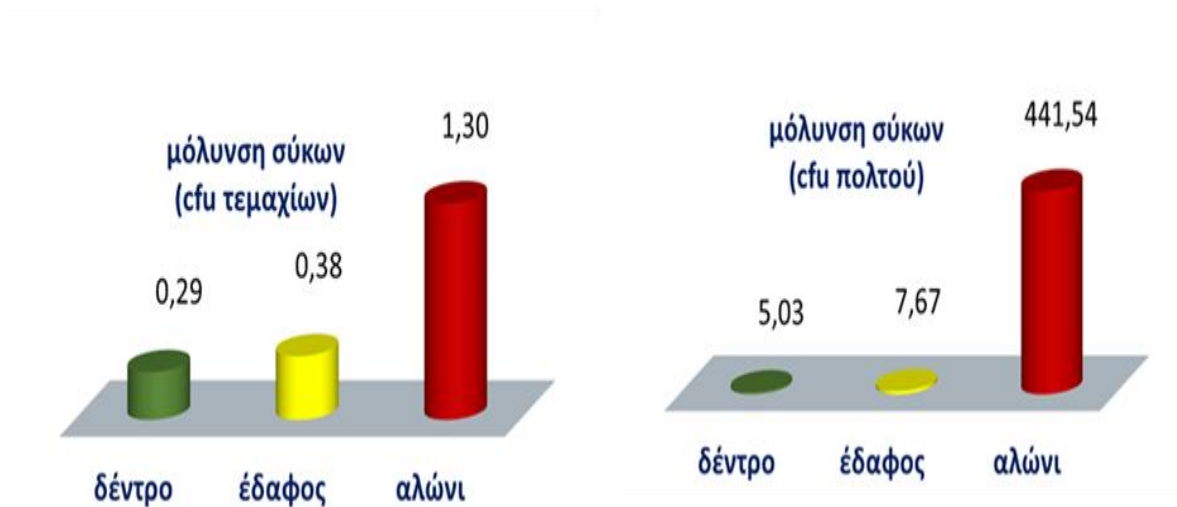
Η μόλυνση των σύκων με βάση τις cfu μετρούμενες με τη μέθοδο των τεμαχίων, ήταν 4 έως 5 φορές μεγαλύτερη στο αλώνι σε σχέση με αυτή στο δέντρο του αντίστοιχου συκεώνα (Εικόνα 3.4.3.).



**Εικόνα 3.4.3.** Μέτρηση του πληθυσμού τους *Aspergillus* spp. στα σύκα από τα δέντρα (αριστερά) και τα αλώνια (δεξιά) με τη μέθοδο επώασης τεμαχίων του καρπού. Η αυξημένη μόλυνση των σύκων στο αλώνι είναι εμφανής.

Η μέτρηση στον πολτό έδειξε ότι τα σύκα στο αλώνι είναι περίπου 88 φορές πιο επιβαρυνμένα σε σχέση με αυτά στο δέντρο του συκεώνα. Η μόλυνση των σύκων στο δέντρο, το έδαφος και το αλώνι μετρημένων με τη μέθοδο των τεμαχίων και του πολτού σύκων δίνονται στο Διάγραμμα 3.4.4.





**Διάγραμμα 3.4.4.** Πληθυσμός του *Aspergillus* spp. σε cfu/σύκο από το δέντρο, το έδαφος και το αλώνι ξήρανσης συκεώνων με χαμηλό πληθυσμό του μύκητα μετρημένων με τη μέθοδο των τεμαχίων (αριστερά) και του πολτού σύκων (δεξιά) αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης της επιδημιολογίας του *Aspergillus* spp. προέκυψε ότι η μόλυνση των σύκων γίνεται κυρίως στο στάδιο ωρίμανσης των σύκων, σε μικρό βαθμό πάνω στο δέντρο και στο έδαφος και σε μεγάλο βαθμό στο αλώνι ξήρανσης, όπου τα σύκα βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος για μια περίοδο από 4 έως 8 ημέρες μέχρι να ολοκληρωθεί η ξήρανσή τους. Το έδαφος στα αλώνια είναι ιδιαίτερα επιβαρυσμένο με πληθυσμούς του *Aspergillus* spp. λόγω της συνεχούς χρήσης τους, και τα σύκα παραμένουν σε επαφή με το χώμα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Είναι προφανές ότι η αποφυγή της επαφής των σύκων με το έδαφος στα αλώνια θα συμβάλει στη σημαντική μείωση της μόλυνσής τους από τον *Aspergillus* spp. και κατά συνέπεια στην επιβάρυνση του τελικού προϊόντος με αφλατοξίνες.

## Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η μελέτη έδειξε ότι:

- Υπάρχει ισχυρή χωροταξική ανισοκατανομή του ενδημικού πληθυσμού του *Aspergillus* spp. στους συκεώνες της Μεσσηνίας και της Λακωνίας και άρα διαφορετικά επίπεδα κινδύνου μόλυνσης των σύκων από το μύκητα.
- Ακόμα και μέσα στον ίδιο συκεώνα μπορεί να υπάρχουν περιοχές με αυξημένους πληθυσμούς του *Aspergillus* spp. (φωλιές) που τροφοδοτούν με μολύσματα και τον υπόλοιπο συκεώνα.
- Τα ενδημικά στελέχη του *Aspergillus* spp. είναι γενικά χαμηλής αφλατοξικογόνου δύναμης.
- Τα ενδημικά στελέχη παράγουν κυρίως την περισσότερη τοξική αφλατοξίνη B<sub>1</sub>.
- Υπάρχουν σε μικρό ποσοστό και μη αφλατοξικογόνα στελέχη.
- Ο ρυθμός ανάπτυξης και η ικανότητα παραγωγής κονιδίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των στελεχών.
- Η μόλυνση των σύκων τόσο στα δέντρα όσο και στο έδαφος είναι ανάλογη του πληθυσμού του *Aspergillus* spp. στο έδαφος του συκεώνα.
- Η μόλυνση των σύκων γίνεται πάνω στα δέντρα αν και το συνολικό μικροβιακό φορτίο τους φαίνεται να αυξάνεται κατά περίπου 50% μετά την πτώση τους στο έδαφος.
- Η μόλυνση των σύκων γίνεται κυρίως στο στάδιο ωρίμανσης.
- Η μόλυνση των σύκων γίνεται σε μεγάλο βαθμό και στο αλώνι ξήρανσης όπου το έδαφος είναι ιδιαίτερα επιβαρυσμένο με πληθυσμούς του *Aspergillus* spp. λόγω της συνεχούς χρήσης τους, και τα σύκα παραμένουν σε επαφή με το χώμα για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αντιμετώπιση του προβλήματος των αφλατοξινών στα ξηρά σύκα θα πρέπει να στηριχθεί στους άξονες:

- Εκτίμηση του κινδύνου μόλυνσης των σύκων με προσδιορισμό του πληθυσμού του μύκητα *Aspergillus* spp. σε κάθε συκεώνα χωριστά.
- Αποφυγή της επαφής των σύκων με το έδαφος στα αλώνια.
- Ξήρανση των σύκων σε τραπέζια σε απόσταση από το έδαφος.
- Αξιοποίηση της ύπαρξης των μη αφλατοξικογόνων ενδημικών στελεχών του μύκητα *Aspergillus* spp. για την ανάπτυξη βιολογικής μεθόδου καταπολέμησης.

## Παραρτημα

**Πίνακας 2.1.** Περιοχή, γεωγραφικές συντεταγμένες και υψόμετρο των συκεώνων που μελετήθηκαν στη Νότια Πελοπόννησο (Μεσσηνία και Λακωνία)

α/α	περιοχή	γεωγρ. μήκος (North)	γεωγρ. πλάτος (East)	υψόμετρο (m)
<b>Μεσσηνία</b>				
1	Φίλια	37°15'58	22°00'04	130
2	Αρσινόη	37°09'49	21°55'32	339
3	Μαυρομμάτι	37°10'54	21°55'01	401
4	Καλογερόρραχη	37°08'26	21°55'35	248
5	Ελληνοκλησιά	37°08'28	21°54'47	279
6	Ανδρούσα	37°07'02	21°56'09	162
7	Κορομηλιά	37°09'49	21°50'47	519
8	Άνθεια	37°07'00	22°02'20	52
9	Καρποφόρα	36°59'48	21°55'03	57
10	Νερόμυλο	37°00'17	21°53'33	193
11	Βλαχόπουλο	37°03'19	21°47'01	478
12	Πανιπέρι 1	36°58'48	21°51'46	322
13	Πανιπέρι 2	36°58'50	21°52'23	213
14	Πανιπέρι 3	36°59'21	21°53'34	155
15	Πεταλίδι	36°55'58	21°55'54	51
16	Αχλαδοχώρι	36°55'57	21°55'09	165
17	Χράνοι	36°55'19	21°55'37	54
18	Λογγά	36°52'09	21°53'19	255
19	Δάφνη	37°00'47	21°54'51	143
20	Δάρα	37°01'47	21°53'37	228
21	Νεοχώριο	37°01'53	21°54'54	163
22	Στρέφι	37°02'43	21°54'22	224
23	Αβραμιού 1	37°02'18	21°54'48	196
24	Αβραμιού 2	37°02'12	21°56'17	102
25	Λευκοχώρα 1	37°03'05	21°56'23	148
26	Λευκοχώρα 2	37°02'32	21°55'30	138
27	Πελεκανάδα	37°03'41	21°50'26	335
28	Αριστομένης	37°04'39	21°50'34	327
29	Μηλιώτη	37°04'36	21°49'36	387
30	Τρίκορφο	37°08'23	21°53'18	355
31	Δράινα 1	37°08'02	21°51'40	517
32	Δράινα 2	37°06'35	21°51'58	344
33	Στέρνα 1	37°05'17	21°52'46	283
34	Στέρνα 2	37°06'18	21°52'13	339
35	Μάνεση 1	37°05'07	21°53'06	236
36	Μάνεση 2	37°05'24	21°54'07	207
<b>Λακωνία</b>				
37	Μοάσι	36°51'20	32°49'15	297
38	Πάκια	36°47'44	22°51'19	141
39	Μεταμόρφωση	36°47'50	22°54'08	106
40	Φοινίκι	36°44'28	22°53'43	126
41	Ασωπός	36°44'23	22°51'43	101
42	Συκέα	36°45'56	22°55'07	124
43	Παπαδιάνικα	36°42'30	22°50'58	62
44	Μονεμβασιά	36°44'22	23°00'23	81
45	Γύθειο	36°43'40	22°32'23	33

## Μέθοδος Προσδιορισμού Αφλατοξινών με LC-MS

Μετά από δοκιμές, ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στο εκχύλισμα των ξηρών σύκων με τη μέθοδο LC-MS με την τεχνική της παραγωγοποίησης πριν τη στήλη (post column derivatization) σταθεροποιήθηκε ως εξής:

Παραγωγοποίηση αφλατοξινών:

- Διάλυμα J<sub>2</sub> (καθαρότητας 99,8%) συγκέντρωσης 100 µg/ml σε μεθανόλη 5 % απαερωμένο για 10 min µς N<sub>2</sub>.
- Συνθήκες αντιδραστήρα: όγκος 1,4 ml, θερμοκρασία 90 °C, ταχύτητα ροής 0,3 ml/min.

Συνθήκες χρωματογραφίας:

- κινητή φάση: διάλυμα νερό:μεθανόλη:ακετονιτρίλιο, 56:22:22, απαερωμένο σε λουτρό υπερήχων για 15 min.
- Στήλη: ανάστροφης φάσης Mycotox<sup>TM</sup> C18, 4,6x250 mm, 5 µm, με προστήλη 4,6x50 mm, 5 µm.
- Θερμοκρασία στήλης και προστήλης: 42°C.
- Μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής λ<sub>ex</sub>=365 nm, και λ<sub>em</sub>=430 nm αντίστοιχα.
- Ταχύτητα ροής: 1 ml/min.
- Πίεση: 130 - 135 Bar.
- Όγκος δείγματος: 10 µl.

Το όριο ανίχνευσης για τις τέσσερεις αφλατοξίνες B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> προσδιορίσθηκε στα 0,1 ng/ml.

Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίσθηκε από 80 έως 70 % για τις χαμηλές και τις υψηλές συγκεντρώσεις αντίστοιχα.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βασιλακάκης, Μ., 2007 Γενική και ειδική δένδροκομία. Εκδ. Γαρτάλακα, Θεσσαλονίκη.

Ζερφειρίδης, Γ.Ρ., 1982. Μυκοτοξίνες. Εκδ. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκης, σελ. 1-54

Ποντίκης, Α.Κ., 1996. Ειδική δένδροκομία Εκδ. Σταμούλης, Τόμος 2<sup>ος</sup> Αθήνα.

Barbosa-Cánovas, G.V. & Vega-Mercado, H., 1996. Other methods of dehydration of foods and packaging aspects. In: Dehydration of Foods (edited by G.V. Barbosa-Cánovas & H. Vega-Mercado). pp. 289–320. New York: Chapman & Hall.

Bouraout, M., Richard, P., & Durance, T., 1994. Microwave and convective drying of potato slices. *J. Food Process Engineering*, 17: 353-363.

Davis, N.D. and Diener, U.L., 1970. Environmental factors affecting the production of aflatoxin. Washington DC, US Gort Printing Office. Pp.43-47.

Doster M, Michailides T, Doyle J, Cotty P, Morgan D and Boeckler L, 2002. Aflatoxin control in figs: Development of resistant cultivars, identification of contaminated fruit and biocontrol. *Mycopathologia* 155: 45.

Doster M, Michailides T, Cotty P, Doyle J, Morgan D, Boeckler L and Felts D, 2004. Aflatoxin control in figs: Biocontrol and development of resistant cultivars. *Mycopathologia* 157: 460.

Doster MA, Michailides TJ, Doster L and Cotty PJ, 2008. Biocontrol of aflatoxins in figs. *Acta Horticulturae* 798: 223-226.

Feng, H., & Tang, J., 1998. Microwave finish drying of diced apples in a spouted bed. *J. Food Science*, 63: 679-683.

Hardenburg, R.E., Watada, A.E. & Wang, C.Y., 1986. Fig. In: The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Nursery Stocks. Agriculture Handbook Nr. 66. Pp. 40. Washington: US Government Printing Office.

Katathanos, V.T., Anglea, S.A., Karel, M., 1996. Structure collapse of plant materials during freeze-drying. *J. Thermal Analysis*, 46:1541-1551.

Okos, M. R., Narsimhan, G., Singh, R. K., & Witnauer, A. C., 1992. Food dehydration. In D. R. Heldman & D. B. Lund (Eds.), *Handbook of Food Engineering*. New York: Marcel Dekker.

Piga, A., Pinna, I., Özer, K., Agabbio, M., & Aksoy, U., 2004. Hot air dehydration of figs (*Ficus carica* L.): drying kinetics and quality loss. *J. Food Science and Technology*, 39: 793–799.

Ratti, C., 2001. Hot air and freeze-drying of high values foods: a review. *J. Food Engineering* 49: 311-319.

Xanthopoulos, G., Lambrinos, Gr. and Manolopoulou, H., 2007. Evaluation of thin-layer models for mushroom drying. *Drying Technology*, 9:1471-1481.

Xanthopoulos, G., Yanniotis, S., Lambrinos, Gr., 2009. Water diffusivity and drying kinetics of air drying of figs. *Drying Technology*, 27:502-512.

Yongsawatdigul, J., & Gunasekaran, S., 1996. Microwave-vacuum drying of cranberries: Part II. Quality evaluation. *J. Food Processing and Preservation*, 20: 145-156.

<http://ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>

[http://chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_aflatoxin.htm](http://chem.uoa.gr/chemicals/chem_aflatoxin.htm)