

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ : ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Δυνητική Ικανότητα Παραγωγής Μυκοτοξινών από Μύκητες που  
Απομονώθηκαν από Καλαμπόκι (Pop Corn) και Αραβοσιτάλευρο**

**Ευαγγελία Παναγιωτάκη**

**Βόλος 2015**

**Δυνητική Ικανότητα Παραγωγής Μυκοτοξινών από Μύκητες που  
Απομονώθηκαν από Καλαμπόκι (Pop Corn) και Αραβοσιτάλευρο**

**Ευαγγελία Παναγιωτάκη**

**Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής,**

**Φυτοπαθολογία – Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής**

**Νικόλαος Τσιρόπουλος, Καθηγητής,**

**Χημεία, Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών Ουσιών**

**Περσεφόνη Γιαννούλη, Επίκουρος Καθηγήτρια,**

**Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Τροφίμων Φυτικής Προέλευσης**

Αφιερώνεται.....

στη Μνήμη των Πολύαγαπημένων μου Γονιών  
για την Ανεκτίμητη Προσφορά τους

στο Σύντροφό μου και στα Παιδιά μου  
που Ολόθερμα και με Αμέριστη  
Κατανόηση Στήριξαν την προσπάθειά μου

Copyright © Ευαγγελία Παναγιωτάκη, 2015

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγηση του Επίκουρου Καθηγητή κ. Ευάγγελου Βέλλιου τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη βοήθεια του κατά τη διεξαγωγή της μελέτης, την καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη που έδειξε απέναντί μου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, το χρόνο που αφιέρωσε για την κατάσταση της πειραματικής διαδικασίας και για τη διόρθωση της παρούσας διατριβής. Ο Καθηγητής κ. Νικόλαος Τσιρόπουλος και η Επίκουρος Καθηγήτρια κα Περσεφόνη Γιαννούλη αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές τους καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσαν προκειμένου να διορθώσουν τη διατριβή μου. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Τσιρόπουλο ο οποίος διέθεσε απαραίτητο εξοπλισμό για τη διεξαγωγή μέρους των πειραμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το φίλο μου Σάκη για την υποστήριξη του, τις γνώσεις που μου μετέφερε, το χρόνο που αφιέρωσε. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στην κα Μαρία Καπώνη, στον κ. Μιχαήλ Χατζηδημόπουλο, στην κα Πασχαλινή Κασσαβέτη και στον κ. Εμμανουήλ Μαλανδράκη για τις χρήσιμες υποδείξεις τους. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις αδελφικές μου φίλες και όχι μόνο, Νίκη και Αγλαΐα, καθώς και στον αδελφό μου Μίλτο για την πολύτιμη υποστήριξή τους κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ θερμά το σύντροφό μου Ηλία για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για την αμέριστη κατανόηση και υπομονή του. Επίσης ένα μεγάλο και θερμό ευχαριστώ στα παιδιά μου Βιργινία, Κωνσταντίνο και Στέφανο – Μιχαήλ για την απέραντη και δυσανάλογη των χρόνων τους, κατανόηση που έδειξαν.

## Περίληψη

Τα δημητριακά βρίσκονται στη βάση της διατροφικής πυραμίδας και αποτελούν πηγή ενέργειας και πρωτεϊνών για τον άνθρωπο. Στην ομάδα αυτή των τροφίμων πολλές φορές απαντώνται βιώσιμα σπόρια μυκήτων. Τα σπόρια αυτά μολύνουν τα δημητριακά κατά το στάδιο της καλλιεργητικής περιόδου ή κατά το στάδιο της ξήρανσης, αποθήκευσης, διακίνησής τους σε μεγάλες αποστάσεις και επεξεργασίας. Σημαντικότερη της παρουσίας μυκήτων στα δημητριακά είναι η επιμόλυνση αυτών με μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων. Πρόκειται για ουσίες πολύ τοξικές και επικίνδυνες κάποιες δε από αυτές έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινογόνες ουσίες. Η κατανάλωση τροφίμων επιμολυσμένων με μυκοτοξίνες εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση του τυχόν υπάρχοντος μικροβιακού φορτίου τροφίμων με βάση το καλαμπόκι και συγκεκριμένα pop corn και αραβοσιτάλευρο. Επίσης ο προσδιορισμός της δυνητικής ικανότητας παραγωγής μυκοτοξινών από τους μύκητες που πιθανόν θα ανιχνεύονταν σ' αυτά τα τρόφιμα.

Ελεγχθήκαν επτά εμπορικά δείγματα κόκκων pop corn και δύο εμπορικά δείγματα αραβοσιτάλευρου. Σ' όλα τα δείγματα κόκκων pop corn ανιχνεύθηκαν βιώσιμα σπόρια μυκήτων των γενών *Aspergillus* και *Fusarium*. Το ποσοστό μόλυνσης των δειγμάτων κυμαίνονταν από 11% έως και 27%. Στα δύο δείγματα αραβοσιτάλευρου ανιχνεύθηκαν βιώσιμα σπόρια των γενών *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* ενώ το γένος *Fusarium* ανιχνεύθηκε και στην τάξη  $10^2$  CFU/g.

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* που απομονώθηκαν κατατάχθηκαν σε τρία επιμέρους sections *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati* και *Aspergillus* section *Nigri*. Στη συνέχεια τα στελέχη του κάθε section ελέγχθηκαν για τη δυνητική παραγωγή αφλατοξινών ή ωχρατοξίνης A. Οι μύκητες του γένους *Penicillium* ελέγχθηκαν για τη δυνητική παραγωγή κιτρινίνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των μυκήτων στο θρεπτικό μέσο Coconut Cream Agar υπό καθορισμένες συνθήκες και στη συνέχεια έκθεση της καλλιέργειας του μύκητα σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 365 nm για εμφάνιση ή όχι φθορισμού γύρω από την καλλιέργεια που υποδηλώνει την παραγωγή τοξίνης.

Για την κατάταξή των μυκήτων του γένους *Fusarium* που ανιχνεύθηκαν σε επίπεδο είδους χρησιμοποιήθηκαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εξειδικευμένοι εκκινητές. Επίσης οι παραπάνω μύκητες ελέγχθηκαν για τη δυνητική

παραγωγή φουμονισίνης μέσω της αλυσίδωτης αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών που στοχεύουν στο *fum1* γονίδιο που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης.

Κανένα από τα στελέχη μυκήτων του *Aspergillus* section *Flavi* και *Aspergillus* section *Nigri* που ελεγχθήκαν δε βρέθηκε ότι μπορεί να παράγει αφλατοξίνες ή ωχρατοξίνη Α. Από την άλλη πλευρά πέντε στελέχη μυκήτων του *Aspergillus* section *Circumdati* βρέθηκε ότι μπορούν να παράγουν ωχρατοξίνη Α. Επίσης, όλα πλην ενός από τα στελέχη του γένους *Fusarium* που ελέγχθηκαν βρέθηκε ότι περιέχουν στο γονιδιώμά τους το γονίδιο που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης.

Η παρούσα μελέτη ήταν μια πρώτη προσέγγιση για τα ελληνικά δεδομένα που αποσκοπούσε στην ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων σε δύο ομάδες τροφίμων και της εκτίμησης της δυνητικής ικανότητας παραγωγής μυκοτοξινών από αυτούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι τα προϊόντα αυτά διατροφής φέρουν μικροβιακό φορτίο από μυκοτοξικογόνους μύκητες. Επιπλέον οι μύκητες που ανιχνεύθηκαν με βάση τη διερεύνηση που έγινε μπορούν δυνητικά να παράγουν ωχρατοξίνη Α και φουμονισίνες, ενώ δεν μπορούν δυνητικά να παράγουν αφλατοξίνες και κιτρινίνη. Η ανίχνευση της δυνητικής ή μη, παραγωγής τοξινών μπορεί να οδηγήσει σε υποθέσεις για την επιμόλυνση ή μη, των ελεγχθέντων δειγμάτων με κάποια από τις παραπάνω τοξίνες. Εντούτοις απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν αυτές οι υποθέσεις.

## Summary

Cereals are considered to be the base of the food chain as well as the source of energy and proteins for the human body. In this kind of food are usually found spores of fungi which have the ability to germinate. These spores infect the cereals in the field or at the stage of drying, storing, transportation through long distances or while in treatment. The presence of fungi in cereals is usually found in the form of mycotoxins which are fungal secondary metabolites. These substances are quite dangerous and even toxic while some have been reported to be carcinogenic. The health of consumers is at risk when it comes to consumption of food contaminated by mycotoxins.

This project aims to detect possible presence of fungi at food and especially at maize products such as pop corn and maize flour. Moreover to determinate the mycotoxin-producing ability of the isolated strains of this kind of food.

Seven samples of pop corn kernels and two samples of maize flour were tested. Through all of the pop corn samples were detected fungi of genes *Aspergillus* and *Fusarium* while the infection percentage ranged from 11% to 27%. Considering the two samples of maize flour fungi of genes *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* were detected whereas the gene *Fusarium* was detected even in the class  $10^2$  CFU/g.

Fungi of the gene *Aspergillus* which were isolated were classified in three sections, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati* and *Aspergillus* section *Nigri*. Furthermore the isolated strains of these sections were tested for the mycotoxin-producing ability of aflatoxins or ochratoxin A. Moreover the isolated strains of gene *Penicillium* were tested for the mycotoxin-producing ability of citrin. All these strains were grown in the selected media Coconut Cream Agar under special conditions and afterwards the cultures of strains were exposed under long wavelength ultraviolet  $\lambda$  (365 nm). This aimed to confirm the presence or not of fluorescence around the culture that indicates the production of toxin.

Polymerase Chain Reaction (PCR) was used in order to classify the isolated strains of *Fusarium* gene with especial primers. Furthermore, especial primers were also used to detect the presence of *fum1* gene at the genome of these strains which was involved at the biosynthesis of fumonisins.

None of *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus* section *Nigri* strains are possible to produce aflatoxins or ochratoxin A, whereas five strains of *Aspergillus*



section *Circumdati* are able to produce ochratoxin A. What is more 43 strains of the gene *Fusarium* was found that they include at their genome the gene, involved at the biosynthesis of fumonisins.

The detection of mycotoxigenic fungi in two groups of food and estimation of mycoxigenic ability of strains isolated was the aim of this project. It was just a first reference concerning Greece, though. The results of this report revealed that the products which were tested were infected with mycotoxigenic fungi. In addition to this a number of the isolated strains of fungi were found capable to produce ochratoxin A and fumonisins. On the other hand they cannot produce aflatoxins and citrinin. These results may lead to some assumptions concerning the infection or not of the tested samples with some of the mycotoxins mentioned. Although further investigation is needed to confirm these assumptions.

Εγώ η Ευαγγελία Παναγιωτάκη, είμαι συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες από τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος υπήρχε η δυνατότητα να ανακτήσω από τις βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων. Για τις υπόλοιπες βιβλιογραφικές αναφορές διασταύρωσα την ακρίβεια της πηγής από σχετικά άρθρα ανασκόπησης και σχετικά επιστημονικά βιβλία.

Ευαγγελία Παναγιωτάκη

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Ευαγγελία Παναγιωτάκη

Ευάγγελος Βέλλιος  
Επίκουρος Καθηγητής

## 1. Εισαγωγή

1.1 Τα δημητριακά στη διατροφή του ανθρώπου	2
1.2 Μικροβιακό φορτίο των δημητριακών	3
1.3 Μύκητες που προσβάλλουν τα σιτηρά στον αγρό	3
1.4 Μύκητες που προσβάλλουν τα δημητριακά κατά το στάδιο της αποθήκευσης	5
1.5 Μύκητες που προσβάλλουν τον αραβόσιτο στον αγρό	6
1.6 Μύκητες που προσβάλλουν τον αραβόσιτο κατά το στάδιο της αποθήκευσης	8
1.7 Μικροβιακό φορτίο αλεύρων	10
1.8 Ανίχνευση μικροοργανισμών σε κόκκους δημητριακών και άλευρα	11
1.9 Μόλυνση των δημητριακών και των προϊόντων τους με μυκοτοξίνες	12
1.9.1 Αφλατοξίνες	13
1.9.1.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες	13
1.9.1.2 Μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες	14
1.9.1.3 Ανίχνευση αφλατοξινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	15
1.9.1.4 Όρια αφλατοξινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	17
1.9.1.5 Επιπτώσεις αφλατοξινών στην υγεία των καταναλωτών	17
1.9.2 Φουμονισίνες	19
1.9.2.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες	19
1.9.2.2 Μύκητες που παράγουν φουμονισίνες	19
1.9.2.3 Ανίχνευση φουμονισινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	19
1.9.2.4 Όρια φουμονισινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	22
1.9.2.5 Επιπτώσεις φουμονισινών στην υγεία των καταναλωτών	22
1.9.3 Ωχρατοξίνες	23
1.9.3.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες	23
1.9.3.2 Μύκητες που παράγουν ωχρατοξίνη Α	24
1.9.3.3 Ανίχνευση ωχρατοξίνης Α στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	25
1.9.3.4 Όρια ωχρατοξίνης Α με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	26
1.9.3.5 Επιπτώσεις ωχρατοξίνης Α στην υγεία των καταναλωτών	27
1.9.4 Κιτρινίνη	28
1.9.4.1 Δομή και φυσικές ιδιότητες	28
1.9.4.2 Μύκητες που παράγουν κιτρινίνη	28
1.9.4.3 Ανίχνευση κιτρινίνης στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	28
1.9.4.4 Όρια κιτρινίνης με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του	29
1.9.4.5 Επιπτώσεις κιτρινίνης στην υγεία των καταναλωτών	29
1.9.5 Ζεαραλενόνες	29
1.9.5.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες	29
1.9.5.2 Μύκητες που παράγουν ζεαραλενόνες	30
1.9.5.3 Ανίχνευση ζεαραλενόνων στον αραβόσιτο	30
1.9.5.4 Επιπτώσεις ζεαραλενόνων στην υγεία των καταναλωτών	31
1.9.6 Τριχοθηκίνες	31
1.9.6.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες	31
1.9.6.2 Μύκητες που παράγουν τριχοθηκίνες	32
1.9.6.3 Ανίχνευση τριχοθηκινών στον αραβόσιτο	32
1.9.6.4 Επιπτώσεις τριχοθηκινών στην υγεία των καταναλωτών	32

1.10 Τεχνικές προσδιορισμού μυκοτοξινών	35
1.10.1 Τεχνικές Χρωματογραφίας	35
1.10.2 Ενζυμική Δοκιμή Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA)	35
1.10.3 Προσδιορισμός μυκοτοξινών με την χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών ανάπτυξης μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες	36
1.10.4 Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	37
1.11 Σκοπός της μελέτης	39

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

2. 1. Απομόνωση μυκήτων από κόκκους pop corn και από αραβοσιτάλευρο	41
2.1.1 Δείγματα κόκκων pop corn	41
2.1.2 Δείγματα αλεύρου από αραβόσιτο	41
2.1.3 Παρασκευή θρεπτικών μέσων και διαλυμάτων	42
2.1.3.1. Θρεπτικό υλικό dichloran 18% glycerol agar	42
2.1.3.2 Θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar	42
2.1.3.3 Υδατικό διάλυμα πεπτόνης	43
2.1.3.4 Διάλυμα οικιακής χλωρίνης	43
2.1.4 Απομόνωση μυκήτων από κόκκους pop corn με τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης	43
2.1.5 Απομόνωση μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου με τη μέθοδο της επίστρωσης μετά από αραίωση	44
2.1.6 Συνθήκες επώασης	46
2.1.7 Απομόνωση μυκήτων	46
2.1.8 Διατήρηση απομονώσεων	46
2.2. Ταξινομική κατάταξη των μυκήτων	47
2.2.1 Ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών	47
2.2.2 Ταξινομική κατάταξη του γένους <i>Aspergillus</i> σε επίπεδο section με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά	47
2.2.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού Czapek Yeast Extract Agar (CYA)	48
2.2.2.2 Παρασκευή Czapek Concentrate	48
2.2.2.3 Παρασκευή Trace Metal solution	48
2.3 Εξαγωγή ολικού DNA από τις απομονώσεις του γένους <i>Fusarium</i>	48
2.3.1 Αντιδραστήρια	49
2.3.2 Παρασκευή Potato Dextrose Broth Medium	50
2.3.3 Διαδικασία εξαγωγής ολικού DNA από καλλιέργεια μυκήτων του γένους <i>Fusarium</i>	50
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	55
2.4.1 Κατάταξη απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> σε επίπεδο είδους με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών	55
2.4.1.1 Επιλογή εξειδικευμένων εκκινητών για ταυτοποίηση απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> σε επίπεδο είδους	55
2.4.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και θερμοκρασιακό προφίλ των αντιδράσεων για τους εξειδικευμένους εκκινητές Fgr/Fgc, Fcu/Fgc, Fps/Fpo, Fps/Fsp	56
2.4.2 Ανίχνευση του γονιδίου <i>fum1</i> με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών	58
2.4.2.1 Επιλογή εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου <i>fum1</i>	58
2.4.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και θερμοκρασιακό προφίλ της	

αντίδρασης για τους εξειδικευμένους εκκινητές <i>Fum1/Fum2</i>	59
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης	60
2.5 Ανίχνευση παραγωγής μυκοτοξινών: αφλατοξίνης, ωχρατοξίνης και κιτρινίνης με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Coconut Cream Agar (CCA)	62
2.5.1 Η μέθοδος της ανίχνευσης μυκοτοξινών στο θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar (CCA)	62
2.5.2 Παρασκευή Coconut Cream Agar	63
2.5.3 Εμβολιασμός τριβλίων	64
2.5.4 Επώαση των τριβλίων και παρατήρηση	65

### 3. Αποτελέσματα

3.1.1 Ανίχνευση μυκήτων σε κόκκους pop corn με τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης	67
3.1.2 Ανίχνευση μυκήτων σε αραβοσιτάλευρο με τη μέθοδο της επίστρωσης μετά από αραίωση.	67
3.1.3 Ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section των μυκήτων που απομονώθηκαν και ανιχνεύθηκαν	69
3.1.3.1 Ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section των μυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα κόκκων pop corn	72
3.1.3.2 Ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section των μυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα αραβοσιτάλευρου	87
3.1.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των απομονώσεων μυκήτων από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο.	92
3.2 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> .	95
3.3.1 Κατάταξη απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> σε επίπεδο είδους με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών	96
3.3.2 Μοριακή ανίχνευση του γονιδίου <i>fum1</i> που εμπλέκεται στην παραγωγή φουμονισίνης	100
3.4 Ανίχνευση της παραγωγής μυκοτοξινών: αφλατοξίνης, ωχρατοξίνης και κιτρινίνης με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Coconut Cream Agar (CCA)	105

### 4. Συζήτηση Συμπεράσματα

4.1 Μικροβιακό φορτίο pop corn	117
4.2 Μικροβιακό φορτίο αραβοσιτάλευρου	118
4.3 Έλεγχος δυνητικής παραγωγής φουμονισίνης	120
4.4 Έλεγχος παραγωγής αφλατοξίνης, ωχρατοξίνης, κιτρινίνης	123
4.4.1 Έλεγχος παραγωγής αφλατοξίνης	123
4.4.2 Έλεγχος παραγωγής ωχρατοξίνης	125
4.4.3 Έλεγχος παραγωγής κιτρινίνης	126

5. Βιβλιογραφία	130
-----------------	-----

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακα 1.</b> Σημαντικότεροι μύκητες που προσβάλλουν τα διάφορα είδη σιτηρών	4
<b>Πίνακας 2.</b> Ελάχιστες τιμές συντελεστή ενεργού ύδατος (aw) και κατά προσέγγιση περιεκτικότητα σε υγρασία για την ανάπτυξη των κυριότερων μυκήτων αποθήκης	6
<b>Πίνακας 3.</b> Προϊόντα καλαμποκιού στα οποία έχουν βρεθεί αφλατοξίνες	17
<b>Πίνακας 4.</b> Ανίχνευση φουμονισινών FB1 και FB2 σε pop corn, αραβοσιτάλευρο και σιμιγδάλι καλαμποκιού σε Αφρική Ευρώπη και Αμερική	21
<b>Πίνακας 5.</b> Ανίχνευση ωχρατοξίνης A σε αραβόσιτο και προϊόντα του	26
<b>Πίνακας 6.</b> Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που ανιχνεύονται στα δημητριακά και το γένος, section, είδος των αντίστοιχων μυκοτοξικογόνων μυκήτων	33
<b>Πίνακας 7.</b> Συνθήκες που εννοούν την παραγωγή μυκοτοξινών από συγκεκριμένα είδη μυκοτοξικογόνων μυκήτων	34
<b>Πίνακας 8.</b> Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων για το προσδιορισμό σε επίπεδο είδους του γένους <i>Fusarium</i> με τη βοήθεια της PCR	56
<b>Πίνακας 9.</b> Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR ανά ζεύγος εκκινητών εξειδικευμένο για κάθε είδος του γένους <i>Fusarium</i>	57
<b>Πίνακας 10.</b> Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων	59
<b>Πίνακας 11.</b> Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκκινητών Fum1/ Fum2	60
<b>Πίνακας 12.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το πρώτο δείγμα PC1, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	73
<b>Πίνακας 13.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το δεύτερο δείγμα PC2, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	75
<b>Πίνακας 14.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το τρίτο δείγμα PC3, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	77
<b>Πίνακας 15.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το τέταρτο δείγμα PC4, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	79
<b>Πίνακας 16.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το πέμπτο δείγμα PC5, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	81
<b>Πίνακας 17.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το έκτο δείγμα PC6, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	83
<b>Πίνακας 18.</b> Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το έβδομο δείγμα PC7, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section	85
<b>Πίνακας 19.</b> Συστηματική κατάταξη του συνόλου των απομονώσεων από τα επτά δείγματα κόκκων pop corn	86
<b>Πίνακας 20.</b> Συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου σε επίπεδο είδους ή σε επίπεδο section από το πρώτο δείγμα K1 σε συγκέντρωση 10-1 g/ml	88
<b>Πίνακας 21.</b> Συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου σε επίπεδο είδους ή σε επίπεδο section από το δεύτερο δείγμα K2 σε συγκέντρωση 10-1 g/ml	90
<b>Πίνακας 22.</b> Συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου σε επίπεδο είδους ή σε επίπεδο section από το πρώτο (K1) και δεύτερο (K2) δείγμα	91
<b>Πίνακας 23.</b> Σχετική πυκνότητα και Συχνότητα Εμφάνισης των απομονώσεων μυκήτων από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο	92

<b>Πίνακας 24.</b> Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i>	95
<b>Πίνακας 25.</b> Έλεγχος απομονώσεων των <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> για παραγωγή μυκοτοξινών από το πρώτο δείγμα κόκκων pop corn PC1	106
<b>Πίνακας 26.</b> Έλεγχος απομονώσεων των <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> για παραγωγή μυκοτοξινών από το δεύτερο δείγμα κόκκων pop corn PC2	107
<b>Πίνακας 27.</b> Έλεγχος απομονώσεων των <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> για παραγωγή μυκοτοξινών από το τρίτο δείγμα κόκκων pop corn PC3	108
<b>Πίνακας 28.</b> Έλεγχος απομονώσεων των <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> για παραγωγή μυκοτοξινών από το τέταρτο δείγμα κόκκων pop corn PC4	109
<b>Πίνακας 29.</b> Έλεγχος απομονώσεων των <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> , <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> για παραγωγή μυκοτοξινών από το πέμπτο δείγμα κόκκων pop corn PC5	109
<b>Πίνακας 30.</b> Έλεγχος απομονώσεων του γένους <i>Penicillium</i> για παραγωγή κιτρινίνης από το πρώτο K1 και δεύτερο K2 δείγμα αραβοσιτάλευρου	110



## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.</b> Χημική δομή αφλατοξινών	14
<b>Εικόνα 2.</b> Χημική δομή φουμονισίνης B1	19
<b>Εικόνα 3.</b> Χημική δομή ωχρατοξίνης A	23
<b>Εικόνα 4.</b> Χημική δομή της ζεαραλενόνης	30
<b>Εικόνα 5.</b> Χημική δομή τριχοθηκινών	31
<b>Εικόνα 6.</b> Δείγματα κόκκων pop corn	41
<b>Εικόνα 7.</b> Επιφανειακή απολύμανση κόκκων pop corn	44
<b>Εικόνα 8.</b> Τοποθέτηση κόκκων pop corn σε τριβλία που είχε επιστρωθεί θρεπτικό υλικό DG 18	44
<b>Εικόνα 9.</b> Κωνικές φιάλες με αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα πεπτόνης	45
<b>Εικόνα 10.</b> Κωνικές φιάλες με διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο	46
<b>Εικόνα 11.</b> Απομονώσεις του γένους <i>Fusarium</i> σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA.	49
<b>Εικόνα 12.</b> Εμβολιασμός κωνικών φιαλών με απομονώσεις του γένους <i>Fusarium</i> .	51
<b>Εικόνα 13.</b> Κωνικές φιάλες με καλλιέργειες μυκήτων του γένους <i>Fusarium</i> στον επωαστικό θάλαμο ανάδευσης μετά την πάροδο 8 ημερών	51
<b>Εικόνα 14.</b> Καλλιέργειες του γένους <i>Fusarium</i> σε θρεπτικό υλικό PDBM	52
<b>Εικόνα 15.</b> Μεταφορά καλλιεργείων σε δοχεία φυγοκέντρωσης	52
<b>Εικόνα 16.</b> Μυκήλιο μύκητα του γένους <i>Fusarium</i> μετά τη φυγοκέντρωση	53
<b>Εικόνα 17.</b> Μυκήλιο μύκητα του γένους <i>Fusarium</i> σε αποστειρωμένο χαρτί	53
<b>Εικόνα 18.</b> Πήγμα αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση σε διάλυμα TBE που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο	62
<b>Εικόνα 19.</b> Τοποθέτηση πήγματος αγαρόζης σε τράπεζα ακτινοβολίας UV (312nm)	62
<b>Εικόνα 20.</b> Φιάλες και τριβλία με Coconut Cream Agar	64
<b>Εικόνα 21.</b> Προετοιμασία για εμβολιασμό τριβλίων που είχαν επιστρωθεί με θρεπτικό υλικό CCA με απομονώσεις μυκήτων	64
<b>Εικόνα 22.</b> Εμβολιασμός τριβλίων όπου είχε επιστρωθεί CCA με απομονώσεις του γένους <i>Penicillium</i>	65
<b>Εικόνα 23.</b> Ανάπτυξη μυκήτων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο DG 18 όπου είχαν τοποθετηθεί κόκκοι pop corn	68
<b>Εικόνα 24.</b> Ανάπτυξη μυκήτων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο DG 18 όπου είχε τοποθετηθεί διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο περιεκτικότητας 10 -1 g/ml	69
<b>Εικόνα 25.</b> Ανάπτυξη μυκήτων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο DG 18 όπου είχε τοποθετηθεί διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο περιεκτικότητας 10 -2 g/ml	69
<b>Εικόνα 26.</b> Κονιδιοφόροι - κονίδια μυκήτων	70
<b>Εικόνα 27.</b> Καλλιέργειες μυκήτων που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn σε	71
<b>Εικόνα 28.</b> Καλλιέργειες μυκήτων που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn σε PDA	71
<b>Εικόνα 29.</b> Καλλιέργειες μυκήτων του γένους <i>Penicillium</i> που απομονώθηκαν από αραβοσιτάλευρο σε PDA	72
<b>Εικόνα 30.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fgr / Fgc σε πήγμα αγαρόζης	97
<b>Εικόνα 31.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των	

εκκινητών Fcu / Fgc σε πήγμα αγαρόζης	98
<b>Εικόνα 32.</b> Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών Fps/Fsp και Fps/Fpo	99
<b>Εικόνα 33.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης	100
<b>Εικόνα 34.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης	101
<b>Εικόνα 35.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης	102
<b>Εικόνα 36.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης	103
<b>Εικόνα 37.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης	104
<b>Εικόνα 38.</b> Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιέργειας μύκητα που ανήκει στο <i>Aspergillus section Circumdati</i> σε CCA	111
<b>Εικόνα 39.</b> Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μυκήτων που ανήκουν στο <i>Aspergillus section Circumdati</i> σε CCA	111
<b>Εικόνα 40.</b> Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μυκήτων που ανήκουν στο <i>Aspergillus section Circumdati</i> σε CCA	112
<b>Εικόνα 41.</b> Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μύκητων που ανήκουν στο <i>Aspergillus section Flavi</i> σε CCA	113
<b>Εικόνα 42.</b> Ανάπτυξη καλλιεργειών απομονώσεων του γένους <i>Penicillium</i> σε CCA	114
<b>Εικόνα 43.</b> Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μυκήτων που ανήκουν στο γένος <i>Penicillium</i> σε CCA	114

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 1.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του πρώτου δείγματος pop corn	74
<b>Διάγραμμα 2.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του δεύτερου δείγματος pop corn	76
<b>Διάγραμμα 3.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του τρίτου δείγματος pop corn	78
<b>Διάγραμμα 4.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του τέταρτου δείγματος pop corn	80
<b>Διάγραμμα 5.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του πέμπτου δείγματος pop corn	82
<b>Διάγραμμα 6.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του έκτου δείγματος pop corn	84
<b>Διάγραμμα 7.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του έβδομου δείγματος pop corn	86
<b>Διάγραμμα 8.</b> Ποσοστό κατανομής των απομονώσεων στα επιμέρους δείγματα pop corn	87
<b>Διάγραμμα 9.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων από το πρώτο δείγμα αραβοσιτάλευρου περιεκτικότητα 10-1 g/ml	89
<b>Διάγραμμα 10.</b> Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων από το δεύτερο δείγμα αραβοσιτάλευρου περιεκτικότητα 10-1 g/ml	90
<b>Διάγραμμα 11.</b> Σχετική πυκνότητα και συχνότητα εμφάνισης των γενών ή των section μυκήτων που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn	93
<b>Διάγραμμα 12.</b> Σχετική πυκνότητα και συχνότητα εμφάνισης των γενών ή των section μυκήτων που απομονώθηκαν από αραβοσιτάλευρο	94
<b>Διάγραμμα 13.</b> Αποτελέσματα ελέγχου απομονώσεων του γένους <i>Fusarium</i> μέσω PCR για ανίχνευση του γονιδίου <i>fum1</i>	105
<b>Διάγραμμα 14.</b> Αποτελέσματα ελέγχου απομονώσεων του γένους <i>Aspergillus</i> και <i>Penicillium</i> που αναπτύχθηκαν σε CCA για παραγωγή μυκοτοξινών	115



## 1.1 Τα δημητριακά στη διατροφή του ανθρώπου

Δημητριακά ονομάζονται οι συγκομιζόμενοι καρποί φυτών που ανήκουν στην οικογένεια των αγρωστωδών. Με μια σειρά από διεργασίες που ακολουθούν τη συγκομιδή όπως η ξήρανση, αποθήκευση, άλεση, ανάμιξη, ζύμωση, θερμική επεξεργασία, διατίθενται σε μία ποικιλία προϊόντων όπως αλεύρι, άμυλο, μίγματα για παρασκευή γλυκισμάτων, μίγματα για κάλυψη διαφόρων προϊόντων (όπως το κρέας τα ψάρια τα λαχανικά), ζύμες, χυλό, ζυμαρικά, πρόχειρα φαγητά, δημητριακά πρωινού, προϊόντα που περιέχουν συνδυασμούς και άλλων τροφίμων όπως φρούτα, μέλι, ξηρούς καρπούς, κρέας (Kent and Evers ,1994) .

Τα δημητριακά βρίσκονται στη βάση της διατροφικής πυραμίδας των ανθρώπων ενώ σε κάποιες χώρες αποτελούν την κύρια τροφή τους. Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο τα δημητριακά περιέχουν φυτικές ίνες, πρωτεΐνες και λιπίδια (Dewettinck *et al.*, 2008). Εκτιμάται ότι η κατανάλωση δημητριακών παρέχει άμεσα περίπου το 50% των απαραίτητων πρωτεϊνών και της απαραίτητης ενέργειας για τον οργανισμό του ανθρώπου και έμμεσα το 25% των απαραίτητων πρωτεϊνών μέσω της πρόσληψης από τη κατανάλωση κρέατος (FAO, 1999).

Ο αραβόσιτος (*Zea mays* (L.)) κατατάσσεται σε παγκόσμια κλίμακα ως το τρίτο σε σημαντικότητα καλλιεργούμενο δημητριακό, μετά το ρύζι και το σιτάρι. Θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά δημητριακά στον κόσμο, αφού αποτελεί βασικό είδος διατροφής για περίπου 400 εκατομμύρια ανθρώπους στις αναπτυσσόμενες κυρίως χώρες (Samarundo *et al.*, 2007). Επιπλέον χρησιμοποιείται στη διατροφή του ανθρώπου στις αναπτυγμένες χώρες ποικιλοτρόπως, είτε αυτούσιο, είτε μέσω της βιομηχανίας τροφίμων για την παραγωγή κονσέρβας καλαμποκιού, ποπ κορν, δημητριακών πρωινού, παιδικών τροφών, άμυλου αραβοσίτου, αλεύρου, ελαίου, πολτών αραβοσίτου που αποτελούν τη βάση για παρασκευή άλλων τροφίμων όπως τορτίγιες, τσιπς, σνακς κ.α. (Gibson and Benson, 2002).

Από το σύνολο του παραγομένου καλαμποκιού το 10-12 % χρησιμοποιείται για ξηρή ή θερμή άλεση. Από αυτό το 50% χρησιμοποιείται για γλυκαντικά το 30% για αλκοόλη και το 20% για το φαγητό και την παρασκευή αμύλου (Corn Annual, 2010).

Ο πυρήνας του αραβοσίτου αποτελείται από το άμυλο που είναι το πιο άφθονο συστατικό και από το οποίο παράγονται το άμυλο του αραβοσίτου, το φύτρο από το οποίο παράγονται τα έλαια αραβοσίτου, τη γλουτένη και το περικάρπιο (IARC, 2002).

Η άλεση του καλαμποκιού οδηγεί σε κλάσματα άλεσης τα οποία είναι το πίτουρο, απολεπισμένοι κόκκοι, κόκκοι, σιμιγδάλι και αλεύρι. Κάποια από τα κλάσματα του καλαμποκιού υφίστανται επιπλέον υγρή ή θερμή άλεση από την οποία προκύπτουν οι ίνες τα φύτρα η γλουτένη και το άμυλο. Το άμυλο υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία για την παραγωγή σιροπιών με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη και άλλες γλυκαντικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων (JECFA, 2001).

## **1.2 Μικροβιακό φορτίο των δημητριακών**

Τα δημητριακά καθώς και τα προϊόντα τους, ανήκουν στα τρόφιμα με περιορισμένη περιεκτικότητα νερού. Οι μύκητες είναι οι μικροοργανισμοί που προσβάλλουν συχνότερα την ομάδα αυτή των τροφίμων οι οποίοι όντας πιο ανεκτικοί σε μειωμένη περιεκτικότητα νερού του υποστρώματος σε σχέση με τα βακτήρια, έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και να προκαλέσουν αλλοιώσεις σε αυτά τα τρόφιμα. Πέραν των αλλοιώσεων που προκαλούν η παρουσία των μυκήτων στα δημητριακά ενέχει τον κίνδυνο μόλυνσης αυτών με μυκοτοξίνες. Η παραγωγή μυκοτοξινών μπορεί να συμβεί πριν από τη συγκομιδή, ή κατά τη διάρκεια της ξήρανσης ή κατά τη διάρκεια ακατάλληλης ξήρανσης και αποθήκευσης (Roberts *et al.*, 2005).

Οι μύκητες που ανιχνεύονται στα δημητριακά, ως τρόφιμα διακρίνονται σε αυτούς που τα προσβάλλουν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και αυτούς που τα προσβάλλουν κατά το στάδιο της αποθήκευσης (Christensen, 1987).

## **1.3 Μύκητες που προσβάλλουν τα σιτηρά στον αγρό**

Σπόρια ή μυκήλιο μυκήτων που προσβάλλουν τα σιτηρά στον αγρό βρίσκονται πάνω ή εντός των σπόρων των δημητριακών κατά τη στιγμή της συγκομιδής ενώ οι περισσότεροι από αυτούς τους μύκητες αποτελούν παθογόνα των φυτών προκαλώντας διάφορες ασθένειες (Pitt and Hocking, 1997).

Οι ζημιές από αυτούς τους μύκητες περιλαμβάνουν υποβάθμιση της ποιότητας και ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων καθώς και παραγωγή μυκοτοξινών οι οποία μπορεί να συμβεί είτε πριν τη συγκομιδή, είτε κατά το στάδιο της ξήρανσης. Παραγωγή μυκοτοξινών δεν συμβαίνει κατά το στάδιο της αποθήκευσης εκτός αν η αποθήκευση γίνει υπό ακατάλληλες συνθήκες (Sauer *et al.*, 1992).

Οι μύκητες που προσβάλλουν τα σιτηρά στο χωράφι και επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της ξήρανσης ή επιμολύνουν τους κόκκους κατά το στάδιο της ξήρανσης δεν μπορούν στη συνέχεια να αναπτυχθούν. Ωστόσο μπορούν να παραμείνουν βιώσιμοι για πολλούς μήνες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης. Ο χρόνος επιβίωσης τους είναι μεγαλύτερος σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε χαμηλά επίπεδα υγρασίας (Sauer *et al.*, 1992).

Οι μύκητες αυτοί αποτελούν συνήθως παθογόνα της συγκεκριμένης καλλιέργειας συνεπώς σε συγκεκριμένα προϊόντα εμφανίζονται συγκεκριμένα είδη μυκήτων. Πολλοί από αυτούς είναι μυκοτοξικογόνοι και αποτελούν σημαντική απειλή για τα τρόφιμα επειδή δεν είναι πάντα δυνατόν να ελεγχθεί η εξάπλωσή τους λόγω των χειρισμών και των τεχνικών κατά και μετά τη συγκομιδή καθώς και κατά την αποθήκευση (Roberts *et al.*, 2005).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κυριότεροι μύκητες που προσβάλλουν τα σιτηρά στον αγρό και απομονώνονται από διάφορα είδη δημητριακών.

**Πίνακα 1.** Σημαντικότεροι μύκητες που προσβάλλουν τα διάφορα είδη σιτηρών (Miller, 1994, όπως αναφέρεται στους Roberts *et al.*, 2005).

Είδος δημητριακών	Μύκητες
Καλαμπόκι	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Fusarium verticillioides</i>
Σιτάρι	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellnse</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. avenaceum</i>
Ρύζι και Σιτάρι	<i>F. sporotrichoides</i> <i>F. poae</i>
Σόργο	<i>Alternaria alternata</i>
Κριθάρι	<i>Penicillium verrucosum</i>

#### **1.4 Μύκητες που προσβάλλουν τα δημητριακά κατά το στάδιο της αποθήκευσης**

Τα δημητριακά αποθηκεύονται, συχνά για μεγάλα χρονικά διαστήματα, επιπλέον μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις ως κατεξοχήν χύδην φορτία. Η αποθήκευση και η μεταφορά τους μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην εμφάνιση και ανάπτυξη μικροοργανισμών σ' αυτά (Roberts *et al.*, 2005).

Πηγές μόλυνσης για τους κόκκους των σιτηρών αποτελούν τα μέσα μεταφοράς οι σάκοι και όλα τα μέσα αποθήκευσης. Σε μία μελέτη που διεξήχθη στις ΗΠΑ βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των σπορίων μυκήτων στη σκόνη που υπήρχε στους χώρους αποθήκευσης αυτών ήταν  $2,7 \times 10^6$  /g, συγκέντρωση η οποία μπορεί να αυξηθεί όταν χειρισμοί περιλαμβάνουν προσβεβλημένους κόκκους (Martin and Sauer, 1976).

Το πιο σημαντικά είδη μυκήτων που προσβάλλουν τα δημητριακά κατά το στάδιο της αποθήκευσης τους είναι είδη του γένους *Aspergillus* (ατελής μορφή) και είδη του γένους *Eurotium* που αποτελεί την τέλεια μορφή του παραπάνω γένους καθώς και είδη του γένους *Penicillium* (Pitt, 1975).

Τα αποθηκευμένα δημητριακά στερούνται τους αμυντικούς μηχανισμούς που διαθέτουν τα φυτά. Οι μύκητες που προκαλούν αλλοιώσεις σ' αυτά είναι σαπρόφυτοι και οι αλλοιώσεις εξαρτώνται από φυσιολογικούς παράγοντες οι οποίοι είναι ο συντελεστής ενεργού ύδατος ( $a_w$ ), που είναι η ποσότητα του νερού που είναι διαθέσιμη στους μικροοργανισμούς για μεταβολική δραστηριότητα στα τρόφιμα, η θερμοκρασία και η σύνθεση του αέρα (Pitt and Hocking, 1997).

Ο συντελεστής ενεργού ύδατος ( $a_w$ ) είναι η πιο σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την ανάπτυξη των μυκήτων σε κόκκους κατά την αποθήκευση επειδή η ικανότητα των μυκήτων να αποικίσουν τα αποθηκευμένα σιτηρά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ελάχιστη τιμή του  $a_w$  που απαιτούν για την ανάπτυξη τους. Γενικά οι μύκητες αποθήκης αναπτύσσονται ταχύτατα σε  $a_w$  πάνω από 0,77 αναπτύσσονται αργά σε  $a_w$  κάτω από 0,75 και δεν αναπτύσσονται καθόλου σε  $a_w$  0,68. Για την ασφαλή συντήρηση των δημητριακών συνίσταται  $a_w$  κάτω από 0,68 για διάστημα συντήρησης 1 έτους,  $a_w$  περίπου με 0,72 για διάστημα συντήρησης 6 μηνών, ενώ το  $a_w$  σε επίπεδα πάνω από 0,77 θεωρείται ότι δεν είναι ασφαλές εκτός αν πρόκειται για βραχυπρόθεσμη συντήρηση (Pit and Hocking 2009).

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ελάχιστες τιμές  $a_w$  που επιτρέπουν την ανάπτυξη των κυριότερων μυκήτων αποθήκευσης



**Πίνακας 2.** Ελάχιστες τιμές συντελεστή ενεργού ύδατος (aw) και κατά προσέγγιση περιεκτικότητα σε υγρασία για την ανάπτυξη των κυριότερων μυκήτων αποθήκης (Roberts *et al.*, 2005)

Είδος μυκήτων	aw	% περιεκτικότητα σε υγρασία
<i>Eurotium halophilicum</i>	0.68	13.4-14.3
<i>E. rubrum</i>	0.70	15.0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.77	17.0
<i>A. flavus</i>	0.80	18.0
<i>P. verrucosum</i>	0.78	17.3

Οι περισσότεροι από τους μύκητες αποθήκης αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος κοντά στις εύκρατες ή κοντά στις τροπικές θερμοκρασίες. Ωστόσο το βέλτιστο για το κάθε είδος ποικίλλει (ICMSF, 1996).

Είδη των γενών *Aspergillus* και *Eurotium* έχουν βέλτιστο θερμοκρασιών ανάπτυξης στην περιοχή 30-40°C ενώ αντίστοιχα για τα είδη του γένους *Penicillium* το βέλτιστο είναι συνήθως χαμηλότερο μεταξύ 20-30°C. Συνεπώς, οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στους κόκκους σιτηρών σε τροπικές περιοχές προκαλούνται συνήθως από είδη του γένους *Aspergillus*, ενώ σε δροσερά εύκρατα κλίματα από είδη του γένους *Penicillium* (ICMSF, 1996).

Οι μύκητες αποθήκης στα δημητριακά προκαλούν αλλοιώσεις που συνίστανται σε άμεσες και αφορούν τον αποχρωματισμό, την απώλεια ξηρού βάρους, την αλλαγή χημικής σύστασης, την ανάπτυξη κρούστας επί αυτών, και τις έμμεσες που είναι η επιμόλυνση με τις μυκοτοξίνες που αυτοί παράγουν (Sauer *et al.*, 1992).

### 1.5 Μύκητες που προσβάλουν τον αραβόσιτο στον αγρό

Τα ωτία του αραβόσιτου κατά την ανάπτυξή τους είναι εγκιβωτισμένα σε προστατευτικό φλοιό με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κίνδυνος μόλυνσης από μύκητες που παράγουν ξηροσπόρια. Συνεπώς η προσβολή των ωτίων φαίνεται ότι είναι κυρίως διασυστηματική ή μέσω της μεταφοράς σπορίων μυκήτων από τα έντομα που προσβάλλουν το καλαμπόκι κατά την ανάπτυξη του σπάδικα και λιγότερο μέσω του αέρα (χωρίς να αποκλείεται όμως και η μόλυνση μέσω του αέρα). Το γλυκό καλαμπόκι συγκομίζεται σε πρώιμο στάδιο της ωρίμανσης και συνεπώς δεν είναι

τόσο ευαίσθητο στην προσβολή μυκήτων όσο το ξηρό καλαμπόκι (Roberts *et al.*, 2005).

Το γένος *Fusarium* αποτελεί το κυρίαρχο από τα γένη που προκαλούν αλλοιώσεις στα ωτία του αραβόσιτου. Τα πιο συχνά εμφανιζόμενα είδη είναι *F.verticillioides*, (συν. *Fus. moniliforme*), *F. graminearum*, και *F. subglutinans* (Marasas *et al.*, 1984). Ο τρόπος εισόδου στα φυτά διαφέρει ανάλογα με το είδος. Για το *F. graminearum* έχει αποδειχθεί ότι εισέρχεται στο φυτό μέσω των τριχοειδών κλωστών που περιβάλλουν το σπάδικα οι οποίες είναι αρκετά ευάλωτες κατά τις πρώτες έξι ημέρες μετά την έκπτυξη. Τα σπόρια του μύκητα μεταφέρονται στις τριχοειδείς κλωστές μέσω του ανέμου. Επίσης έντομα που προσβάλουν τον αραβόσιτο μπορούν να μεταφέρουν σπόρια του παραπάνω μύκητα στις τριχοειδείς κλωστές (Reid and Hamilton, 1996).

Για το είδος *F.verticillioides* έχει αποδειχθεί ότι εισέρχεται στο φυτό από τις τριχοειδείς κλωστές μέσω των εντόμων που προσβάλουν τον αραβόσιτο. Επιπλέον η προσβολή των κόκκων μπορεί να γίνει και διασυστηματικά είτε μέσω των ριζών από μόλυσμα που υπήρχε στο έδαφος είτε από μόλυσμα που υπήρχε στον πυρήνα του κόκκου από τον οποίο προήλθε το φυτό (Munkvold *et al.*, 1997).

Ο μύκητας *F. verticillioides*, είναι ενδημικό παθογόνο του αραβόσιτου στις περισσότερες από τις περιοχές που καλλιεργείται ο αραβόσιτος (Desjardins, 2006).

Ίσης σημασίας με τις προσβολές που προκαλούνται από είδη του γένους *Fusarium* αποτελούν και οι προσβολές από το είδος *Aspergillus flavus*. Αρχικά το είδος *A. flavus* θεωρούνταν ότι αποτελούσε μύκητα που πρόσβαλε τα δημητριακά κατά το στάδιο της αποθήκευσης όμως στα μέσα της δεκαετίας του '70 στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ διαπιστώθηκε ότι πρόσφατα συγκομιζόμενο καλαμπόκι είχε προσβληθεί από το παραπάνω είδος (Lillehoj *et al.*, 1976a,b).

Σε περιοχές όπου καλλιεργείται ο αραβόσιτος και οι θερμοκρασίες είναι υψηλές ευνοείται η προσβολή από το παθογόνο. Οι προσβολές εντόμων είναι ο πιθανότερος τρόπος εισόδου στο φυτό (Lillehoj *et al.*, 1980). Ωστόσο έχει βρεθεί ότι μπορεί να προσβάλει το σπάδικα και χωρίς την παρουσία εντόμων (Williams *et al.*, 2006). Αντιθέτως το είδος *A. parasiticus* φαίνεται ότι σπάνια προσβάλει το καλαμπόκι (Horn, 2007).

Δείγματα καλαμποκιού που προέρχονταν από τη Βόρεια Ασία ήταν σε μεγάλο βαθμό προσβεβλημένα από το είδος *A. flavus*. Συγκεκριμένα, το παθογόνο εντοπίστηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85% στα 150 δείγματα που εξετάστηκαν

από την περιοχή της Ταϊλάνδης. Παρόμοια ήταν και η εικόνα δειγμάτων καλαμποκιού από την Ινδονησία (Pitt *et al.*, 1998a).

Τα παραπάνω είδη του γένους *Aspergillus* δεν είναι κοινά στην Ευρώπη. Ωστόσο το 2003 στην Ιταλία εντοπίστηκαν στο 93% των δειγμάτων που εξετάστηκαν και το 70% των απομονώσεων που προήλθαν από αυτά τα δείγματα βρέθηκε ότι μπορούσαν να παράγουν αφλατοξίνη (Giorni *et al.*, 2007).

Το καλαμπόκι επίσης μπορεί να προσβληθεί από είδη του γένους *Penicillium*. Το είδος *P. citrinum* απομονώθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό από 154 δείγματα καλαμποκιού που προέρχονταν από την Ταϊλάνδη με το ποσοστό μόλυνσης να ανέρχεται στο 67% ενώ το είδος *P. funiculosum* απομονώθηκε από το 42% (Pitt *et al.*, 1993). Σε καλαμπόκι που προέρχονταν από την Ινδονησία το συχνότερα απαντώμενο είδος ήταν *P. citrinum* το οποίο βρέθηκε σε ποσοστό 45% από τα 82 δείγματα που εξετάστηκαν ενώ το είδος *P. oxalicum* βρέθηκε σε ποσοστό 10% (Pitt *et al.*, 1998a).

## **1.6 Μύκητες που προσβάλλουν των αραβόσιτο κατά το στάδιο της αποθήκευσης**

Οι σπάδικες του αραβόσιτου και οι κόκκοι του είναι αρκετά μεγάλοι με συνέπεια εάν η σχετική υγρασία είναι υψηλή κατά το στάδιο της συγκομιδής να καθυστερεί η ξήρανση και συνεπώς να ευνοείται τόσο η ανάπτυξη μυκήτων που έχουν ήδη προσβάλλει τον αραβόσιτο στον αγρό προ της συγκομιδής όσο και η ανάπτυξη μυκήτων που προσβάλλουν τους κόκκους μετά τη συγκομιδή (Roberts *et al.*, 2005).

Οι Barron και Lichtwardt, (1959), αναφέρουν ότι 50 γένη μυκήτων απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα αποθηκευμένου καλαμποκιού από την Αϊόβα. Μεταξύ των ειδών που ανιχνεύθηκαν ήταν είδη του γένους *Eurotium* και ειδικότερα τα είδη *E. rubrum*, *E. amstelodami* και *E. chevalieri* ήταν τα πιο κοινά μαζί με το είδος *Aspergillus restrictus* και είδη του γένους *Penicillium* και ειδικότερα *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum*.

Σε δείγματα καλαμποκιού από την Ταϊλάνδη το πιο συχνά απαντώμενα ήταν επίσης είδη του γένους *Eurotium* (*E. chevalieri*, *E. rubrum* και *E. amstelodami*) αλλά επίσης και τα είδη *Wallemia sebi*, *A. flavus*, *A. wentii*, *A. tamarii* και *A. niger* βρέθηκαν σε σημαντικούς αριθμούς (Pitt *et al.*, 1993).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε 148 δείγματα από τις Φιλιπίνες και 82 δείγματα από την Ινδονησία (Pitt *et al.*, 1998a). Επιπλέον σε αυτά τα δείγματα ανιχνεύθηκαν είδη του γένους *Fusarium* και συγκεκριμένα τα είδη *F. verticillioides*,

*F. semitectum* και *F. proliferatum* βρέθηκαν σε υψηλούς αριθμούς σε αποθηκευμένο καλαμπόκι από τις παραπάνω χώρες. (Pitt *et al.*, 1998a).

Οι Wicklow *et al.*, (1998), επίσης αναφέρουν ότι απομόνωσαν τα είδη *E. chevalieri*, *A. flavus* και *F. verticillioides* σε καλαμπόκι που ήταν αποθηκευμένο για περισσότερο από 2 χρόνια σε εύρος θερμοκρασιών 10-40 °C και σε υγρασία που κυμαίνονταν μεταξύ 40% και 88%.

Παρόμοια καταγραφή των ειδών των μυκήτων αναφέρεται σε καλαμπόκι από τη Βενεζουέλα (Mazzani *et al.*, 2004).

Υψηλά επίπεδα υγρασίας σε αποθηκευμένο καλαμπόκι (16,4%) σε σιλό που βρίσκονται κάτω από τη γη στη Βραζιλία οδήγησαν σε ανάπτυξη υψηλών πληθυσμών του είδους *A. candidus* και σχηματισμό φιλμ από ζυμομύκτες στα ανώτερα στρώματα με είδη του γένους *Fusarium* να ανιχνεύονται ακόμα και μετά την πάροδο διαστήματος αποθήκευσης 8 μηνών (Sartori *et al.*, 1991).

Μύκητες του γένους *Penicillium*, βρέθηκαν στο καλαμπόκι τόσο πριν τη συγκομιδή όσο και κατά την αποθήκευση (Mislivec and Tuite, (1970a,b). Στα προαναφερόμενα δείγματα καλαμποκιού από την Ταϊλάνδη τις Φιλιππίνες και την Ινδονησία το είδος *P. citrinum* ήταν το πιο συχνά απαντώμενο ενώ τα είδη *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. oxalicum* και *P. raistrickii* επίσης ανιχνεύθηκαν συχνά (Pitt *et al.*, 1998a).

Το είδος *P. citrinum* ήταν επίσης το πιο συχνά απαντώμενο και στο αποθηκευμένο καλαμπόκι που ερευνήθηκε από τους Wicklow *et al.*, (1998), οι οποίοι ανέφεραν ότι οι πληθυσμοί του είδους *P. funiculosum* μειώθηκαν κατά το στάδιο της αποθήκευσης.

Λόγω των δυσκολιών που υπάρχουν για την ξήρανση του καλαμποκιού στο χωράφι σε περιοχές που οι βροχοπτώσεις ξεκινάνε νωρίς όπως στις Κεντρικές Η.Π.Α. ή στις Δυτικές Η.Π.Α. επιλέγεται η μέθοδος της αποθήκευσης υγρού καλαμποκιού υπό ψύξη. Ωστόσο πολλά είδη του γένους *Penicillium* αναπτύσσονται αρκετά καλά και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 5 °C και έχει παρατηρηθεί ότι τα καλαμπόκια που αποθηκεύονται με αυτή τη μέθοδο προσβάλλονται από το γένος *Penicillium*. Η προσβολή συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα πενικιλικού οξέος ενώ η ασθένεια αυτή αποκαλείται ως «μπλε μάτι». (Ciegler and Kurtzman, 1970).

Οι Auerbach *et al.*, (1998), αναφέρουν ανάπτυξη του είδους *Penicillium roqueforti* σε ολόκληρο ενσήρωμα αραβοσίτου και την ανίχνευση ροκφορτίνης σε εμφανώς μουχλιασμένα δείγματα.

Η παρουσία των μυκήτων συνοδεύεται συχνά και από παραγωγή μυκοτοξινών. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες επικεντρώνονται στο είδος *Aspergillus flavus* που προσβάλλει το καλαμπόκι πριν τη συγκομιδή και στις αλλοιώσεις που υφίσταται το προϊόν όχι τόσο από την μυκηλιακή ανάπτυξη αλλά από την παραγωγή αφλατοξινών σε υψηλά επίπεδα (Pitt and Hocking, 2009). Επίσης οι Mansfield *et al.*, (2008), ανέφεραν την ανίχνευση ροκφορτίνης, πατουλίνης, βλενοφαινολικού οξέος και κυκλοπιαζονικού οξέος σε φρέσκο και ενσιρωμένο αραβόσιτο.

### **1.7 Μικροβιακό φορτίο αλεύρων**

Το αλεύρι σίτου από τα υπάρχοντα είδη αλεύρων είναι αυτό που έχει τη μεγαλύτερη κατανάλωση. Ωστόσο αλεύρι που παράγεται από καλαμπόκι, ρύζι και άλλα δημητριακά χρησιμοποιείται άμεσα στη διατροφή ή για την παρασκευή άλλων τροφίμων. Οι σπόροι που προορίζονται για άλεση υποβάλλονται σε καθαρισμό και κατεργασία για να μαλακώσουν. Μέσα από αυτές τις διαδικασίες μειώνεται το μικροβιακό φορτίο των σπόρων που υποβάλλονται στα στάδια της άλεσης (Roberts *et al.*, 2005).

Είναι προφανές ότι ο αριθμός των μυκήτων που προσβάλλουν τα σιτηρά στον αγρό και μπορούν να απομονωθούν από το αλεύρι είναι πολύ μικρότερος από αυτόν που απομονώνεται από τους κόκκους πριν την άλεση (Pitt and Hocking, 2009). Επιπλέον τα γένη των μυκήτων που βρίσκονται στο αλεύρι διαφέρουν σημαντικά από εκείνα που βρίσκονται στους κόκκους από τους οποίους προέκυψαν, αποδεικνύοντας το ρόλο του μύλου ως πηγή μόλυσματος. Ο αριθμός των μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* αυξάνεται σημαντικά στο αλεύρι και μαζί με το γένος *Eurotium* είναι τα συχνότερα απαντώμενα (Roberts *et al.*, 2005).

Τα είδος *Aspergillus candidus* ήταν το πιο κοινό είδος που απομονώθηκε σε δύο τύπους αλεύρου στη Γερμανία με το είδος *Penicillium aurantiogriseum* να είναι το επόμενο σε συχνότητα ανίχνευσης (Weidenborner *et al.*, 2000). Σε μια εκτεταμένη έρευνα στην Αυστραλία σε άλευρα και προϊόντα άλεσης το είδος *Penicillium citrinum* ήταν το περισσότερο κοινό ακολουθούμενο από τα είδη *P. aurantiogriseum* *A. versicolor*, *A. penicillioides* (Pitt and Hocking 2009).

Οι κόκκοι καλαμποκιού που προορίζονται για άλεση με σκοπό την παρασκευή σιμιγδαλιού ή αλεύρου δεν υφίστανται το στάδιο της θερμικής επεξεργασίας όπως συμβαίνει με τους άλλους κόκκους. Επιπλέον τα μηχανήματα άλεσης αποτελούν πηγή μόλυσματος αναλόγως της καθαρότητας του εξοπλισμού.

Υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ του μικροβιακού φορτίου του προϊόντος και των μέτρων υγιεινής που λαμβάνονται στους μύλους άλεσης. Σε εργοστάσια με πλημμελή μέτρα υγιεινής υπάρχουν υψηλά επίπεδα μικροβιακού φορτίου της τάξης των  $3,4 \times 10^6$  ανά γραμμάριο στο αλεύρι (Christensen and Cohen, 1950) και πάνω από  $10^8/g$  στη σκόνη του μύλου (Semeniuk, 1954).

Οι μύκητες των οποίων η προσβολή ξεκινάει από το χωράφι όπως *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* και *A. flavus* μπορούν να παραμείνουν στους κόκκους και τόσο το μόλυσμα (μυκήλιο, σπόρια) όσο και οι τοξίνες μπορεί να μεταφερθούν στα προϊόντα καλαμποκιού όπως το αλεύρι, τα τσιπς καλαμποκιού, οι τортίγιες, τα δημητριακά για πρωινό και άλλα (Pitt and Hocking, 1997). Σε σιμιγδάλι και άμυλο καλαμποκιού στη Βραζιλία έχουν αναφερθεί τα είδη *Penicillium funiculosum*, *P. duclauxii* και *P. brevicompactum* (Ribeiro et al., 2003). Επίσης σε σιμιγδάλι καλαμποκιού στην Αργεντινή έχουν βρεθεί τα είδη *Aspergillus parasiticus*, *P. citrinum*, *P. funiculosum* και *Alternaria alternata* (Broggi et al., 2002). Επιπλέον σε αλεύρι καλαμποκιού στην Κένυα έχουν βρεθεί τα είδη *A. flavus*, *A. sulphureus*, *P. stoloniferum* και *P. aurantiogriseum* (Muriuki and Siboe, 1995).

Επιπρόσθετα, το αλεύρι και το άμυλο αναμειγνύονται με άλλα συστατικά σε ξηρή κατάσταση, όπως αυγό, γάλα σε σκόνη και μπαχαρικά για την παρασκευή ξηρών μιγμάτων και τη μετέπειτα χρήση τους από καταστήματα μαζικής εστίασης ή από καταναλωτές. Μύκητες που έχουν βρεθεί σε τέτοιου είδους προϊόντα καλαμποκιού είναι είδη που ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Eurotium*, *Fusarium* και *Penicillium* μεταξύ των οποίων τα είδη *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. sphaerospermum*, *E. amstelodami*, *P. chrysogenum* (Kamphuis et al., 1992).

Για το αλεύρι και το σιμιγδάλι αραβοσίτου, η περιεκτικότητα νερού θα πρέπει να είναι της τάξης του 12%. Κάτω από αυτό το επίπεδο δεν υπάρχει μικροβιακή ανάπτυξη αλλά πάνω από αυτό το επίπεδο, κάποιοι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν (Hesseltine and Graves, 1966). Αύξηση της υγρασία μπορεί να επέλθει από ακατάλληλες διαδικασίες καθαρισμού (Graves et al., 1967) ή από τη δραστηριότητα των εντόμων (Thatcher et al., 1953). Ο ρυθμός ανάπτυξης εξαρτάται από το aw και τη θερμοκρασία (Kent-Jones and Amos, 1957).

## **1.8 Ανίχνευση μικροοργανισμών σε κόκκους δημητριακών και άλευρα**

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών που προσβάλλουν του κόκκους δημητριακών γίνεται με αποστείρωση της επιφάνειας των κόκκων και στη συνέχεια

τοποθέτηση αυτών σε θρεπτικά μέσα με τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης - direct plating. (Samson *et al.*, 1992, Pitt and Hocking, 1997).

Στην περίπτωση που οι σπόροι υποβάλλονται σε επεξεργασία, ιδιαίτερα για την παραγωγή αλεύρων, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες είναι σημαντικοί στην αξιολόγηση του συνολικού φορτίου και αυτό γιατί πολλοί από αυτούς είναι ικανοί να αναπτυχθούν και σε προϊόντα που προέρχονται από αλεύρι. Η ποιότητα των κόκκων που προορίζονται για άλεση ελέγχεται μέσω της άμεσης επίστρωσης χωρίς επιφανειακή αποστείρωση. Η αξιολόγηση της ποιότητας του παραγομένου αλεύρου γίνεται με επίστρωση μετά από αραίωση - dilution plating (Samson *et al.*, 1992, Pitt and Hocking, 1997).

Σημαντικότερη, των αλλοιώσεων που προκαλεί η ανάπτυξη των μυκήτων στους κόκκους των δημητριακών είναι η επιμόλυνση τους με μυκοτοξίνες τις οποίες αυτοί παράγουν.

### **1.9 Μόλυνση των δημητριακών και των προϊόντων τους με μυκοτοξίνες**

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων και έχουν ανιχνευθεί σε πολλά γεωργικά προϊόντα όπου έχουν εντοπιστεί τοξικογόνοι μύκητες (CAST, 2003). Η παρουσία τους στα τρόφιμα σε υψηλά επίπεδα μπορεί να επιφέρει τοξικές επιδράσεις οι οποίες μπορεί να είναι οξείες ή χρόνιες όπως μεταλλάξεις, τερατογενέσεις, γενετικές ανωμαλίες, νευροτοξικότητα ή ακόμα κα θάνατο (ICMSF, 1996). Επιπλέον, το ποικίλο διαιτολόγιο μπορεί να εκθέτει τους καταναλωτές σε μακροχρόνια λήψη χαμηλών επιπέδων μίας ή περισσοτέρων τοξινών και αυτού του είδους η έκθεση μακροπρόθεσμα μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία τους (Lopez-Garcia *et al.*, 1999).

Η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα δεν είναι ορατή όπως αυτό συμβαίνει με άλλες ασθένειες, όπου τα συμπτώματα είναι ορατά στα μέρη του φυτού. Η παγκόσμια κοινότητα πλέον είναι ευαισθητοποιημένη για την πιθανότητα μόλυνσης τροφίμων όπως φυστίκια, μπαχαρικά, δημητριακά με μυκοτοξίνες με συνέπεια 77 χώρες να έχουν θεσπίσει κανονισμούς για τις μυκοτοξίνες (CAST, 2003, FAO, 2004).

Η μόλυνση τροφίμων με μυκοτοξίνες είναι ένα μεγάλο πρόβλημα ιδιαίτερα για τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές όπου οι κλιματικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές πρακτικές και οι συνθήκες αποθήκευσης ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή μυκοτοξινών (CAST, 2003).

Εφόσον οι μυκοτοξίνες είναι παρούσες στους κόκκους των δημητριακών από προσβολή που έγινε στον αγρό από τοξικογόνους μύκητες τότε θα παραμείνουν σ' αυτούς και θα μεταφερθούν και στα προϊόντα τους αφού δε διασπώνται κατά τη θέρμανση ή μέσω άλλων διαδικασιών επεξεργασίας. Επιπλέον, εάν οι κόκκοι ή τα προϊόντα τους όπως το αλεύρι ή το σιμιγδάλι αραβοσίτου έχουν επίπεδα υγρασίας πάνω από 14% επιτρέπουν στους μύκητες να αναπτυχθούν και με αυτό τον τρόπο η παραγωγή των μυκοτοξινών μπορεί να συνεχιστεί (Bullerman *et al.*, 1975). Ωστόσο σε ξηρά προϊόντα οι μυκοτοξίνες δεν αποτελούν πρόβλημα εφόσον δεν υπάρχουν στο αρχικό προϊόν αφού δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη των μυκήτων (Roberts *et al.*, 2005).

Οι πιο σημαντικές ομάδες των μυκοτοξινών που ανιχνεύονται στα δημητριακά και στα προϊόντα τους είναι: αφλατοξίνες, φουμονισίνες ωχρατοξίνες, ζεαραλενόνες και τριχοθηκίνες ενώ σε χαμηλό ποσοστό έχει ανιχνευθεί η μυκοτοξίνη κιτρινίνη σε δημητριακά (RASFF, 2012, EFSA, 2012).

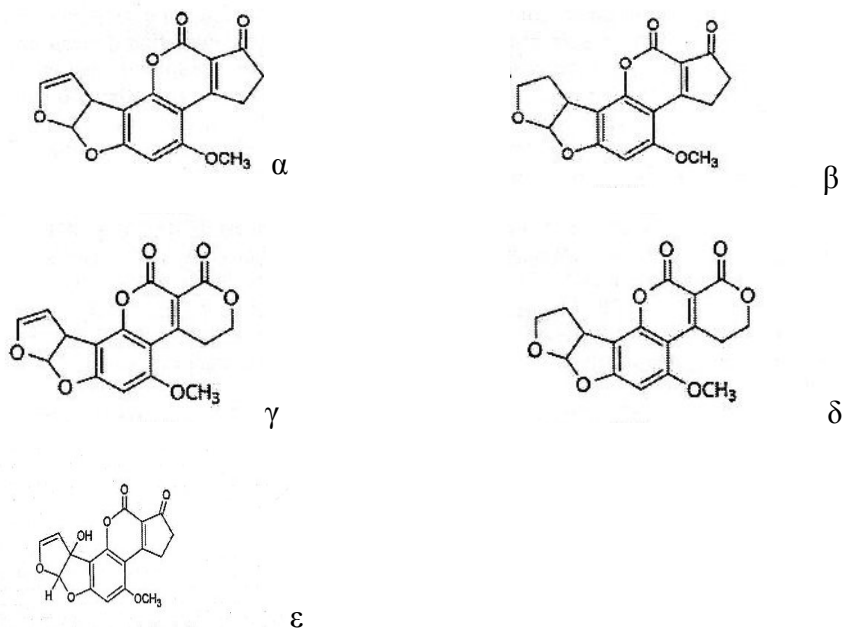
## **1.9.1 Αφλατοξίνες**

### **1.9.1.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες**

Οι αφλατοξίνες είναι ομάδα μυκοτοξινών. Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά το 1961 στην Αγγλία από τους Sargeant *et al.*, (1961), σε ζωοτροφές που προκάλεσαν το θάνατο σε 100. 000 γαλοπούλες. Οι συγκεκριμένες ζωοτροφές βρέθηκε ότι ήταν προσβεβλημένες από το μύκητα *A. flavus*.

Οι αφλατοξίνες ταξινομούνται σε τρεις υποομάδες που περιέχουν δύο τοξίνες η κάθε μία: Την υποομάδα B με δύο τοξίνες B1 και B2, την υποομάδα G με δύο τοξίνες την G1 και G2 και την υποομάδα M με τις τοξίνες M1 και M2. Η ονομασία των δύο πρώτων προέρχεται από το φθορισμό που παρατηρείται μετά από έκθεση αυτών σε υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα παρατηρείται μπλε φθορισμός (Blue) για την υποομάδα B, κιτρινο-πράσινος φθορισμός (Green) για την υποομάδα G ενώ οι τοξίνες της υποομάδας M εμφανίζουν μπλε ιώδη φθορισμό. Η αφλατοξίνη M1 είναι ο κύριος μεταβολίτης της αφλατοξίνης B1 ο οποίος ανιχνεύεται στο γάλα εκτρεφόμενων θηλαστικών που έχουν καταναλώσει τροφή η οποία περιείχε αφλατοξίνη B1. Επίσης έχει ανιχνευθεί και στο γάλα θηλαζουσών μητέρων (IARC, 1993). Στην εικόνα 1 φαίνεται η χημική δομή των αφλατοξινών.





**Εικόνα 1.** Χημική δομή αφλατοξινών α) B1, β) B2, γ) G1, δ) G2, ε) M1 (από Marin *et al.*, 2013)

### 1.9.1.2 Μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus* που ανήκουν στην υποομάδα (section) *Flavi*. Το section *Flavi* αποτελείται από δύο υποομάδες ειδών. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τα αφλατοξικόγωνα είδη *A. arachidicola*, *A. flavus*, *A. minisclerotium*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis* και *A. toxicarius*. Η άλλη υποομάδα περιλαμβάνει είδη τα οποία δεν παράγουν αφλατοξίνες μεταξύ των οποίων είναι τα *A. avenaceus*, *A. caelatus*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. oryzae*, *A. sojae*, και *A. tamarii* (Samson *et al.*, 2006).

Τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* αποτελούν τα κύρια είδη που παράγουν αφλατοξίνες (Bennett and Klich 2003, Horn, 2007). Η διαφορά μεταξύ των δύο ειδών είναι ότι το είδος *A. flavus* παράγει μόνο αφλατοξίνη B1 και κάποιες φορές κυκλοπιαζονικό οξύ ενώ το είδος *A. parasiticus* παράγει αφλατοξίνη B1, B2, G1, G2, (Pitt, 1993b) αλλά δεν παράγει κυκλοπιαζονικό οξύ (Horne, 2003). Ωστόσο σε μελέτη τους οι Geiser *et al.*, (1998, 2000) με απομονώσεις του είδους *A. flavus* προτείνουν ότι το είδος αυτό μπορεί να χωριστεί σε δύο υποομάδες και πρότειναν ότι η δεύτερη υποομάδα διέφερε αρκετά από την πρώτη, ώστε να μπορεί να διαχωριστεί και σε διαφορετικό είδος. Μία από τις διαφορές της δεύτερης υποομάδας είναι και η παραγωγή αφλατοξίνης G, εκτός της αφλατοξίνης B, καθώς και κυκλοπιαζονικού

οξέος σε αντίθεση με όλες τις άλλες απομονώσεις του *A. flavus*. Η συγκεκριμένη υπομάδα φαίνεται να εμφανίζεται μόνο στο νότιο ημισφαίριο.

Το είδος *A. flavus* είναι περισσότερο διαδεδομένο και αποικίζει τα υπέργεια μέρη του φυτού αντίθετα το είδος *A. parasiticus* έχει πιο περιορισμένη γεωγραφική κατανομή και αναφέρεται κυρίως ως μύκητας του εδάφους (EFSA, 2007). Οι περισσότερες από τις απομονώσεις του είδους *A. parasiticus* είναι αφλατοξιγόνες, σε ποσοστό που φθάνει το 80% με 90% ενώ το ποσοστό των αφλατοξιγόνων απομονώσεων για το είδος *A. flavus* φθάνει το 30% με 40% (Klich and Pitt, 1988).

Τέλος τα είδη *A. nomius* και *A. bombycis* παράγουν αφλατοξίνη Β και G (Saito *et al.*, 1989, Pitt, 1993, Peterson *et al.*, 2001).

### **1.9.1.3 Ανίχνευση αφλατοξινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του**

Ένας από τους κυριότερους ξενιστές του είδους *A. flavus* είναι το καλαμπόκι με συνέπεια στο συγκεκριμένο προϊόν να είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης με αφλατοξίνες (Pitt & Hocking, 1997). Απαντάται σε υψηλά ποσοστά σε τροπικές περιοχές ενώ εμφανίζεται σε χαμηλά ποσοστά σε εύκρατες περιοχές και δεν εμφανίζεται καθόλου σε περιοχές με δροσερό εύκρατο κλίμα εκτός αν τα τρόφιμα έχουν εισαχθεί από τροπικές περιοχές (IARC, 2002).

Το συγκεκριμένο είδος προσβάλλει τον αραβόσιτο στον αγρό και μπορεί να συνεχίσει την προσβολή και κατά την αποθήκευση. Ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου μπορεί να διαιρεθεί σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση είναι το σαπροφυτικό στάδιο όπου παρατηρείται ο αποικισμός των φυτικών υπολειμμάτων από το μύκητα, ενώ στη δεύτερη φάση λαμβάνει χώρα μόλυνση των αναπτυσσόμενων φυτών. Τα σκηρώτια του μύκητα που υπάρχουν στο έδαφος βλαστάνουν στο τέλος του χειμώνα ή στην αρχή της άνοιξης, προς μυκήλιο και κονιδιοφόρους και μολύνουν τα φυτά είτε απευθείας μέσω των ιστών πλησίον του εδάφους που έρχονται σε επαφή με το μυκήλιο - σπόρια, ή από κονίδια που έχουν μεταφερθεί από τον άνεμο, είτε τέλος από έντομα που προκαλούν πληγές στα φυτά και φέρουν σπόρια του μύκητα (Abbas *et al.*, 2009).

Επισημαίνεται ότι το κύριο είδος του γένους *Aspergillus* που μολύνει το καλαμπόκι είναι το είδος *A. flavus*. Παρότι το είδος *A. parasiticus* έχει την ίδια γεωγραφική εξάπλωση με το είδος *A. flavus* είναι λιγότερο διαδεδομένο και συνήθως δεν απαντάται στον αραβόσιτο (Pitt *et al.*, 1994).

Τα πρώτα συμπτώματα οξείας τοξικώσεως λόγω κατανάλωσης καλαμποκιού με υψηλά επίπεδα αφλατοξίνης, αναφέρθηκε στην Ινδία το 1975 όπου 400 άτομα εμφάνισαν ίκτερο και υπέρταση. Τα άτομα αυτά είχαν καταναλώσει καλαμπόκι που είχε μολυνθεί σε υψηλό ποσοστό από το μύκητα *A. flavus* (Krishnamachari *et al.*, 1975).

Μια δεύτερη επιδημία μετά από κατανάλωση καλαμποκιού αναφέρθηκε στην ανατολική Κένυα όπου 317 άνθρωποι νόσησαν και 125 άνθρωποι πέθαναν την οποία ακολούθησε μια τρίτη περίπτωση οξείας τοξικώσεως το 2005 όπου 25 άνθρωποι πέθαναν (Strosnider *et al.*, 2006). Σύμφωνα με τις έρευνες για τη διερεύνηση των αιτιών, η κατανάλωση μουχλιασμένου καλαμποκιού το οποίο είχε μολυνθεί με αφλατοξίνη αποτέλεσε την αιτία αυτών των επιδημιών (Azziz- Baumgartner *et al.*, 2005).

Επιπλέον στην Ινδία το 1978 αναφέρθηκε ότι καλλιέργεια καλαμποκιού ήταν προσβεβλημένη από αφλατοξιγόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus* (Bilgrami, *et al.*, 1978).

Εφόσον οι αφλατοξίνες έχουν μολύνει το καλαμπόκι μπορούν να περάσουν και στα προϊόντα αυτού. Ωστόσο, σύμφωνα με έρευνες η αρχική ποσότητα αφλατοξινών μειώνεται κατά το στάδιο της επεξεργασίας που υφίστανται οι κόκκοι κατά την αλεση και φαίνεται ότι περίπου το 40 - 52 % της αρχικής ποσότητας απομακρύνεται και εντοπίζεται στο νερό και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατά τον καθαρισμό των κόκκων, το 28-38 % βρίσκεται στις ίνες το 11-17% στη γλουτένη και στο φύτρο και μόνο το 0,2- 1% στο άμυλο (CRA, 2011).

Σύμφωνα με τον IARC αφλατοξίνες έχουν βρεθεί σε προϊόντα καλαμποκιού όπως σιμιγδάλι ή αλεύρι καλαμποκιού καθώς και σε τρόφιμα με βάση το καλαμπόκι τα οποία δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3.** Προϊόντα καλαμποκιού στα οποία έχουν βρεθεί αφλατοξίνες (IARC, 1993, 2002).

Είδος Προϊόντος	Χώρα	Αριθμός δειγμάτων
Σιμιγδάλι καλαμποκιού	Καναδάς	20
	Γουατεμάλα	22
	Ελβετία	40
	Ρωσία	87
Αλεύρι καλαμποκιού	Αγγλία	13
	Κένυα	283
Τορτίγιες	Μεξικό	217
Τρόφιμα από καλαμπόκι	Βραζιλία	30 από τα 322
Καλαμπόκι και αλεύρι	Κίνα, Ινδία, Ινδονησία	1263 από τα 2541
	Φιλιππίνες, Ταιλάνδη	
Προϊόντα Καλαμποκιού	Μαλαισία, Φιλιππίνες	77 από τα 404

#### **1.9.1.4 Όρια αφλατοξινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του**

Με βάση τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 11881 του 2006 έχουν θεσπιστεί τα όρια αφλατοξινών που είναι: Για το καλαμπόκι που υπόκειται σε διαλογή ή κατεργασία πριν την κατανάλωση ή τη χρήση ως συστατικό τροφίμων σε 5 µg/Kg για την αφλατοξίνη B1 και σε 10 µg/Kg για το σύνολο των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2. Για τα μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και τις παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά σε 0,10 µg/Kg (EC, 2007).

#### **1.9.1.5 Επιπτώσεις αφλατοξινών στην υγεία των καταναλωτών.**

Οι αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2 έχουν καταταχθεί στις καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 1 ενώ οι αφλατοξίνη M1 στις πιθανόν καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 2B. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα η καρκινογόνος δράση της M1 είναι 10 φορές μικρότερη σε σχέση με την B1 (IARC, 1993, 2002).

Η τοξικότητα της ομάδας αυτής των μυκοτοξινών μπορεί να διακριθεί σε οξεία και σε χρόνια. Οξεία τοξικότητα παρατηρείται κατά την κατανάλωση τροφίμων

με υψηλή περιεκτικότητα αφλατοξίνης όπως στην περίπτωση που προαναφέρθηκε στην Κένυα. Η οξεία τοξικότητα λόγω αφλατοξίνης περιλαμβάνει κοιλιακό άλγος πνευμονικό ή εγκεφαλικό οίδημα καταστροφή του ήπατος, άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν ανορεξία, φωτοευαισθησία, ίκτερο, διάρροια (Lewis *et al.*, 2005).

Η χρόνια τοξικότητα είναι αυτή που εμφανίζεται συχνότερα λόγω κατανάλωσης μικρών ποσοτήτων αφλατοξινών για παρατεταμένο διάστημα. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από την ηλικία, το φύλλο, τη διατροφική κατάσταση και το μέγεθος της έκθεσης (Marin *et. al.*, 2013). Οι ασθένειες για τις οποίες ενοχοποιούνται οι αφλατοξίνες λόγω χρόνιας τοξικότητας είναι οι ακόλουθες:

α)Καρκίνος του ήπατος. Υπάρχουν δεδομένα ότι ο ιός της ηπατίτιδα Β και ο ιός της ηπατίτιδας C λειτουργούν συνεργιστικά μαζί με τις αφλατοξίνες στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος (Hepatocellular carcinoma, HCC). Σε περιοχές της Ασίας και της Αφρικής με υψηλά ποσοστά εμφάνισης ηπατικού καρκινώματος τα ποσοστά αυτά αποδίδονται στις λοιμώξεις από ιούς ηπατίτιδας και σε διατροφή με τρόφιμα που περιέχουν αφλατοξίνες (Palliyaguru and Wu, 2013).

β)Επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα. Στους αρένες με παρατεταμένη κατανάλωση αφλατοξινών έχουν παρατηρηθεί καθυστερημένη ή ελαττωματική ανάπτυξη αναπαραγωγικού συστήματος, μειωμένο αναπαραγωγικό δυναμικό, γενετικές ανωμαλίες στα σπερματικά κύτταρα, μειωμένη συγκέντρωση τεστοστερόνης (CAST, 2003).

γ) Επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα. Όπως μειωμένη δραστηριότητα των Τ και Β λεμφοκυττάρων καθώς και παρεμπόδιση της φαγοκύτωσης (Jiang *et al.*, 2008).

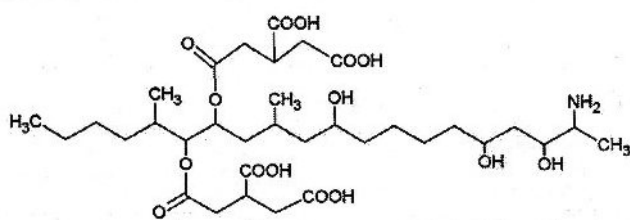
δ) Πιθανή σύνδεση κατανάλωσης αφλατοξινών με το σύνδρομο του Reye. Οι αφλατοξίνες έχουν βρεθεί στο ήπαρ παιδιών που έχουν πεθάνει από το σύνδρομο του Reye, ως εκ τούτου υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν την αιτία για την ασθένεια χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί αυτή η θεωρία (Dvorackova *et al.*, 1977).

ε)Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση λόγω έκθεσης σε αφλατοξίνες, όχι όμως από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων αλλά μέσω της αναπνευστικής οδού (Dvorackova and Pnchova, 1986).

## 1.9.2 Φουμονισίνες

### 1.9.2.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Οι φουμονισίνες είναι μία ομάδα μυκοτοξινών. Η πρώτη φουμονισίνη απομονώθηκε το 1988 από καλλιέργεια του μύκητα *Fusarium verticillioides* (συν. *F. moniliforme*) (Gelderblom *et al.*, 1988). Από τότε τουλάχιστον 18 φουμονισίνες έχουν προσδιοριστεί και ταξινομηθεί σε τέσσερις υποομάδες με βάση τη χημική τους δομή. Οι υποομάδες αυτές είναι οι A, B, C, P (Wan Norhasima *et al.*, 2009). Από αυτές, οι φουμονισίνες B1, B2 και B3 ανιχνεύονται συχνότερα στα τρόφιμα (Krska *et al.*, 2007). Από τοξικολογική άποψη η φουμονισίνη B1 είναι η πιο σημαντική μυκοτοξίνη (IARC, 1993). Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η χημική δομή της φουμονισίνης B1.



Εικόνα 2. Χημική δομή φουμονισίνης B1 ( από Marin *et al.*, 2013)

### 1.9.2.2 Μύκητες που παράγουν φουμονισίνες

Σήμερα είναι γνωστό ότι αρκετά είδη του γένους *Fusarium* παράγουν φουμονισίνες όπως, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. beomiforme*, *F. dlamini*, *F. globosum*, *F. nariforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *F. subglutinans* και *F. thapsinum* (IARC, 2002). Επίσης ο μύκητας *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* έχει βρεθεί ότι παράγει φουμονισίνες που ανήκουν στην B υποομάδα (Abbas & Riley, 1996). Επιπλέον, το είδος *Aspergillus niger* έχει αναφερθεί ότι παράγει φουμονισίνη B2 (Frisvad *et al.*, 2007).

### 1.9.2.3 Ανίχνευση φουμονισινών στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του

Η ομάδα αυτή των μυκοτοξινών έχει βρεθεί σε καλαμπόκι και προϊόντα του ενώ η πιο συχνά απαντώμενη φουμονισίνη είναι η B1 (Thiel *et al.*, 1992).

Τα είδη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* αποτελούν τα σημαντικότερα είδη που παράγουν φουμονισίνες και είναι μεταξύ των πιο κοινών μυκήτων που προσβάλλουν τον αραβόσιτο. Αυτοί οι μύκητες μπορούν να απομονωθούν από τους

περισσότερους πυρήνες αραβοσίτου ακόμα και αυτούς που φαίνονται υγιείς (Pitt *et al.*, 1993). Προκαλούν σήψη των πυρήνων του καλαμποκιού, η οποία αποτελεί τη σημαντικότερη ασθένεια σε θερμές περιοχές όπου καλλιεργείται ο αραβόσιτος (King & Scott, 1981). Τα είδη αυτά παράγουν κυρίως φουμονισίνη B1 και σε μικρότερες ποσότητες φουμονισίνες B2 και B3. Οι τρεις αυτές φουμονισίνες στο καλαμπόκι βρέθηκαν σε αναλογία B1:B2, 3 προς 1 ενώ η αναλογία B1:B3 ήταν 12 προς 1 (Ross *et al.*, 1990, 1992).

Υπάρχει θετική συσχέτιση ως προς την ύπαρξη μυκοτοξινών στο καλαμπόκι και την ανίχνευση προσβολής στον αγρό από τα δύο προαναφερόμενα είδη μυκήτων τα οποία κυριαρχούν στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης (Chulze *et al.*, 1996).

Προσβολή φυτών αραβοσίτου από το είδος *F.verticillioides* λαμβάνει χώρα είτε μέσω των κονιδίων που προσβάλλουν το υπέργειο τμήμα μεταφερόμενα από τον άνεμο ή πάνω στο σώμα εντόμων είτε μέσω των ριζών από μυκήλιο ή κονίδια που υπάρχουν στο έδαφος είτε τέλος μέσω μολυσμένου σπόρου (Munkvold *et al.*, 1997).

Η συγκέντρωση φουμονισινών σε ακατέργαστο καλαμπόκι βρέθηκε αυξημένη όταν επικράτησαν θερμές και ξηρές συνθήκες τις οποίες ακολούθησε περίοδος υψηλής υγρασίας δηλαδή ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης των ειδών *F. verticillioides* και *F. proliferatum*. Στο εργαστήριο η ανάπτυξη των μυκήτων αυτών ευνοείται όταν το aw είναι μεταξύ 0,92 και 0,98 και φτάνει στο μέγιστο όταν η θερμοκρασία είναι 30 °C για το πρώτο είδος και 35 °C για το δεύτερο είδος (Shelby *et al.*, 1994a,b).

Έχει βρεθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις μυκοτοξινών ανιχνεύονται όταν υπάρχει ζημιά από έντομα (Miller, 2000). Επιπλέον διαγονιδιακά φυτά καλαμποκιού που φέρουν γονίδια του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis* εμφάνισαν μικρότερη προσβολή από τα παραπάνω είδη και η συγκέντρωση των φουμονισινών ήταν μικρότερη συγκρινόμενη με μη διαγονιδιακά φυτά (Munkvold *et al.*, 1997).

Η συγκέντρωση φουμονισινών στα προϊόντα καλαμποκιού εξαρτάται κυρίως από την κατεργασία ή την επεξεργασία που αυτά υφίστανται. Ο πυρήνας του αραβόσιτου αποτελείται από το άμυλο, το φύτρο, τη γλουτένη και το περικάρπιο. Οι φουμονισίνες συγκεντρώνονται στο περικάρπιο και στο φύτρο. Συνεπώς ξηρή άλεση που θα απόμακρύνει τα φύτρα, θα δώσει προϊόντα που θα περιέχουν λιγότερη ποσότητα φουμονισινών σε σχέση με τη ξηρή άλεση που περιλαμβάνει τα φύτρα του καλαμποκιού. Η περιεκτικότητα σε φουμονισίνες στα κλάσματα ξηρής άλεσης καλαμποκιού είναι με φθίνουσα σειρά πίτουρο, αλεύρι, σιμιγδάλι, κόκκοι και απολεπισμένοι κόκκοι (IARC, 2002).

Επιπλέον η ποσότητα των φουμονισινών μειώνεται κατά την περαιτέρω επεξεργασία των κλασμάτων του καλαμποκιού με θερμή άλεση και αναφέρεται ότι το 2-15% εντοπίζεται στο νερό και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατά τον καθαρισμό των κόκκων, το 19-41% εντοπίζεται στις φυτικές ίνες, το 9-22% στο φύτρο, το 37-42% στη γλουτένη και δεν ανιχνεύονται καθόλου φουμονισίνες στο άμυλο (CRA, 2011). Η υγρή άλεση ολοκλήρων των κόκκων αραβοσίτου οδηγεί στην παραγωγή κλασμάτων που περιέχουν φουμονισίνες με την εξής φθίνουσα σειρά γλουτένη, φυτικές ίνες, φύτρο και το άμυλο (JECFA, 2001).

Αραβοσιτέλαια, που εξάγονται από φύτρα αραβοσίτου και εξευγενισμένα αραβοσιτέλαια, δεν βρέθηκαν να περιέχουν φουμονισίνες (Patel *et al.*, 1997).

Στον πίνακα 4 δίνεται μια αναφορά σχετικά με την ανίχνευση φουμονισινών σε αραβοσιτάλευρο, σιμιγδάλι αραβοσίτου και pop corn.

**Πίνακας 4.** Ανίχνευση φουμονισινών FB1 και FB2 σε pop corn, αραβοσιτάλευρο και σιμιγδάλι καλαμποκιού σε Αφρική Ευρώπη και Αμερική (Soriano and Dragacci, 2004).

Είδος Προϊόντος	Αριθμός δειγμάτων που βρέθηκε φουμονισίνη B1 στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν	Αριθμός δειγμάτων που βρέθηκε φουμονισίνη B2 στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν
Αφρική		
Σιμιγδάλι καλαμποκιού	46/52	11/52
Ευρώπη		
Αραβοσιτάλευρο	12/16	7/9
Σιμιγδάλι καλαμποκιού	15/23	1/23
Πολέντα*	5/5	5/5
Pop corn	29/51	3/17
Pop corn	12/12 Συνολικά για FB1 και FB2	
Αμερική		
Αραβοσιτάλευρο για παιδικές τροφές	1/3	1/3
Αραβοσιτάλευρο	23/25	20/25
Pop corn	13/21	7/14
Αραβοσιτάλευρο	16/18 Συνολικά για FB1 και FB2	

\* Είδος αλεύρου που παράγεται από το καλαμπόκι στην Ιταλία

Επιπλέον με βάση μεταγενέστερα δεδομένα στην Πορτογαλία η φουμονισίνη B1 βρέθηκε σ' όλα τα δείγματα αραβοσιτάλευρου που εξετάστηκαν και η φουμονισίνη B2 στο 70% των δειγμάτων. Η συγκέντρωση φουμονισίνης ήταν μεταξύ 50-1300ng/g. Φουμονισίνη ανιχνεύθηκε σε δείγματα pop corn στην Πορτογαλία σε συγκέντρωση μεταξύ του 50-400ng/g (Martins *et al.*, 2008b). Στη Βραζιλία δείγματα αραβοσιτάλευρου βρέθηκαν να περιέχουν φουμονισίνη FB1 σε



συγκέντρωση μεταξύ 1100-15300ng/g, ενώ σε σιμιγδάλι καλαμποκιού ανιχνεύθηκε FB2 σε συγκέντρωση μεταξύ 200-3900 ng/g (Bittencourt *et al.*, 2005).

#### **1.9.2.4 Όρια φουμονισινών με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του**

Με βάση τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 11881 του 2006 έχουν θεσπιστεί τα όρια φουμονισινών για το καλαμπόκι και τα προϊόντα του που είναι: Για μη μεταποιημένο αραβόσιτο 4000 µg/Kg, για καλαμπόκι που προορίζεται για άμεση κατανάλωση 1000 µg/Kg, για δημητριακά με βάση τον αραβόσιτο και σνακ με βάση τον αραβόσιτο 800 µg/Kg, για μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά 200 µg/Kg (EC, 2007).

Επίσης με βάση την ορθή γεωργική πρακτική ο FDA έχει ορίσει τα κατωτέρω όρια για το σύνολο των FB1 FB2 και FB3 που είναι α) 2000 ng/g για αποφλοιωμένους κόκκους, κόκκους, σιμιγδάλι αραβοσίτου, αλεύρι αραβοσίτου που προέρχονται από αποφυτρωμένο καλαμπόκι ξηρής άλεσης, β) 4000ng/g για αποφλοιωμένους κόκκους, κόκκους, σιμιγδάλι αραβοσίτου, αλεύρι αραβοσίτου που προέρχονται από ξηρή άλεση ολόκληρου του καλαμποκιού ή μερικώς αποφυτρωμένου, γ) 4000 ng/g για το αλεσμένο πίτουρο καλαμποκιού, δ) 4000ng/g για καθαρισμένο καλαμπόκι που προορίζεται για μαζική παραγωγή και ε) 3000ng/g για καθαρισμένο καλαμπόκι που προορίζεται για pop corn (FDA, 2001) .

#### **1.9.2.5 Επιπτώσεις φουμονισινών στην υγεία των καταναλωτών**

Οι φουμονισίνες έχουν καταταχθεί στις πιθανόν καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 2B (IARC, 1993, 2002). Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί για τον τρόπο δράσης των φουμονισινών που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αλλαγές στις μεταβολικές οδούς που είναι ζωτικής σημασίας για κυτταρικές βιολογικές διεργασίες όπως ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίηση των κυττάρων και απόπτωση. Ο ένας μηχανισμός αναφέρεται σε αλλαγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και συναθροίσεις φωσφολιπιδίων στο ήπαρ (Gelderblom, *et al.*, 2001). Ο δεύτερος αναφέρεται στην αναστολή της σύνθεσης ενζύμου που επάγει τη σύνθεση σφιγγολιπιδίων τα οποία ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών (Merrill *et al.*, 2001).

Οι φουμονισίνες ενοχοποιούνται ότι προκαλούν: καρκίνο του οισοφάγου, καρκίνο του ήπατος, ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα και καρδιαγγειακά προβλήματα (IARC, 2002).

Σε περιοχές όπως Βραζιλία, Κίνα, Ιράν, Βόρεια Ιταλία έχουν διεξαχθεί έρευνες που έχουν συσχετίσει το υψηλό ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του οισοφάγου με την κατανάλωση τροφίμων που περιείχαν φουμονισίνες (IARC, 2002). Αυτή η ασθένεια αποτελεί την έβδομη σε σειρά αιτία θανάτου μεταξύ των ανδρών στη Βραζιλία και έχει συσχετισθεί με το διααιτολόγιο και την κατανάλωση τροφών που προέρχονται από καλαμπόκι και τα προϊόντα του (Van der Westhuizen *et al.*, 2003).

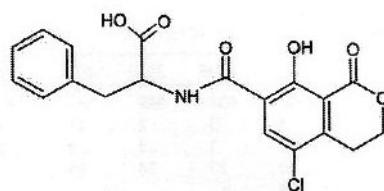
Επίσης στην Κίνα έχουν γίνει έρευνες που δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του υψηλού ποσοστού εμφάνισης καρκίνου του ήπατος και της κατανάλωσης τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε φουμονισίνες (Sun *et al.*, 2007).

Επιπλέον, η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα που είναι οι εκ γενετής ανωμαλίες του εγκεφάλου, της σπονδυλικής στήλης ή του ωτιαίου μυελού φαίνεται ότι συσχετίζεται με την κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε φουμονισίνες (Marasas *et al.*, 2004).

### 1.9.3 Ωχρατοξίνες

#### 1.9.3.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Η ωχρατοξίνη Α αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη Νότια Αφρική ως δευτερογενής μεταβολίτης ενός στελέχους του είδους *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Η ομάδα των ωχρατοξινών ήταν από τις πρώτες ομάδες τοξινών που απομονώθηκαν και αποτέλεσαν μαζί με την αφλατοξίνη την αφορμή για την έναρξη της έρευνα στο τομέα της μυκοτοξικολογίας (Zinedine *et al.*, 2009). Η ομάδα αυτή των τοξινών περιλαμβάνει τις ωχρατοξίνες Α, Β και C. Η ωχρατοξίνη Α αποτελεί την τοξικότερη μυκοτοξίνη της ομάδας αυτής (Ringot *et al.*, 2006). Στην εικόνα 3 φαίνεται η χημική δομή της ωχρατοξίνης Α



**Εικόνα 3.** Χημική δομή ωχρατοξίνης Α ( από Marin *et al.*, 2013)

### 1.9.3.2 Μύκητες που παράγουν ωχρατοξίνη A

Το είδος *Aspergillus ochraceus* σύμφωνα με τους Gams *et al.*, 1985 ανήκει στο *Aspergillus* section *Circumdati*. Το section *Circumdati* που αριθμεί περισσότερα από 20 είδη περιλαμβάνει είδη που παράγουν ωχρατοξίνη A, πενικιλικό οξύ και μια σειρά από άλλους μεταβολίτες αλλά περιλαμβάνει και είδη που δεν παράγουν ωχρατοξίνη A. Μεταξύ των ειδών που παράγουν ωχρατοξίνη A είναι τα *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii* και *A. westerdijkiae*. Είδη του section *Circumdati* που δεν παραγουν ωχρατοξίνη είναι τα *A. auricomus*, *A. bridgeri*, *A. elegans*, *A. insulicola*, *A. neobridgeri*, *A. pallidofulvus* κ.α. (Visagie *et al.*, 2014).

Ωχρατοξίνη A παράγεται και από το είδος *Penicillium verrucosum* το οποίο αποτελεί το σημαντικότερο ωχρατοξιγόνο είδος του γένους *Penicillium* επίσης από το είδος *Penicillium nordicum* (Pitt, 1987, Frisvad and Samson, 2004). Είδη του γένους *Aspergillus* που ανήκουν στο section *Nigri* έχει αναφερθεί ότι παράγουν ωχρατοξίνη A μεταξύ αυτών των ειδών *A. niger* και το είδος *A. carbonarius* που αποτελεί και το κυριότερο είδος του section *Nigri* που παράγει ωχρατοξίνη (Abarca *et al.*, 1994, 2001). Άλλα είδη του γένους *Aspergillus* που ανήκουν στο section *Nigri* και έχει αναφερθεί ότι παράγουν ωχρατοξίνη είναι τα *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* (Samson *et al.*, 2006).

Τα είδη που παράγουν ωχρατοξίνη θεωρούνται μύκητες αποθήκης και έτσι η ωχρατοξίνη παράγεται κάτω από ορισμένες συνθήκες αποθήκευσης και συνήθως δεν ανιχνεύεται πριν τη συγκομιδή (Magnoli *et al.*, 2006). Ωστόσο, σε έρευνα το είδος *P. verrucosum* βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό σε κόκκους δημητριακών πριν την ξήρανση τους γεγονός που υποδηλώνει ότι είχαν μολυνθεί πριν τη συγκομιδή (Elmholt and Rasmussen, 2005).

Γενικά, όταν ανιχνεύεται ωχρατοξίνη σε περιοχές που επικρατούν δροσερές και εύκρατες συνθήκες θεωρείται ότι το είδος που κυρίως ευθύνεται για την ωχρατοξίνη είναι το είδος *P. verrucosum* ενώ όταν η παραπάνω τοξίνη ανιχνεύεται σε περιοχές που επικρατούν τροπικές συνθήκες το είδος που κυρίως ευθύνεται είναι το *Aspergillus ochraceus* και τα συγγενή είδη *A. westerdijkiae*, *A. steynii* (Zinedine *et al.*, 2009).

Τα είδη *Aspergillus niger* και *Aspergillus carbonarius* έχει βρεθεί ότι είναι τα κύρια είδη που παράγουν ωχρατοξίνη σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. (Duarte *et al.*, 2010). Ωστόσο τα παραπάνω είδη απομονώνονται σπάνια από δημητριακά που

προέρχονται από τροπικές περιοχές. Επιπλέον πολύ λίγες απομονώσεις του είδους *A. niger* είναι ικανές να παράγουν ωχρατοξίνη (JECFA, 2008).

### **1.9.3.3 Ανίχνευση ωχρατοξίνης Α στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του**

Η παρουσία ωχρατοξίνης σε δημητριακά όπως ο αραβόσιτος εξαρτάται από την κατάσταση των κόκκων κατά τη συγκομιδή, τις επικρατούσες συνθήκες κατά την ξήρανση και την ποιότητα των εγκαταστάσεων αποθήκευσης (Eskola, 2002). Το είδος *A. ochraceus* προσβάλλει τον αραβόσιτο κατά την αποθήκευση όπως και άλλοι μύκητες ωστόσο δεν είναι τόσο ανταγωνιστικός στον αποικισμό σε σχέση με άλλα είδη μυκήτων που μπορεί να είναι παρόντα (Lee and Magan, 2000).

Κονίδια του είδους *P. verrucosum* που υπάρχουν στο αλεύρι μπορούν να επιβιώσουν για αρκετά χρόνια και γι' αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα κατά την αποθήκευση γιατί αύξηση της υγρασίας μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή μυκοτοξίνης (Cabañas *et al.*, 2008). Ωστόσο από έρευνες σε άλευρα έχει βρεθεί ότι η περιεκτικότητα σε ωχρατοξίνη είναι μικρότερη εφόσον στο αλεύρι δεν περιέχεται το πίτουρο και τα παραπροϊόντα που έχουν και το υψηλότερο ποσοστό αυτής της μυκοξίνης (Cabañas *et al.*, 2008).

Στον πίνακα 5 αναφέρεται η ανίχνευση ωχρατοξίνης σε αραβόσιτο.

**Πίνακας 5.** Ανίχνευση ωχρατοξίνης A σε αραβόσιτο και προϊόντα του (IARC, 1993, Duarte *et al.*, 2010).

Είδος Προϊόντος	Χώρα	Αριθμός δειγμάτων που ανιχνεύθηκε ωχρατοξίνη στο σύνολο δειγμάτων που εξετάστηκαν
Ακατέργαστος αραβόσιτος	Ιταλία	19/70
Αραβόσιτος	Κροατία	19/49
Αραβόσιτος	Ακτή Ελεφαντοστού	16/16
Αραβόσιτος	Μαρόκο	40%
Αραβόσιτος	Πρώην Γιουγκοσλαβία	45/542
Αραβόσιτος	Αίγυπτο	1/3
Αραβόσιτος	Ινδονησία	1/26
Ψωμί από αραβοσιτάλευρο	Πορτογαλία	34/50
Δημητριακά πρωινού με βάση το καλαμπόκι	Καναδάς	6/34
Μίγμα αραβοσίτου και σίκαλης για παιδικές τροφές	Ισπανία	14/15

#### **1.9.3.4 Όρια ωχρατοξίνης A με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του**

Με βάση τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής ένωσης 11881 του 2006 έχουν θεσπιστεί τα όρια της ωχρατοξίνης A τα οποία δεν διαχωρίζουν τον αραβόσιτο από τα άλλα δημητριακά. Τα όρια αυτά είναι: Για μη μεταποιημένα δημητριακά 5μg/Kg, για τα προϊόντα που παράγονται από μη μεταποιημένα δημητριακά 3μg/kg, για μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά 0,50 μg/Kg (EC, 2007).

### 1.9.3.5 Επιπτώσεις ωχρατοξίνης Α στην υγεία των καταναλωτών

Μεταξύ των 30 μυκοτοξινών που έχουν απομονωθεί και περιγραφεί η ωχρατοξίνη Α έχει χαρακτηριστεί ως εμβρυοτοξική, νευροτοξική, γονοτοξική νεφροτοξική και έχει καταταχθεί στην ομάδα 2B των πιθανά καρκινογόνων ουσιών (JECFA, 2001, IARC, 1993).

Στη δεκαετία του 1950 μια σειρά από αναφορές σε Βουλγαρία, Γιουγκοσλαβία και Ρουμανία περιέγραφαν ένα είδος νεφροπάθειας που περιορίζονταν σε κάποιες γεωγραφικές περιοχές των παραπάνω χωρών. Η ασθένεια αυτή οδηγούσε ακόμα και στο θάνατο. Στη πορεία η ασθένεια αυτή χαρακτηρίστηκε ως μια νόσος η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια γνωστή στη βιβλιογραφία ως BEN (Pfohl-Leszkowicz και Manderville, 2007).

Η ωχρατοξίνη Α έχει συνδεθεί με τη Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια καθώς και με τη δημιουργία όγκων στο ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου (Nikolov *et al.*, 1996).

Η ωχρατοξίνη Α είναι η πιο συχνά ευρισκόμενη τοξίνη στο αίμα των ανθρώπων. Ωχρατοξίνη ανιχνεύεται ανά τον κόσμο σε ανθρώπινο αίμα στο οποίο και παραμένει για μεγάλο διάστημα (χρόνος ημιζωής 35 ημέρες). Μετά την απορρόφηση της πιστεύεται ότι συνδέεται με την αλβουμίνη του ορού του αίματος. Έχει αναφερθεί επίσης αλληλεπίδρασή της με αφλατοξίνες. (Farohunda *et al.*, 2014).

Υπάρχει αμφισβήτηση σχετικά με τη γονοτοξικότητα της με ένα αριθμό των επιστημόνων να υποστηρίζει ότι είναι γονοτοξική ενώ άλλοι να υποστηρίζουν ότι δεν είναι ο μηχανισμός της γονοτοξικότητας αυτός που ευθύνεται για την καρκινογένεση στα πειραματόζωα (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007).

Με βάση τη μελέτη της διατροφής του ανθρώπου καθώς και την ανίχνευση ωχρατοξίνης στο αίμα θεωρείται ότι η έκθεση των ανθρώπων στην ωχρατοξίνη είναι της τάξης 1-2 ng/ kg για κάθε μέρα. Αν και η ωχρατοξίνη βρίσκεται σε μια σειρά από τρόφιμα όπως καφές και κρασί θεωρείται ότι ο κίνδυνος της ανθρώπινης υγείας από την ωχρατοξίνη προέρχεται από τα δημητριακά ενώ η πρόσληψη λόγω της κατανάλωσης καφέ είναι της τάξης 0,06 ng/Kg (Moss, 2000 ).

## 1.9.4 Κιτρινίνη

### 1.9.4.1 Δομή και φυσικές ιδιότητες

Η κιτρινίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από καλλιέργεια του μύκητα *Penicillium citrinum* (Hetherington and Raistrick, 1931). Αργότερα πραγματοποιήθηκαν έρευνες που έδειξαν ότι κιτρινίνη μπορεί να παράγουν και άλλα είδη μυκήτων όπως είδη του γένους *Monascus* όπως το είδος *Monascus purpureus* και το είδος *Monascus rubber* (Blanc *et al.*, 1995a).

Αρχικά η κιτρινίνη χρησιμοποιήθηκε ως αντιβιοτικό λόγω της δράσης της ενώ η χρήση της σταμάτησε πολύ αργότερα όταν έρευνες απέδειξαν την τοξικότητα της (Xu *et al.*, 2006). Ωστόσο είδη του γένους *Monascus* χρησιμοποιούνταν επί σειρά δεκαετιών στη βιομηχανία τροφίμων. Έτσι λοιπόν θεωρείται ότι οι άνθρωποι έχουν εκτεθεί στη κιτρινίνη περισσότερο από ότι θα ήταν αναμενόμενο (Flajs and Peraica, 2009).

### 1.9.4.2 Μύκητες που παράγουν κιτρινίνη

Το είδος *P. citrinum* είναι είδος με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και πολύ συχνά αποικίζει τα τρόφιμα και ζωοτροφές και θεωρείται ως ο κυριότερος μύκητας που παράγει κιτρινίνη. Έχει απομονωθεί από δημητριακά μεταξύ των οποίων και ο αραβόσιτος καθώς επίσης και από άλευρα.

Εκτός από το μύκητα *P. citrinum* απομονώσεις του είδους *P. verrucosum* μπορούν να παράγουν κιτρινίνη (Frisvad and Samson, 2006). Επιπλέον και άλλα είδη του γένους *Penicillium*, έχει βρεθεί ότι παράγουν κιτρινίνη μεταξύ των οποίων τα *P. expansum*, *P. radicolica*, *Penicillium decaturense* επιπλέον τα είδη *Aspergillus alabamensis*, *Aspergillus carneus*, *Aspergillus niveus* παράγουν κιτρινίνη (EFSA, 2013).

### 1.9.4.3 Ανίχνευση κιτρινίνης στον αραβόσιτο και τα προϊόντα του

Η κιτρινίνη έχει βρεθεί σε έναν αριθμό δειγμάτων που προορίζονταν για ανθρώπινη διατροφή από περιοχές της Βουλγαρίας όπου ενδημούσε η Ενδημική Βαλκανική Νεφροπάθεια σε ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 27-44% καθώς και σε περιοχές που είχε εμφανιστεί σποραδικά σε ποσοστό 10-15%. Επίσης έχει βρεθεί σε δείγματα κίτρινου καλαμποκιού στην Αίγυπτο καθώς και σε αλεύρι από καλαμπόκι

στην Ιαπωνία, χωρίς όμως να ανιχνευθεί σε άμυλο αραβοσίτου και σε νιφάδες αραβοσίτου στην ίδια έρευνα. Τέλος έχει ανιχνευθεί σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση με βάση το καλαμπόκι στη Δημοκρατία της Γκάνα (EFSA, 2012).

#### **1.9.4.4 Όρια κιτρινίνης με βάση την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τον αραβόσιτο και τα προϊόντα του**

Επί του παρόντος δεν υπάρχει αναφορά για επιτρεπτά όρια για την κιτρινίνη και ένας από τους λόγους είναι ή έλλειψη αναλυτικών μεθόδων ρουτίνας για τον εντοπισμό των υπολειμμάτων σε προϊόντα (Xu *et al.*, 2006).

#### **1.9.4.5 Επιπτώσεις κιτρινίνης στην υγεία των καταναλωτών**

Έρευνες έδειξαν ότι είναι ηπατο – νεφρο τοξική σε πειραματόζωα. Συγκεκριμένα ότι έχει επιδράσεις στη λειτουργία των νεφρικών μιτοχονδρίων και επάγει τη βιοσύνθεση μακρομορίων που θεωρείται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων. Συνήθως βρίσκεται σε τρόφιμα όπως δημητριακά μαζί με την ωχρατοξίνη και θεωρείται ότι δρουν συνεργιστικά. Επίσης έχει ενοχοποιηθεί ως αίτιο της Ενδημικής Βαλκανικής Νεφροπάθειας (Xu *et al.*, 2006).

Μελέτες έχουν δείξει την εμβρυοτοξικότητα της σε πειραματόζωα καθώς και ότι έχει τερατογόνες ιδιότητες. Σύμφωνα με τον IARC οι περιορισμένες ενδείξεις δεν είναι αρκετές για να καταταχθεί στην ομάδα των πιθανά καρκινογόνων ουσιών για τον άνθρωπο και έχει καταταχθεί στην ομάδα 3. Ωστόσο έρευνες έχουν δείξει ότι αυξάνει την καρκινογόνο ιδιότητα της ωχρατοξίνης όταν βρίσκεται μαζί με αυτή στα τρόφιμα (Ostry *et al.*, 2013).

Τέλος έχει αποδειχθεί η τοξική της δράση στα T κυττάρα του ανθρώπου αυξάνοντας τον κίνδυνο για εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων (Wichmann *et al.*, 2002).

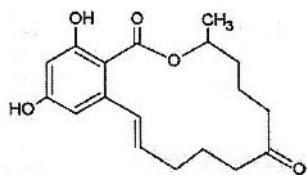
### **1.9.5 Ζεαραλενόνες**

#### **1.9.5.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες**

Οι ζεαραλενόνες είναι ομάδα μυκοτοξινών στην οποία ανήκουν μια σειρά από δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων με σημαντικότερους την ζεαραλενονη Α και ζεαραλενονη Β (Richardson *et al.*, 1985).



Πρόκειται για σταθερά μόρια σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι και 150 °C). Διάσπασή τους έχει παρατηρηθεί σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες ή σε αλκαλικές συνθήκες (Ryu *et al.*, 1999). Επομένως η σταθερότητα του μορίου τους δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία του μαγειρέματος παρά μόνο αν αυτό γίνεται υπό αλκαλικές συνθήκες οπότε και παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του μορίου τους που έφθασε στο 40% (EFSA, 2011a). Η χημική δομή της ζεαραλενόνης φαίνεται στην εικόνα 4.



**Εικόνα 4.** Χημική δομή της ζεαραλενόνης (από Marin *et al.*, 2013)

### 1.9.5.2 Μύκητες που παράγουν ζεαραλενόνες

Οι ζεαραλενόνες παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium* με κυριότερο το είδος *F. graminearum* (συν. *F. roseum*), ενώ επίσης τα είδη *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*, *F. verticillioides*, *F. incarnatum* έχει βρεθεί ότι παράγουν τη μυκοτοξίνη. Οι μύκητες αυτοί προσβάλλουν τα φυτά στο στάδιο της άνθησης όταν επικρατούν υγρές συνθήκες και σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο η ανάπτυξη αυτών των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη συγκομιδή εάν οι συνθήκες αποθήκευσης είναι ακατάλληλες (EFSA, 2011a).

### 1.9.5.3 Ανίχνευση ζεαραλενόνων στον αραβόσιτο

Η ζεαραλενόνη Α βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα σε κόκκους καλαμποκιού σε ποσοστό 33% των εξεταζόμενων δειγμάτων καθώς και σε προϊόντα άλεσης με βάση το καλαμπόκι σε ποσοστό 44%. Τα υποπροϊόντα που προέκυψαν από τον καθαρισμό κατά τη διαδικασία της άλεσης είχαν από 3-30 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις από τους καθαρισμένους κόκκους και επίσης στο πύτουρο βρέθηκαν διπλάσιες συγκεντρώσεις (EFSA, 2011a).

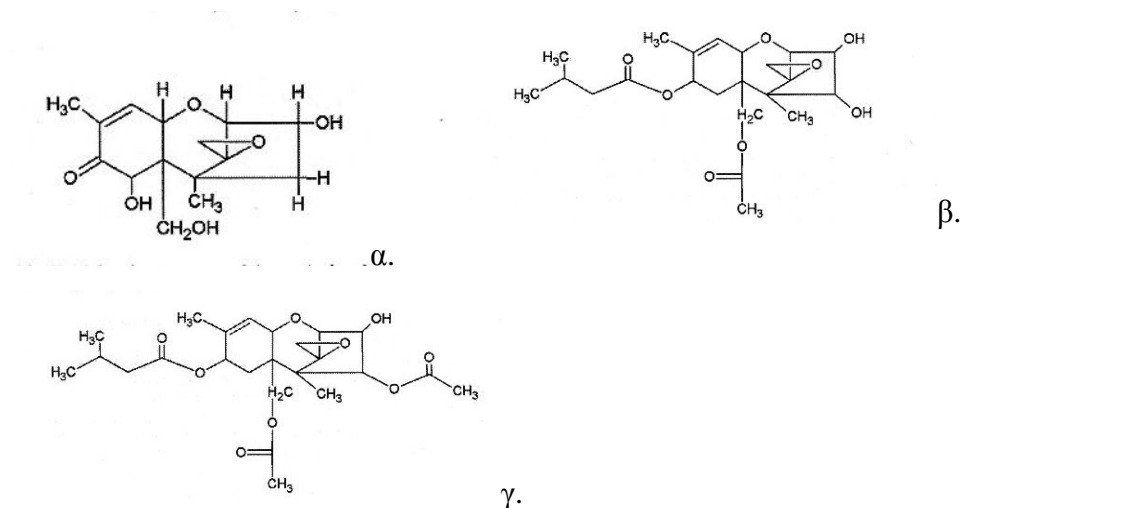
### 1.9.5.4 Επιπτώσεις ζεαραλενόνων στην υγεία των καταναλωτών

Όλες οι ζεαραλενόνες είναι οιστρογονικές ενώσεις, ενώ εντονότερη οιστρογόνο δράση έχει η ζεαραλενόνη Α σε σχέση με τη ζεαραλενόνη Β (Hagler *et al.*, 1979). Η έντονη οιστρογόνο δράσης της ζεαραλενόνης Α πιθανόν οφείλεται στη μεγαλύτερη συγγένεια του μορίου της ένωσης με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (Fitzpatrick *et al.*, 1989).

## 1.9.6 Τριχοθηκινες

### 1.9.6.1 Χημική δομή και φυσικές ιδιότητες

Έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί περίπου 170 ενώσεις που ανήκουν στις τριχοθηκίνες και έχουν καταταχθεί στις παρακάτω τέσσερις υποομάδες Α, Β, C, D. Οι κυριότερες υποομάδες είναι η Α και Β με την υποομάδα Α να εκπροσωπείται από την HT-2 και την T2 τοξίνη ενώ η υποομάδα Β από τη δεοξυνιβαλενολη (DON) (Grove, 1988, 1993). Οι τριχοθηκίνες είναι πολύ σταθερά μόρια και δε διασπώνται κατά την αποθήκευση, την άλεση, τις υψηλές θερμοκρασίες, την επεξεργασία ή το μαγείρεμα (Eriksen and Alexander, 1998). Η χημική δομή των τριχοθηκινών φαίνεται στην εικόνα 5.



**Εικόνα 5.** Χημική δομή τριχοθηκινών α) δεοξυνιβαλενολη, β) HT-2, γ) T2 ( από Marin *et al.*, 2013)

### **1.9.6.2 Μύκητες που παράγουν τριχοθηκίνες**

Οι τριχοθηκίνες των υποομάδων Α και Β παράγονται από αρκετά είδη του γένους *Fusarium* (Thrane, 2001), αλλά και από κάποια είδη του γένους *Trichoderma* (Nielsen *et al.*, 2005). Οι τοξίνες T-2 και HT-2 παράγονται από τα είδη *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum* ενώ η δεοξινιβαλενόλη παράγεται από τα είδη *F. graminearum*, *F. culmorum*, και *F. cerealis* (Eriksen and Alexander, 1998).

### **1.9.6.3 Ανίχνευση τριχοθηκινών στον αραβόσιτο**

Στον αραβόσιτο η δεοξινιβαλενόλη έχει εντοπιστεί σε καλαμπόκι στο 89% των εξετασθέντων δειγμάτων (SCOOP, 2003) αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παρότι όπως αναφέρεται παραπάνω πρόκειται για σταθερά μόρια που γενικά δε διασπώνται στις υψηλές θερμοκρασίες προϊόντα με βάση το σιτάρι και τον αραβόσιτο μεταξύ των οποίων δημητριακά πρωινού, μπισκότα, ζυμαρικά, ψωμί περιείχαν συγκεντρώσεις δεοξινιβαλενόλης πολύ χαμηλότερες σε σχέση με την πρώτη ύλη γεγονός που σημαίνει ότι οι υψηλές θερμοκρασίες που μεσολάβησαν κατά το ψήσιμο οδήγησαν σε μείωση της ποσότητας δεοξινιβαλενόλης (Bullerman and Bianchini, 2007).

Σε ότι αφορά τις τοξίνες T-2 και HT-2 η βρώμη γενικά περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό και υψηλότερες συγκεντρώσεις τις τοξίνες αυτές, σε αντίθεση με τον αραβόσιτο και το σιτάρι. Η επεξεργασία των δημητριακών κατανέμει τις παραπάνω τοξίνες στα διάφορα κλάσματα. Από μετρήσεις των συγκεντρώσεων των τριχοθηκινών στα κλάσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία άλεσης οι τοξίνες αυτές εντοπίζονται κυρίως στο περίβλημα των κόκκων με συνέπεια η συγκέντρωσή τους να είναι αυξημένη στο πίτουρο (EFSA, 2011c).

### **1.9.6.4 Επιπτώσεις τριχοθηκινών στην υγεία των καταναλωτών**

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι οι συγκεκριμένες μυκοτοξίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση (Cundliff and Davies, 1977). Επίσης η T-2 τοξίνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και RNA (WHO, 1990).

Στους πίνακες που ακολουθούν αναφέρονται οι κυριότερες μυκοτοξίνες που ανιχνεύονται στα δημητριακά και το γένος, section, είδος των αντίστοιχων μυκοτοξικογόνων μυκήτων (Πίν. 6) καθώς και οι συνθήκες υπό τις οποίες ευνοείται η παραγωγή μυκοτοξινών από συγκεκριμένα είδη μυκοτοξικογόνων μυκήτων (Πίν. 7).

**Πίνακας 6.** Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που ανιχνεύονται στα δημητριακά και το γένος, section, είδος των αντίστοιχων μυκοτοξικογόνων μυκήτων

Μυκοτοξίνη	Γένος	Section	Είδος
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>A. arachidicola</i>
			<i>A. bombycis</i>
			<i>A. flavus</i>
			<i>A. minisclerotium</i>
			<i>A. nomius</i>
			<i>A. parasiticus</i>
			<i>A. parvisclerotigenus</i>
			<i>A. pseudotamarii</i>
Φουμονισίνες	<i>Fusarium</i>		<i>F. verticillioides</i>
			<i>F. proliferatum</i>
			<i>F. anthophilum</i>
			<i>F. beomiforme</i>
			<i>F. dlamini</i>
			<i>F. globosum</i>
			<i>F. napiforme</i>
			<i>F. nygamai</i>
			<i>F. oxysporum</i>
			<i>F. polyphialidicum</i>
			<i>F. subglutinans</i>
			<i>F. thapsinum</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>
<i>Alternaria</i>		<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersicii</i>	
Ωχρατοξίνη A	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>A. cretensis</i>
			<i>A. flocculosus</i>
			<i>A. fresenii</i>
			<i>A. muricatus</i>
			<i>A. ochraceus</i>
			<i>A. pseudoelegans</i>
			<i>A. pulvericola</i>
			<i>A. roseoglobulosus</i>
			<i>A. sclerotiorum</i>
			<i>A. steynii</i>
	<i>A. westerdijkiae</i>		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>
			<i>A. carbonarius</i>
			<i>A. lacticoffeatus</i>
		<i>A. sclerotioniger</i>	
<i>Penicillium</i>		<i>P. verrucosum</i>	
		<i>P. nordicum</i>	
Κιτρινίνη	<i>Penicillium</i>		<i>P. citrinum</i>
			<i>P. verrucosum</i>
			<i>P. expansum</i>
			<i>P. radicola</i>

Μυκοτοξίνη		Γένος	Section	Είδος	
Κιτρινίνη		<i>Monascus</i>		<i>M. purpureus</i>	
				<i>M. rubber</i>	
		<i>Aspergillus</i>		<i>A. alabamensis</i>	
				<i>A. carneus</i>	
<i>A. niveus</i>					
Ζεαραλενόνες		<i>Fusarium</i>		<i>F. graminearum</i>	
				<i>F. culmorum</i>	
				<i>F. equiseti</i>	
				<i>F. cerealis</i>	
				<i>F. verticillioides</i>	
				<i>F. incarnatum</i>	
Τριχοθηκίνες	Δεοξινιβαλενόλη	<i>Trichoderma</i>			
				<i>Fusarium</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
				<i>F. langsethiae</i>	
	T-2 και HT-2	<i>Fusarium</i>			<i>F. acuminatum</i>
					<i>F. graminearum</i>
					<i>F. culmorum</i>
				<i>F. cerealis.</i>	

**Πίνακας 7.** Συνθήκες που εννοούν την παραγωγή μυκοτοξινών από συγκεκριμένα είδη μυκοτοξικογόνων μυκήτων (Montani *et al.* 1988, Murphy *et al.* 2006)

Είδος Μύκητα	Μυκοτοξίνη	Θερμ/σία °C	Aw
<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus</i>	Αφλατοξίνη	33	0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ωχρατοξίνη	30	0,98
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ωχρατοξίνη	25	0,90 - 0,98
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ωχρατοξίνη	15 - 20	0,85 - 0,90
<i>Fusarium verticillioides,</i> <i>F. proliferatum</i>	Φουμονισίνη	10- 30	0,93
<i>Fusarium verticillioides,</i> <i>F. proliferatum</i>	Δεοξυνιβαλενονη	11	0,90
<i>Fusarium graminearum</i>	Ζεαραλενόνη	25 - 30	0,98
<i>Penicillium expansum</i>	Πατουλίνη	0 - 25	0,95 -0,99
<i>Penicillium citrinum</i>	Κιτρινίνη	26-30	0,95

## **1.10 Τεχνικές προσδιορισμού μυκοτοξινών**

Για την ανίχνευση των μυκοτοξινών χρησιμοποιούνται μια σειρά από μεθόδους. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών πρέπει να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια όπως: α) προσδιορισμός ομάδας μυκοτοξινών, β) ταχύτητα, γ) ακρίβεια, δ) δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συγκεντρώσεων (Pittet, 2005).

### **1.10.1 Τεχνικές Χρωματογραφίας**

Στο παρελθόν η πιο διαδεδομένη τεχνική ήταν η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Σήμερα εφαρμόζεται κυρίως η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) για την οποία απαιτείται οι προς εξέταση μυκοτοξίνες να είναι ανθεκτικές στις υψηλές θερμοκρασίες, (κάτι που συμβαίνει με τις περισσότερες) καθώς και να είναι πτητικές ή να μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Επίσης εφαρμόζεται η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) η οποία αποτελεί την πλέον επίσημη τεχνική και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την ανίχνευση των μυκοτοξινών (Moss, 2000).

Οι μυκοτοξίνες συνδέονται σε σύμπλοκα με άλλα μακρομόρια όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια επίσης κάποιες από αυτές είναι υδρόφιλα και άλλες λιπόφιλα μόρια. Συνήθως μετά την προετοιμασία του δείγματος και πριν τη χρωματογραφία απαιτείται ένας καθαρισμός του δείγματος για την απομάκρυνση ελαίων και λιπών. Η διαδικασία καθαρισμού του δείγματος εξαρτάται από την μυκοτοξίνη και το προς εξέταση προϊόν (Moss, 2000).

### **1.10.2 Ενζυμική Δοκιμή Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA)**

Η τεχνική της ELISA εφαρμόζεται επίσης για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών και πλεονεκτεί στο ότι παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το πλεονέκτημά αυτό είναι σημαντικό όταν απαιτούνται συχνοί έλεγχοι για πιθανή μόλυνση με μυκοτοξίνες ενός μεγάλου αριθμού προϊόντων και ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ωστόσο η ακρίβεια της αμφισβητείται. Επιπλέον η εξειδίκευση των μονόκλωνων αντισωμάτων επιτρέπει

τον έλεγχο για μεμονωμένες μυκοτοξίνες όπως είναι η αφλατοξίνη B1 ή M1. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μειωμένη ακρίβεια της (Moss, 2000).

Η εφαρμογή των παραπάνω τεχνικών σε μια σειρά από βιβλιογραφικές αναφορές βασίζονται στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης των μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ίδιο το προϊόν ή το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των μυκοτοξιγόνων μυκήτων που απομονώθηκαν από το προς εξέταση προϊόν.

### **1.10.3 Προσδιορισμός μυκοτοξινών με την χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών ανάπτυξης μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες**

Οι απομονώσεις ίδιου είδους μυκήτων διαφέρουν μεταξύ τους γενετικά. Μεταξύ των απομονώσεων μυκοτοξικογόνων μυκήτων του ίδιου είδους υπάρχει διαφοροποίηση ως προς την ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών. Για παράδειγμα μόνο το 40% των απομονώσεων του είδους *Aspergillus flavus* παράγουν αφλατοξίνη, ενώ σχεδόν όλες οι απομονώσεις του είδους *Aspergillus parasiticus* παράγουν αφλατοξίνη. (Klich and Pitt, 1988).

Ήδη από το 1960 ένα από τα αντικείμενα της έρευνας αποτέλεσε η παρασκευή ενός εξειδικευμένου θρεπτικού υλικού ανάπτυξης μυκοτοξικογόνων μυκήτων, με τη χρήση του οποίου να είναι δυνατή η ανίχνευση μυκοτοξινών μέσω του φθορισμού ύστερα από παρατήρηση υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Χρησιμοποιήθηκαν σύνθετα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιείχαν εκτός από άγαρ διάφορα άλατα καθώς και εκχυλίσματα ή αποστάγματα από υλικά όπως φιστίκια ή καλαμπόκι. (Davis *et al.*, 1987). Οι Lin και Dianese, (1976), πρώτοι περιέγραψαν τη παρασκευή ενός θρεπτικού μέσου που περιείχε άγαρ και καρύδα για το γρήγορο προσδιορισμό αφλατοξίνης. Έκτοτε και άλλοι ερευνητές ασχολήθηκαν χρησιμοποιώντας την καρύδα ως πρώτη ύλη για την παρασκευή τέτοιων θρεπτικών υλικών.

Οι Dyer και McCammon, (1994), σε έρευνα τους διαπίστωσαν ότι μεταξύ των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης αφλατοξιγόνων μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αφλατοξίνης, το Coconut Cream Agar αποτελεσε το καλύτερο θρεπτικό υλικό για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης μέσω του φθορισμού ύστερα από παρατήρηση υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα της έρευνας τους συσχετίστηκαν μέσω ανάλυσης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Στο 90,5% των απομονώσεων στο οποίο παρατηρήθηκε φθορισμός σε Coconut Cream

Agar, ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη μέσω TLC. Σε μετέπειτα έρευνες το Coconut Cream Agar προσδιορίστηκε ως κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανίχνευση ωχρατοξίνης που παράγεται από μύκητες του είδους *Aspergillus carbonarius* και από μύκητες του *Aspergillus section Circumdati* (Heenan *et al.*, 1998) καθώς και για την ανίχνευση κιτρινίνης που παράγεται από το μύκητα *Penicillium citrinum* (Mohamed *et al.*, 2013).

#### **1.10.4 Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) περιγράφηκε αρχικά από τον Kary Mullis το 1983. Η PCR επιτρέπει την αντιγραφή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας -στόχου του DNA ώστε να παραχθούν δεκάδες εκατομμύρια πανομοιότυπα αυτής της αλληλουχίας. Η PCR πραγματοποιείται με ειδικά σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτιδια - εκκινητές τα οποία προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας στόχου και οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να αντιγραφεί. Η αντιγραφή του συγκεκριμένου τμήματος πραγματοποιείται με τη βοήθεια θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω εναλλαγής θερμοκρασιών και επαναλαμβανόμενων κύκλων ( Seidman, 2011).

Έχει αποδειχθεί ότι απαιτούνται 21 ενζυματικά βήματα για την βιοσύνθεση των αφλατοξινών και τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτά τα βήματα έχουν προσδιοριστεί. Η βιοσύνθεση των αφλατοξινών ξεκινάει με τη σύνθεση ενός πολυκετιδίου (Bhatnagar *et al.*, 2003). Έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές για τον εντοπισμό αυτών των γονιδίων μεταξύ των οποίων εκκινητές για το γονίδιο *afl R* (Manonmani *et al.*, 2005).

Το *fum5* γονίδιο (που μετονομάστηκε αργότερα ως *fum1*) ήταν το πρώτο κλωνοποιημένο και πλήρως χαρακτηρισμένο μέλος της συστάδας γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή φουμονισίνης. Ανήκει σε μια ομάδα 15 γονιδίων εννέα από τα οποία θεωρείται ότι εμπλέκονται στο σχηματισμό φουμονισίνης. (Proctor *et al.*, 1999). Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης φουμονισίνης ξεκινάει με το σχηματισμό ενός πολυκετιδίου όπως συμβαίνει και με την αφλατοξίνη (Desjardins and Proctor 2007, Proctor *et al.*, 1999). Είναι εφικτή η ανίχνευση του γονιδίου *fum1* μέσω PCR διότι έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές που υβριδίζουν στα άκρα του (Bluhm *et al.*, 2004). Γενετική ανάλυση δύο στελεχών έδειξε ότι οι αλλαγές στην περιοχή του *fum1* γονιδίου, θα μπορούσαν να εμποδίσουν την παραγωγή



φουμονισίνης. Ως εκ τούτου, η χρήση εκκινητών που στοχεύουν στο γονίδιο *fumI* αποτελεί μια καλή επιλογή για το χαρακτηρισμό της μυκοτοξικογόνου ικανότητας στελεχών του γένους *Fusarium* (Desjardins *et al.*, 1992).

Η βιοσύνθεση της ωχρατοξίνης ξεκινάει με τη σύνθεση επίσης ενός πολυκετιδίου. Η μεταβολική οδός είναι παρόμοια με τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών και φουμονισινών. Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό της συνθάσης του πολυκετιδίου που αποτελεί την πρόδρομη ένωση της ωχρατοξίνης έχουν ταυτοποιηθεί για τα διάφορα είδη μυκήτων που παράγουν ωχρατοξίνη Α αυτά είναι τα *awksI* για το είδος *Aspergillus westerdijkiae*, *otapksPN* για το είδος *P. nordicum* και *pks* για το είδος *Aspergillus ochraceus*. Επίσης έχουν σχεδιαστεί εξειδικευμένοι εκκινητές για τον εντοπισμό των γονιδίων που επάγουν το σχηματισμό της ωχρατοξίνης Α τόσο για το *Aspergillus* section *Nigri* όσο για το *Aspergillus* section *Circumdati* και για τα είδη *Penicillium verrucosum* και *Penicillium nordicum* (Khoury and Atoui, 2010).

### 1.11 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στην Ελλάδα δεν έχει δημοσιευθεί έρευνα αναφορικά με την ανίχνευση μυκήτων και μυκοτοξινών σε δημητριακά ή προϊόντα αυτών.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν δύο εμπορικά προϊόντα που προέρχονται από τον αραβόσιτο, ποπ κορν και αραβοσιτάλευρο με σκοπό:

1. Να ελεγχθούν αυτά τα προϊόντα αναφορικά με την προσβολή τους από μυκοτοξικογόνους μύκητες.
2. Να προσδιοριστεί η μυκοτοξικογόνος ικανότητα των απομονωθέντων μυκήτων με την εφαρμογή:
  - α. Μοριακών τεχνικών (ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή μυκοτοξινών).
  - β. Τεχνικών που βασίζονται σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά (παραγωγή μυκοτοξινών).





## **2. 1. Απομόνωση μυκήτων από κόκκους pop corn και από αραβοσιτάλευρο.**

### **2.1.1 Δείγματα κόκκων pop corn**

Επτά συσκευασίες κόκκων pop corn 500 γραμμαρίων (Εικ. 6) εξετασθήκαν ως προς την επιμόλυνση των κόκκων με μύκητες. Τα προϊόντα είναι προϊόντα που διατίθενται στην τοπική αγορά του Βόλου. Σύμφωνα με τα αναγραφόμενα στη συσκευασία χώρες προέλευσης των δειγμάτων ήταν η Αμερική (1 συσκευασία), η Αργεντινή (4 συσκευασίες), ενώ 2 συσκευασίες ήταν άγνωστης προέλευσης. Οι συσκευασίες των δειγμάτων αποθηκευτήκαν σε θερμοκρασία δωματίου και εξετάστηκαν την πρώτη εβδομάδα μετά την αγορά.

Μετά την εξέτασή τους τα δείγματα διατηρήθηκαν στην αρχική τους συσκευασία σε θερμοκρασία 1-2 °C για περαιτέρω ανάλυση.



**Εικόνα 6.** Δείγματα κόκκων pop corn

### **2.1.2 Δείγματα αλεύρου από αραβόσιτο**

Συνολικά εξετάστηκαν δύο συσκευασίες αραβοσιτάλευρου 500 γραμμαρίων. Η μία προέρχονταν από τοπικό κατάστημα γνωστής βιομηχανίας τροφίμων ενώ η δεύτερη από τοπικό αλευρόμυλο. Στη συνέχεια οι συσκευασίες αποθηκευτήκαν σε θερμοκρασία δωματίου και εξετάστηκαν την πρώτη εβδομάδα μετά την αγορά. Σύμφωνα με τα αναγραφόμενα στις συσκευασίες το πρώτο δείγμα προέρχονταν από την Ευρωπαϊκή Ένωση και το δεύτερο δείγμα ήταν άγνωστης προέλευσης.

Μετά την εξέτασή τους τα δείγματα διατηρήθηκαν στην αρχική τους συσκευασία σε θερμοκρασία 1-2 °C για περαιτέρω ανάλυση.

### **2.1.3 Παρασκευή θρεπτικών μέσων και διαλυμάτων**

Για την απομόνωση των μυκήτων από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο απαιτήθηκε η παρασκευή των κάτωθι θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων:

#### **2.1.3.1. Θρεπτικό υλικό dichloran 18% glycerol agar**

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μυκήτων από τους κόκκους pop corn ήταν το Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18). Οι Hocking και Pitt (1980) παρασκεύασαν το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό DG18 για απομόνωση μυκήτων από τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, όπως αποθηκευμένα δημητριακά, ξηροί καρποί, αλεύρι και μπαχαρικά. Το συγκεκριμένο υλικό έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων των γενών *Aspergillus.*, *Penicillium* και *Fusarium* (Pitt and Hocking, 2009).

Για την παρασκευή του υλικού απαιτούνται:

10 gr γλυκόζη, 5 gr πεπτόνη, 1gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 220 gr γλυκερόλη, 15 gr αγαρ, 2mgr dichloran (0,2% βάρος ανά όγκο διαλυμένο σε 1 ml αιθανόλης), 100 mgr cloramphenicol και 1000 ml περίπου απιονισμένο νερό. Για να παρασκευασθεί το θρεπτικό υλικό, προστίθενται όλα τα συστατικά εκτός της γλυκερόλης σε 800 ml απιονισμένου νερού. Ακολουθεί θέρμανση μέχρι να διαλυθεί το άγαρ, στη συνέχεια, προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου ενός λίτρου και τέλος προστίθεται η γλυκερόλη. Το θρεπτικό υλικό στη συνέχεια αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά. Ο συντελεστής aw αυτού του υλικού είναι 0,955 και το pH είναι μεταξύ 5,5 και 5,8.

#### **2.1.3.2 Θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar**

Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού Potato Dextrose Agar απαιτούνται:

200 gr πατάτες, 15 gr δεξτρόζη, 15 gr αγαρ, και 1000 ml περίπου απιονισμένο νερό

Για να παρασκευασθεί το θρεπτικό υλικό, οι πατάτες καθαρίζονται πλένονται και βράζουν σε 500 ml απιονισμένου νερού για 30-45 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά του νερού σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθεται το άγαρ αφού πρώτα διαλυθεί. Τέλος προστίθεται η δεξτρόζη και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Ακολουθεί θέρμανση μέχρι να διαλυθεί το άγαρ και η δεξτρόζη. Το υλικό μετά την προετοιμασία του αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά.

### **2.1.3.3 Υδατικό διάλυμα πεπτόνης**

Για το υδατικό διάλυμα της πεπτόνης απαιτούνται: 1gr πεπτόνη, 8,5 gr NaCl και 1000 ml απιονισμένο νερό. Η πεπτόνη και το NaCl προστίθενται στο νερό και διαλύονται. Στη συνέχεια το διάλυμα διανέμεται σε κωνικές φιάλες και ακολουθεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 121 °C.

### **2.1.3.4 Διάλυμα οικιακής χλωρίνης**

Για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιείται οικιακή χλωρίνη και απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10.

### **2.1.4 Απομόνωση μυκήτων από κόκκους pop corn με τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης**

Για την απομόνωση και απαρίθμηση μυκήτων από σπόρους δημητριακών και ξηρούς καρπούς η μέθοδος που ενδείκνυται είναι η μέθοδος της άμεσης επίστρωσης (Direct Plating) η οποία περιλαμβάνει την επιφανειακή απολύμανση των κόκκων πριν την επίστρωση τους σε στερεό θρεπτικό υλικό. Η επιφανειακή απολύμανση απομακρύνει τη σκόνη και τυχόν σπόρια μυκήτων ή άλλους μικροοργανισμούς από την επιφάνεια των κόκκων και επιτρέπει την ανάπτυξη των σπορίων μυκήτων που έχουν διεισδύσει στους κόκκους (Pitt and Hocking, 1997).

Για την απομόνωση μυκήτων από τους κόκκους pop corn ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της άμεσης επίστρωσης σύμφωνα με τους Hocking *et al.*, (2006a), με μικρή τροποποίηση στο χρόνο παραμονής στο διάλυμα χλωρίνης.

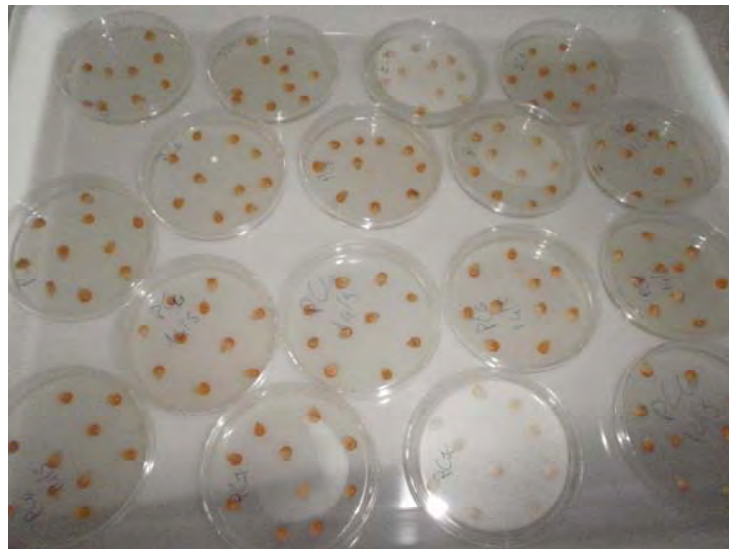
Σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο:

Η επιφανειακή απολύμανση περιλάμβανε τα εξής στάδια. Εκατό κόκκοι pop corn λήφθηκαν τυχαία υπό ασηπτικές συνθήκες από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα σε δοχείο ζέσεως που περιείχε 1000 ml υδατικού διαλύματος οικιακής χλωρίνης. Οι κόκκοι παρέμειναν για 3 λεπτά στο διάλυμα και αναδεύονταν περιστασιακά. Κατά την απολύμανση των κόκκων το δοχείο ζέσεως παρέμενε καλυμμένο. Μετά την πάροδο των τριών λεπτών το διάλυμα της χλωρίνης απορρίπτονταν (Εικ. 7).

Στη συνέχεια οι κόκκοι ξεπλένονταν με 1000 ml αποστειρωμένου νερού για 1 λεπτό. Κατόπιν το νερό απορρίπτονταν και οι κόκκοι τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο χαρτί με το οποίο και καλύπτονταν. Αμέσως μετά ασηπτικά τοποθετούνταν σε τριβλία που είχαν επιστρωθεί με το θρεπτικό υλικό DG18. Σε κάθε τριβλίο τοποθετούνταν 10 κόκκοι pop corn (Εικ. 8).



**Εικόνα 7.** Επιφανειακή απολύμανση κόκκων pop corn



**Εικόνα 8.** Τοποθέτηση κόκκων pop corn σε τριβλία που είχε επιστρωθεί θρεπτικό υλικό DG 18

### **2.1.5 Απομόνωση μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου με τη μέθοδο της επίστρωσης μετά από αραιώση**

Η απομόνωση μυκήτων από το αλεύρι έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης μετά από αραιώση (Dilution Plating) η οποία θεωρείται η πλέον κατάλληλη για απομόνωση μυκήτων από τρόφιμα σε μορφή σκόνης (Pitt and Hocking, 1997). Η αραιώση πραγματοποιείται με υδατικό διάλυμα 0,1% πεπτόνης,



κατάλληλο για μύκητες (Hocking *et al.*, 2006a.). Θα πρέπει να διεξάγονται διαδοχικές αραιώσεις και η συνιστώμενη αραιώση είναι 1:10 (= 1 + 9) (Pitt and Hocking, 2009). Επίσης τα σπόρια των μυκήτων καθιζάνουν γρήγορα γι' αυτό είναι σημαντικό οι αραιώσεις να γίνονται όσο το δυνατόν ταχύτερα (Beuchat, 1990).

Σύμφωνα με τα παραπάνω σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 90 ml αποστειρωμένου διαλύματος πεπτόνης τοποθετήθηκαν 10 gr από το αλεύρι στο θάλαμο στρωτής ροής αέρα (Εικ. 9). Τα 10gr από το αλεύρι είχαν ζυγιστεί σε αποστειρωμένο χαρτί με τη χρήση αποστειρωμένης σπάτουλας. Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος και στη συνέχεια λήφθηκε όγκος διαλύματος ίσος με 1 ml με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας και τοποθετήθηκε σε τριβλίο όπου είχε επιστρωθεί θρεπτικό υλικό DG 18. Το διάλυμα αραβοσιτάλευρου πεπτόνης απλώνονταν ομοιόμορφα στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις (Εικ. 10).

Ταυτόχρονα 10 ml από το παραπάνω διάλυμα μέσω αποστειρωμένης σύριγγας τοποθετήθηκαν σε νέες κωνικές φιάλες που περιείχαν 90 ml καθαρού διαλύματος πεπτόνης. Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος και η περιγραφόμενη παραπάνω μέθοδος επαναλήφθηκε.

Η πρώτη αραιώση αντιστοιχούσε σε περιεκτικότητα αραβοσιτάλευρου  $10^{-1}$  g/1ml διαλύματος και η δεύτερη αραιώση αντιστοιχούσε σε περιεκτικότητα αραβοσιτάλευρου  $10^{-2}$  g/1ml διαλύματος.



**Εικόνα 9.** Κωνικές φιάλες με αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα πεπτόνης



**Εικόνα 10.** Κωνικές φιάλες με διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο

### **2.1.6 Συνθήκες επώασης**

Τα τριβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για 5- 7 ημέρες. Μετά την πάροδο του διαστήματος επώασης τα τριβλία εξετάζονταν για πιθανή εμφάνιση αποικιών μυκήτων.

### **2.1.7 Απομόνωση μυκήτων**

Τα τριβλία στα οποία είχαν εμφανιστεί αποικίες μυκήτων μεταφέρονταν στο θάλαμο στρωτής ροής αέρα και με τη χρήση του βακτηριολογικού κρίκου γίνονταν η μεταφορά των μυκήτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA. Οι σωλήνες στη συνέχεια τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 25 °C για την ανάπτυξη της αποικίας του κάθε μύκητα που απομονώνονταν.

### **2.1.8 Διατήρηση απομονώσεων**

Το σύνολο των απομονώσεων από τους κόκκους pop corn και από το αλεύρι αραβοσίτου διατηρήθηκε σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25 °C για περαιτέρω εξέτασή τους.

Παράλληλα μια δεύτερη σειρά από όλες τις απομονώσεις και μια τρίτη σειρά μόνο από τις απομονώσεις του γένους *Fusarium* δημιουργήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA με σκοπό τη μακροχρόνια διατήρησή τους. Η δεύτερη και τρίτη σειρά των απομονώσεων καλύφθηκε με αποστειρωμένο φαρμακευτικό

παραφινέλαιο και στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 5 °C (Schönborn, 1989).

## **2.2. Ταξινόμική κατάταξη των μυκήτων**

### **2.2.1 Ταξινόμική κατάταξη σε επίπεδο γένους βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών**

Μετά την ανάπτυξη της αποικίας στους δοκιμαστικούς σωλήνες γίνονταν η ταυτοποίηση τους σε επίπεδο γένους βάση των μακροσκοπικών μορφολογικών χαρακτηριστικών της αποικίας και της μικροσκοπικής εξέτασης. Χρησιμοποιήθηκε η κλείδα των Barnett και Hunder, (2006).

### **2.2.2 Ταξινόμική κατάταξη του γένους *Aspergillus* σε επίπεδο section με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά**

Για τις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Aspergillus* έγινε μία προσπάθεια κατάταξης σε επίπεδο section. Μετά την ταυτοποίηση του γένους *Aspergillus* οι απομονώσεις χωρίστηκαν σε υποομάδες με βάση τα κοινά μακροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Επιλέχθηκε τυχαία ένας αντιπροσωπευτικός αριθμός από κάθε υποομάδα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Pitt και Hocking, (2009) παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό CYA η παρασκευή του οποίου περιγράφεται στην ενότητα 2.2.2.1. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός τριβλίων στα οποία είχε επιστρωθεί το θρεπτικό μέσο CYA με τις απομονώσεις που επιλέχθηκαν. Για κάθε απομόνωση έγινε εμβολιασμός δύο τριβλίων. Στη συνέχεια το ένα εκ των δύο τοποθετήθηκε για επώαση στους 25 °C και το άλλο για επώαση στους 37 °C για 7 ημέρες.

Μετά την επώαση οι καλλιέργειες εξετάστηκαν μακροσκοπικά με βάση τη διάμετρο και το χρώμα της αναπτυσσόμενης αποικίας. Παράλληλα έγινε μικροσκοπική παρατήρηση με λήψη τμήματος της καλλιέργεια, τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα και εξέταση στο μικροσκόπιο.

Χρησιμοποιώντας την κλείδα των Pitt and Hocking, (2009) και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφονται από τους Varga *et al.*, (2011) και Frisvad *et al.*, (2004) οι απομονώσεις του γένους *Aspergillus* κατατάχθηκαν σε τρία section. Τα section αυτά ήταν *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati* και *Aspergillus* section *Nigri*. Όλες οι υπόλοιπες απομονώσεις που βάση

των παραπάνω δεν μπορούσαν να ενταχθούν σε κάποιο section παρέμειναν καταγεγραμμένες ως *Aspergillus* spp.

### **2.2.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού Czapek Yeast Extract Agar (CYA)**

Για την παρασκευή του ανωτέρω θρεπτικού υλικού απαιτούνται 1gr  $K_2HPO_4$ , 10 ml Czapek Concentrate (υπόεν. 2.2.2.2), 1ml Trace metal solution (υπόεν. 2.2.2.3), 5gr yeast extract, 30 gr σουκρόζη, 15 gr άγαρ και 100 ml απιονισμένο νερό. Σε 500 ml απιονισμένου νερού διαλύονται όλα τα υλικά εκτός από το Yeast Extract και το άγαρ που διαλύονται στα υπόλοιπα 500 ml νερού. Γίνεται ανάμειξη όλων των υλικών και ακολουθεί θέρμανση έως ότου διαλυθεί πλήρως το άγαρ. Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 λεπτά (Pit, 1973).

### **2.2.2.2 Παρασκευή Czapek Concentrate**

Για την παρασκευή του ανωτέρου υλικού απαιτούνται 30gr  $NaNO_3$ , 5 gr  $KCl$ , 5gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1gr  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 100 ml απιονισμένου νερού. Διαλύονται οι προαναφερόμενες ποσότητες των υλικών σε 100 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα Czapek Concentrate μπορεί να διατηρηθεί χωρίς αποστείρωση (Pit, 1973).

### **2.2.2.3 Παρασκευή Trace Metal solution**

Για την παρασκευή του ανωτέρω υλικού απαιτούνται 0,5 gr  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1gr  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  και 100 ml απιονισμένο νερό. Διαλύονται οι προαναφερόμενες ποσότητες των υλικών σε 100 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί χωρίς να αποστειρωθεί (Pit, 1973).

## **2.3 Εξαγωγή ολικού DNA από τις απομονώσεις του γένους *Fusarium*.**

Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ολικού DNA από 44 απομονώσεις του γένους *Fusarium*. Από τις 44 απομονώσεις μυκήτων οι 38 προέρχονταν από κόκκους popcorn οι 6 από αλεύρι αραβοσίτου (Εικ.11).



**Εικόνα 11.** Απομονώσεις του γένους *Fusarium* σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA

### 2.3.1 Αντιδραστήρια

Για την εξαγωγή του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- NaCl συγκέντρωσης 5M το οποίο παρασκευάζεται με το πρωτόκολλο που ακολουθεί (Sambrook *et al.*, 1989).

Σε 800 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 292,2 gr NaCl . Στη συνέχεια προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου 1L και γίνεται αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

- Disodium Ethylenediaminetetraacetate . 2 H<sub>2</sub>O (EDTA) συγκέντρωσης 0,5 M το οποίο παρασκευάζεται με το πρωτόκολλο που ακολουθεί (Sambrook *et al.*, 1989)

Σε 800 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 186,1 gr EDTA. Γίνεται ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια προστίθεται NaOH ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται μέτρηση του pH του διαλύματος. Η προσθήκη του καυστικού νατρίου γίνεται σταδιακά και αργά μέχρι το pH του διαλύματος να φτάσει 8.0 Απαιτούνται περίπου 20 gr NaOH. Στη συνέχεια γίνεται αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- Tris HCl συγκέντρωσης 2M το οποίο παρασκευάζεται με το πρωτόκολλο που ακολουθεί (Sambrook *et al.*, 1989)

Σε 800 απιονισμένου νερού διαλύονται 242,2 gr Tris base. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη HCl μέχρι η τιμή του pH να γίνει 8. Το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο

- Extraction buffer: CTAB Isolation Buffer το οποίο παρασκευάστηκε με το πρωτόκολλο που ακολουθεί (Doyle and Doyle, 1990).

Σε 60 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 2 gr hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) και τοποθετούνται στον αναδευτήρα για να διαλυθεί το CTAB στη συνέχεια προστίθενται 28 ml NaCl συγκέντρωση 5M, 4 ml διαλύματος Disodium Ethylenediaminetetraacetate . 2 H<sub>2</sub>O (EDTA) συγκέντρωσης 0,5M, 5 ml διαλύματος Tris – HCl και 0,2 ml 2- mercaptoethanol

- PVP 25
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- Αιθυλική αλκοόλη 95% που διατηρείται στους -20 °C
- Αιθυλική αλκοόλη 70% που διατηρείται στους -20 °C
- DEPC - treated water που διατηρείται στους -20 °C

### **2.3.2 Παρασκευή Potato Dextrose Broth Medium**

Για την εξαγωγή του ολικού DNA απαιτήθηκε η παρασκευή του θρεπτικού μέσου Potato Dextrose Broth Medium (PDBM). Η παρασκευή του θρεπτικού μέσου έγινε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Σε 500 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 200 gr πατάτες αφού καθαρισθούν και πλυθούν. Ακολουθεί βρασμός για 30-45 λεπτά. Στη συνέχεια το νερό μεταφέρεται σε νέα κωνική φιάλη. Προστίθεται 15gr δεξτρόζης και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Το υλικό θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η δεξτρόζη. Μετά την παρασκευή του το θρεπτικό υλικό διανέμεται σε κωνικές φιάλες των 100 ml ανά 50 ml σε κάθε φιάλη και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά (Mac Faddin, 1985).

### **2.3.3 Διαδικασία εξαγωγής ολικού DNA από καλλιέργεια μυκήτων του γένους *Fusarium***

Για τις μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν απαιτήθηκε η εξαγωγή του ολικού DNA από τις καλλιέργειες μυκήτων του *Fusarium* η οποία έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε από τους Lodhi *et al.*, (1994) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις και επιπλέον χωρίς τη χρήση υγρού αζώτου. Σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο:

Οι καλλιέργειες των μυκήτων αναπτύχθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml οι οποίες περιείχαν 50 ml Potato Dextrose Broth Medium. Ο εμβολιασμός των κωνικών φιαλών με τις απομονώσεις του γένους *Fusarium* έγινε στο θάλαμο στρωτής ροής αέρα. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο ανάδευσης στους 24 °C και 150 στροφές για 8 -10 ημέρες (Εικ. 12,13,14).



**Εικόνα 12.** Εμβολιασμός κωνικών φιαλών με απομονώσεις του γένους *Fusarium*



**Εικόνα 13.** Κωνικές φιάλες με καλλιέργειες μυκήτων του γένους *Fusarium* στον επωαστικό θάλαμο ανάδευσης μετά την πάροδο 8 ημερών



**Εικόνα 14.** Καλλιέργειες του γένους *Fusarium* σε θρεπτικό υλικό PDBM

Μετά την πάροδο των 8-10 ημερών η καλλιέργεια του μύκητα μεταφέρθηκε σε δοχείο φυγοκέντρησης χωρητικότητας 50ml (Εικ.15). Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 10 λεπτά. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 40 ml αποστειρωμένου νερού. Έγινε ξανά φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 10 λεπτά. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το μυκήλιο που έμεινε τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο χαρτί για να στεγνώσει (Εικ. 16,17).



**Εικόνα 15.** Μεταφορά καλλιεργείων σε δοχεία φυγοκέντρησης





**Εικόνα 16.** Μυκήλιο μύκητα του γένους *Fusarium* μετά τη φυγοκέντριση



**Εικόνα 17.** Μυκήλιο μύκητα του γένους *Fusarium* σε αποστειρωμένο χαρτί

Με τη χρήση αποστειρωμένου μικρού ομογενοποιητή σε αποστειρωμένο σωληνίσκο τύπου erpendorf χωρητικότητας 2 ml τοποθετήθηκε μυκήλιο και ζυγίστηκε ώστε το τελικό βάρος να είναι 225 mgr.

Μετά τη ζύγιση στο σωληνίσκο προστέθηκαν 200 µl CTAB buffer το οποίο είχε προηγουμένως προθερμαθεί στους 60 °C και έγινε ομογενοποίηση με τη χρήση του ομογενοποιητή. Προστέθηκαν 25 mgr PVP 25 έγινε και πάλι ομογενοποίηση και προστέθηκαν αλλά 200 µl CTAB buffer έγινε για τρίτη φορά ομογενοποίηση ακολούθησε θέρμανση του μίγματος στους 60 °C για 25 λεπτά. Η τμηματική

προσθήκη του CTAB buffer έγινε για την αποφυγή της δημιουργίας ιζήματος και με στόχο τη δημιουργία γαλακτώματος.

Μετά την πάροδο των 25 λεπτών το φιαλίδιο αναδεύτηκε ισχυρά και τοποθετήθηκε στον πάγο.

Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος 1:1 φαινόλης και χλωροφόρμιου (200 μl φαινόλης και 200 μl χλωροφόρμιου) και ακολούθησε ελαφριά ανάδευση με αναστροφή με στόχο και πάλι τη δημιουργία γαλακτώματος. Κατόπιν το μίγμα τοποθετήθηκε σε φυγόκεντρο και έγινε φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.

Το υπερκείμενο (υδατική φάση) όγκου περίπου 400 μl μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο μικροσωληνίσκο και τοποθετήθηκε στον πάγο ενώ το ίζημα απορρίφθηκε. Στο φιαλίδιο προστέθηκαν 200μl NaCl 5M και έγινε και πάλι ελαφριά ανάδευση. Προστέθηκαν 800μl αιθυλικής αλκοόλης 95% (-20 °C) και ακολούθησε ελαφριά ανάδευση. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετήθηκε στους -20 °C για 24 ώρες με σκοπό την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων.

Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντριση απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml αιθυλικής αλκοόλης 70% (-20 °C) για τον καθαρισμό του ιζήματος. Ακολούθησε και πάλι φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά. Απορρίφθηκε το αιώρημα και το ίζημα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου καλυμμένο για να στεγνώσει.

Στη συνέχεια προστέθηκε υπερκάθαρο νερό όγκου 50 μl - 100μl ανάλογα το μέγεθος του ιζήματος.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε και για τις 44 απομονώσεις του γένους *Fusarium*.

Η καθαρότητα του DNA και η συγκέντρωση του μετρήθηκε με τη χρήση NanoDrop σπεκτροφωτόμετρου. Η καθαρότητα του DNA προκύπτει ως ο λόγος της απορρόφησης των νουκλεϊκών οξέων στα 260 nm προς την απορρόφηση των πρωτεϊνών στα 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

Από το αρχικό διάλυμα DNA με βάση τη συγκέντρωση που μετρήθηκε έγιναν αραιώσεις με τελική συγκέντρωση 20ng/μl. Οι αραιώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το αρχικό διάλυμα DNA καθώς και οι αραιώσεις διατηρήθηκαν στους -20 °C.

## **2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Σκοπός είναι η δημιουργία ικανής ποσότητας αντιγράφων με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, των τμημάτων στόχων για ανίχνευση με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης (Seidman 2011). Στην παρούσα μελέτη η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη απομονώσεων του γένους *Fusarium* σε επίπεδο είδους καθώς και για την ανίχνευση του γονιδίου *fum1*, γονίδιο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της φουμονισίνης.

### **2.4.1 Κατάταξη απομονώσεων του γένους *Fusarium* σε επίπεδο είδους με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών**

Στο καλαμπόκι τα πιο συχνά απαντώμενα είδη του γένους *Fusarium* είναι μεταξύ άλλων τα *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* που προκαλούν την ασθένεια της σήψης των ωτίων του αραβοσίτου τα *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium subglutinans* που προκαλούν την ασθένεια της ροζ σήψης του αραβοσίτου αλλά και τα *Fusarium equiseti*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* (Logrieco *et al.*, 2002).

#### **2.4.1.1 Επιλογή εξειδικευμένων εκκινητών για ταυτοποίηση απομονώσεων του γένους *Fusarium* σε επίπεδο είδους**

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 4 ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν και περιγράφηκαν από τους Jurado M. *et al.*, (2005). Πρόκειται για ζεύγη των εκκινητών που υβριδίζουν στην περιοχή IGS. Η περιοχή IGS περιέχει υψηλά επίπεδα μεταβλητότητας αλληλουχίας μεταξύ ειδών του ίδιου γένους και επιτρέπει τη διαφοροποίηση συγγενών γενετικά ειδών σε αντίθεση με την ITS περιοχή. (Mirete *et al.*, 2003, 2004).

Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την κατάταξη 16 επιλεγμένων στελεχών του γένους *Fusarium* που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn και από αλεύρι αραβοσίτου με μοριακές μεθόδους σε κάποιο από τα ακόλουθα είδη: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*.

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μέγεθος των προϊόντων που δίνονται φαίνεται στον πίνακα 8. Οι εκκινητές παρήχθησαν από την εταιρεία Sigma Aldrich.

**Πίνακας 8.** Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων για το προσδιορισμό σε επίπεδο είδους του γένους *Fusarium* με τη βοήθεια της PCR

Είδος μύκητα που ανιχνεύεται	Ζεύγος Εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>F. graminearum</i>	Fgr Fgc	5'-GTTGATGGGTAAAAGTGT G-3' 5'-CTCTCATATACCCTCCG-3'	500
<i>F. culmorum</i>	Fcu Fgc	5'-GACTATCATTATGCTTGCAGAG-3' 5'-CTCTCATATACCCTCCG-3'	200
<i>F. sporotrichioides</i>	Fps Fsp	5'-CGCACGTATAGATGGACAAG-3' 5'-GTCAGAAGAGACGCATCCGCC-3'	400
<i>F. roae</i>	Fps Fpo	5'-CGCACGTATAGATGGACAAG-3' 5'-CAGCGCACCCCTCAGAGC-3'	400

Όπως φαίνεται από τον πίνακα για τα είδη *F. graminearum*, *F. culmorum* χρησιμοποιείται ο ίδιος εκκινητής Fgc επίσης για τα είδη *F. sporotrichioides* και *F. roae* χρησιμοποιείται ο ίδιος εκκινητής Fps. Επίσης τα δύο ζεύγη εκκινητών Fps/Fsp και Fps/Fpo χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση αφού το πρόγραμμα της PCR ήταν το ίδιο με προοπτική εάν εμφανιστούν οι αναμενόμενες ζώνες στα 400 bp να ακολουθήσει μετέπειτα έλεγχος για το επιμέρους είδος.

#### 2.4.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και θερμοκρασιακό προφίλ των αντιδράσεων για τους εξειδικευμένους εκκινητές Fgr/Fgc, Fcu/Fgc, Fps/Fpo, Fps/Fsp

Το ολικό DNA που εξείχθει από κάθε μία από τις 16 απομονώσεις του γένους *Fusarium* χρησιμοποιήθηκε για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Κάθε αντίδραση ήταν τελικού όγκου 25 μl. Σε κωνικά φιαλίδια PCR των 200 μl τοποθετήθηκαν 12,5 μl Taq 2X Master Mix (New England Biolabs), 1,25 μl από κάθε εκκινητή (forward/reverse), η συγκέντρωση υδατικού διαλύματος των

εκκινητών ήταν 10 pmol, 5 μl υπερκάθαρο νερό και 5 μl DNA συγκέντρωσης 20ng/μl.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε α) DNA από απομόνωση του μύκητα *Botrytis cinerae* και β) μία αντίδραση που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια και υπερκάθαρο νερό αντί για DNA.

Το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης ανά ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένο για κάθε είδος δίνεται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9.** Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR ανά ζεύγος εκκινητών εξειδικευμένο για κάθε είδος του γένους *Fusarium*

<i>Fusarium graminearum</i> Fgr / Fgc			
Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Διαδικασία
1	94 °C	85 δευτερόλεπτα	
25	95 °C	35 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
	53 °C	30 δευτερόλεπτα	Υβριδισμός
	72 °C	30 δευτερόλεπτα	Επιμήκυνση
1	72 °C	5 λεπτά	Τελική ενίσχυση
<i>Fusarium culmorum</i> Fcu/Fgc			
Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Διαδικασία
1	94 °C	85 δευτερόλεπτα	
20	95 °C	35 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
	54 °C	30 δευτερόλεπτα	Υβριδισμός
	72 °C	30 δευτερόλεπτα	Επιμήκυνση
1	72 °C	5 λεπτά	Τελική ενίσχυση
<i>Fusarium poae</i> Fps/ Fpo			
Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Διαδικασία
1	94 °C	85 δευτερόλεπτα	
25	95 °C	35 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
	61 °C	30 δευτερόλεπτα	Υβριδισμός
	72 °C	30 δευτερόλεπτα	Επιμήκυνση
1	72 °C	5 λεπτά	Τελική ενίσχυση
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Fps /Fsp			

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Διαδικασία
1	94 °C	85 δευτερόλεπτα	
25	95 °C	35 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
	61 °C	30 δευτερόλεπτα	Υβριδισμός
	72 °C	30 δευτερόλεπτα	Επιμήκυνση
1	72 °C	5 λεπτά	Τελική ενίσχυση

Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA, στη συνέχεια η μείωση της ευνοεί την πρόσδεση των εκκινητών στα σημεία στόχους (Υβριδισμός) . Η θερμοκρασία των 72 °C βοηθά την Taq πολυμεράση να τοποθετήσει στις κατάλληλες θέσεις τα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν προστεθεί στο διάλυμα επιμηκώνοντας τις νέες αλυσίδες (επιμήκυνση). Η επανάληψη των κύκλων στοχεύει στη δημιουργία με αυτό τον τρόπο συμπληρωματικών αλυσίδων σε πολλά αντίγραφα του συγκεκριμένου γονιδιακού τμήματος που υπάρχει ή πρόθεση να ανιχνευθεί (Mullis and Falona, 1987).

Μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης τα δείγματα παρέμειναν στους -20 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης.

#### **2.4.2 Ανίχνευση του γονιδίου *fum1* με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών**

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για να διακριθούν οι απομονώσεις που περιλαμβάνουν στο γονιδίωμά τους το γονίδιο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της φουμονισίνης από τις απομονώσεις που δεν το περιλαμβάνουν και συνεπώς να διακριθούν οι δυνητικά μυκοτοξικογόνες από τις δυνητικά μη μυκοτοξικογόνες απομονώσεις.

##### **2.4.2.1 Επιλογή εκκινητών για την ανίχνευση του γονιδίου *fum1***

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εξειδικευμένων εκκινητών που υβριδίζουν στο γονίδιο *fum1* για την ανίχνευση του συγκεκριμένου γονιδίου στις απομονώσεις μυκήτων του γένους *Fusarium*. Το ζεύγος εκκινητών σχεδιάστηκε και περιγράφηκε από τους Bluhm *et al.*, (2004).

Η αλληλουχία των εκκινητών καθώς και το μέγεθος των προϊόντων που ενισχύουν φαίνεται στον πίνακα 10. Οι εκκινητές παρήχθησαν από την εταιρεία Sigma Aldrich

**Πίνακας 10.** Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών, αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μέγεθος παραγόμενων προϊόντων

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος (bp)
Fum1	5'-CCATCACAGTGGGACACAGT-3'	183
Fum 2	5'-CGTATCGTCAGCATGATGTAGC-3'	

#### **2.4.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης για τους εξειδικευμένους εκκινητές Fum1/Fum2**

Το ολικό DNA κάθε μίας από τις 44 απομονώσεις μυκήτων του γένους *Fusarium* χρησιμοποιήθηκε για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 25 μl. Σε σωληνίσκους PCR χωρητικότητας 200 μl προστέθηκαν 12,5 μl Kara 2G Fast hot-start ready-mix PCR Kit (Kara Biosystems), 1,25 μl από κάθε εκκινητή (Fum1 / Fum2), η συγκέντρωση υδατικού διαλύματος των εκκινητών ήταν 10 pmol, 5 μl υπερκάθαρο νερό και 5 μl DNA συγκέντρωσης 20ng/μl όπως προέκυψε από τον ολικό καθαρισμό DNA.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από απομόνωση του μύκητα *Botrytis cinerae* καθώς επίσης και μία αντίδραση που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια και υπερκάθαρο νερό αντί για DNA. Δεν υπάρχει κάποια βιβλιογραφική αναφορά ότι το γονίδιο *fum 1* έχει ανιχνευθεί στο DNA μύκητα του είδους *Botrytis cinerae* και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Θετικός μάρτυρας ήταν DNA από απομόνωση που έδωσε προϊόν PCR.

Το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης δίνεται στον πίνακα 11.

**Πίνακας 11.** Θερμοκρασιακό προφίλ της PCR για το ζεύγος εκινητών Fum1/ Fum2

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Στάδιο αντίδρασης
1	94 °C	4 λεπτά	
35	94 °C	1 λεπτό	Αποδιάταξη
	58 °C	1 λεπτό	Υβριδισμός
	72 °C	1 λεπτό	Επιμήκυνση
1	72 °C	10 λεπτά	Τελική ενίσχυση

Μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης τα δείγματα παρέμειναν στους -20 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης.

### 2.4.3 Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης

Ο έλεγχος των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (Sambrook *et al.* 1989).

Για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήγμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10X) (Tris/Borate/EDTA) το οποίο παρασκευάστηκε με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

Ζυγίζονται οι παρακάτω ποσότητες αλάτων

55gr Boric Acid

108 gr Tris

και προστίθενται σε 400ml απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάδευση έως ότου διαλυθούν τα άλατα προσθήκη 40 ml από διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 0,5M (disodium salta dehydrate του οποίου η παρασκευή αναφέρεται στην ενότητα 2.4.1) και τέλος προσθήκη απιονισμένου νερού ώστε το συνολικό διάλυμα να έχει τελικό όγκο 1 L (Sambrook *et al.*, 1989).

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) το οποίο προκύπτει από αραιώση 1:10 του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος TBE (10X).
- Σκόνη Αγαρόζης.



- Διάλυμα φόρτωσης το οποίο παρασκευάζεται από τα παρακάτω υλικά και τις αναλογίες 0,25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF , 15% Ficoll (Type 400).
- PCR μάρτυρας: Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του Low Molecular Weight (LMW) DNA Ladder το οποίο προέκυψε από την ανάμιξη 20μl LMW, 20μl ρυθμιστικού διαλύματος της PCR, 60μl διάλυμα φόρτωσης, και 100 μl υπερκάθαρο νερό.
- Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου 1% το οποίο προκύπτει με τη διάλυση 0,02gr βρωμιούχου αιθιδίου σε 2 ml απιονισμένου νερού.
- Απιονισμένο νερό.

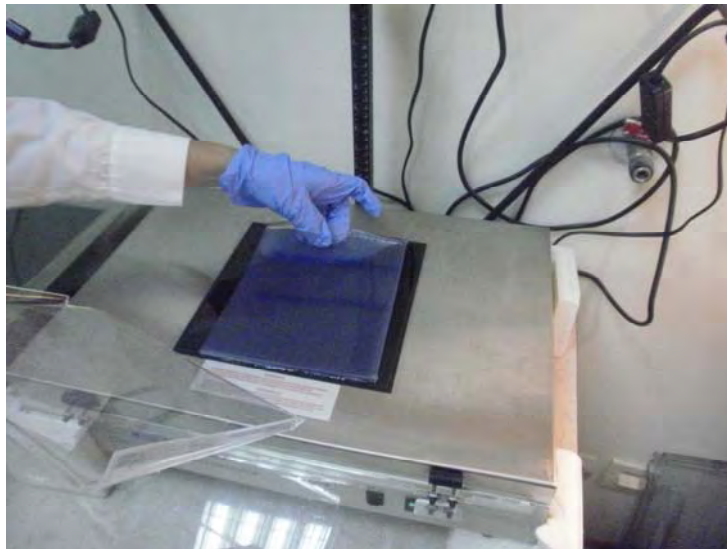
Το πήγμα αгарόζης είχε συγκέντρωση 1,5% σε διάλυμα TBE (1X). Το πήγμα (gel) αφού τοποθετήθηκε σε ειδικό σκαφίδιο παρέμεινε για να κρυώσει και να σταθεροποιηθεί για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια το gel τοποθετήθηκε στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, προστέθηκαν 2,5 L TBE 1X και τα βοηθία πληρώθηκαν με το μίγμα που δημιουργήθηκε από την ανάμιξη 6 μl από τα προϊόντα της PCR και 4 μl διαλύματος φόρτωσης. Στην πρώτη θέση φόρτωσης τοποθετήθηκε ο μάρτυρας LMW DNA Ladder.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 200 V για περίπου 1 ώρα και 45 λεπτά.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X, προστέθηκαν 4μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά προκειμένου να προσδεθεί η φθορίζουσα χρωστική με την έλικα DNA, ξεπλύθηκε με περίσσεια νερού και ακολούθησε παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (312 nm) (Εικ. 18, 19).



**Εικόνα 18.** Πήγμα αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση σε διάλυμα TBE που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο



**Εικόνα 19.** Τοποθέτηση πήγατος αγαρόζης σε τράπεζα ακτινοβολίας UV (312nm)

## **2.5 Ανίχνευση παραγωγής μυκοτοξινών: αφλατοξίνης, ωχρατοξίνης και κιτρινίνης με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Coconut Cream Agar (CCA)**

### **2.5.1 Η μέθοδος της ανίχνευσης μυκοτοξινών στο θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar (CCA)**

Οι Dyer και McCammon, (1994), χρησιμοποίησαν το θρεπτικό υλικό CCA για τον εντοπισμό της παραγωγής αφλατοξίνης από μύκητες των ειδών *Aspergillus*

*flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Σε μετέπειτα έρευνες το CCA προσδιορίστηκε ως κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανίχνευση ωχρατοξίνης που παράγεται από μύκητες του είδους *Aspergillus carbonarius* και από μύκητες του *Aspergillus* section *Circumdati* (Heenan *et al.*, 1998) και κιτρινίνης (Mohamed *et al.*, 2013).

Οι καλλιέργειες μυκήτων που αναπτύσσονται σε Coconut Cream Agar εφόσον παράγεται μία από τις παραπάνω τοξίνες παρατηρείται φθορισμός όταν εξετάζονται υπό υπεριώδη ακτινοβολία στα 365 nm. Ο φθορισμός στην περίπτωση αποικίας *Aspergillus flavus* παρατηρείται σε δακτύλιο γύρω από την αποικία και είναι μπλε παστέλ ενώ στην περίπτωση του *Aspergillus parasiticus* ο φθορισμός είναι γαλαζόλευκος στο σύνολο της καλλιέργειας (Dyer and McCammon, 1994). Στην περίπτωση του είδους *Aspergillus carbonarius* και ειδών του *Aspergillus* section *Circumdati* και του *Aspergillus* section *Nigri* που παράγουν ωχρατοξίνη ο φθορισμός είναι μπλε πράσινο και καλύπτει συνήθως το σύνολο της αποικίας (Heenan *et al.*, 1998). Στο CCA, η κιτρινίνη εμφανίζει ένα έντονο κίτρινο - πράσινο φθορισμό γύρω από την αποικία που είναι ορατά διακριτός από το φθορισμό που παράγεται από αφλατοξίνες και ωχρατοξίνες όταν η παρατήρηση γίνει υπό υπεριώδη ακτινοβολία στα 366 nm. (Mohamed, 2013, Mohamed *et al.*, 2013).

### **2.5.2 Παρασκευή Coconut Cream Agar**

Για την παρασκευή του ανωτέρω υλικού απαιτούνται 400 ml απιονισμένου νερού, 400 ml Coconut Cream (Oriental Express) και 12 gr άγαρ. Τα υλικά τοποθετούνται σε κωνική φιάλη ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος και διανομή σε φιαλίδια ανά 100 ml και αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά (Dyer και McCammon, 1994), (Εικ. 20).



**Εικόνα 20.** Φιάλες και τριβλία με Coconut Cream Agar

### 2.5.3 Εμβολιασμός τριβλίων

Τριβλία που περιείχαν CCA εμβολιάστηκαν με απομονώσεις των *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* και *Penicillium*. Για όλες τις παραπάνω απομονώσεις όλων των sections του γένους *Aspergillus* ο εμβολιασμός γίνονταν με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου σε τρία διαφορετικά σημεία του τριβλίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dyer και McCammon, (1994). Στην περίπτωση των απομονώσεων του γένους *Penicillium* ο εμβολιασμός γινόταν στο κέντρο του τριβλίου και πάλι με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Mohamed *et al.*, (2013), (Εικ. 21,22).



**Εικόνα 21.** Προετοιμασία για εμβολιασμό τριβλίων που είχαν επιστρωθεί με θρεπτικό υλικό CCA με απομονώσεις μυκήτων



**Εικόνα 22.** Εμβολιασμός τριβλίων όπου είχε επιστρωθεί CCA με απομονώσεις του γένους *Penicillium*

Για όλες τις απομονώσεις έγιναν δύο επαναλήψεις. Ως μάρτυρας αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα μη εμβολιασμένο τριβλίο. Στην πορεία των πειραμάτων απομονώσεις που δεν παρατηρήθηκε φθορισμός χρησιμοποιούνταν ως αρνητικός μάρτυρας.

Συνολικά εμβολιάστηκαν 78 τριβλία με 39 απομονώσεις του *Aspergillus* section *Flavi*, 38 τριβλία με 19 απομονώσεις του *Aspergillus* section *Circumdati* και 12 τριβλία με 6 απομονώσεις του *Aspergillus* section *Nigri*. Όλες οι απομονώσεις των sections του γένους *Aspergillus* προέρχονταν από τους κόκκους pop corn. Επίσης εμβολιάστηκαν 30 τριβλία με 15 απομονώσεις του γένους *Penicillium* που προέρχονταν από το αραβοσιτάλευρο.

#### **2.5.4 Επώαση των τριβλίων και παρατήρηση**

Μετά τον εμβολιασμό τα τριβλία μεταφέρθηκαν για επώαση σε θάλαμο θερμοκρασίας 30 °C για τις απομονώσεις του *Aspergillus* section *Flavi*, 25 °C για τις απομονώσεις του *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* και τις απομονώσεις του γένους *Penicillium*. Η επώαση των τριβλίων έγινε για διάστημα 5 έως 7 ημερών. Κατά τη διάρκεια της 3<sup>ης</sup>, 5<sup>ης</sup> και 7<sup>ης</sup> ημέρας γίνονταν παρατήρηση της καλλιέργειας των μυκήτων σε σκοτεινό δωμάτιο με τη χρήση λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (365 nm).



### **3.1.1 Ανίχνευση μυκήτων σε κόκκους pop corn με τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης**

Τριβλία στα οποία είχαν τοποθετηθεί κόκκοι pop corn μετά την επώαση στους 25 °C για 7 ημέρες εξετάστηκαν για πιθανή ανάπτυξη μυκήτων. Από τις μεμονωμένες αποικίες μυκήτων που εντοπίστηκαν στα τριβλία έγινε μεταφορά μυκηλίου σε δοκιμαστικούς σωλήνες και δόθηκε σε κάθε απομόνωση ένας κωδικός. Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση της κάθε απομόνωσης. Στην εικόνα 23 φαίνεται η ανάπτυξη των μεμονωμένων αποικιών μυκήτων μετά την επώαση.

### **3.1.2 Ανίχνευση μυκήτων σε αραβοσιτάλευρο με τη μέθοδο της επίστρωσης μετά από αραίωση.**

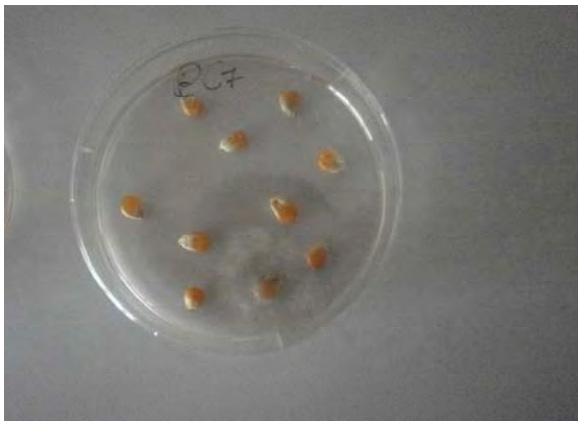
Τριβλία στα οποία είχε τοποθετηθεί διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο μετά την επώαση στους 25 °C για 7 ημέρες εξετάστηκαν για πιθανή ανάπτυξη μυκήτων. Από τις μεμονωμένες αποικίες μυκήτων που εντοπίστηκαν στα τριβλία έγινε μεταφορά μυκηλίου των μυκήτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες και δόθηκε σε κάθε απομόνωση ένας κωδικός. Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση της κάθε απομόνωσης. Στις εικόνες 23-25 φαίνεται η ανάπτυξη των μεμονωμένων αποικιών μυκήτων μετά την επώαση.



α



β



γ



δ



ε

**Εικόνα 23.** Ανάπτυξη μυκήτων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο DG 18 όπου είχαν τοποθετηθεί κόκκοι pop corn





α



β

**Εικόνα 24.** Ανάπτυξη μυκήτων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο DG 18 όπου είχε τοποθετηθεί διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο περιεκτικότητας  $10^{-1}$  g/ml

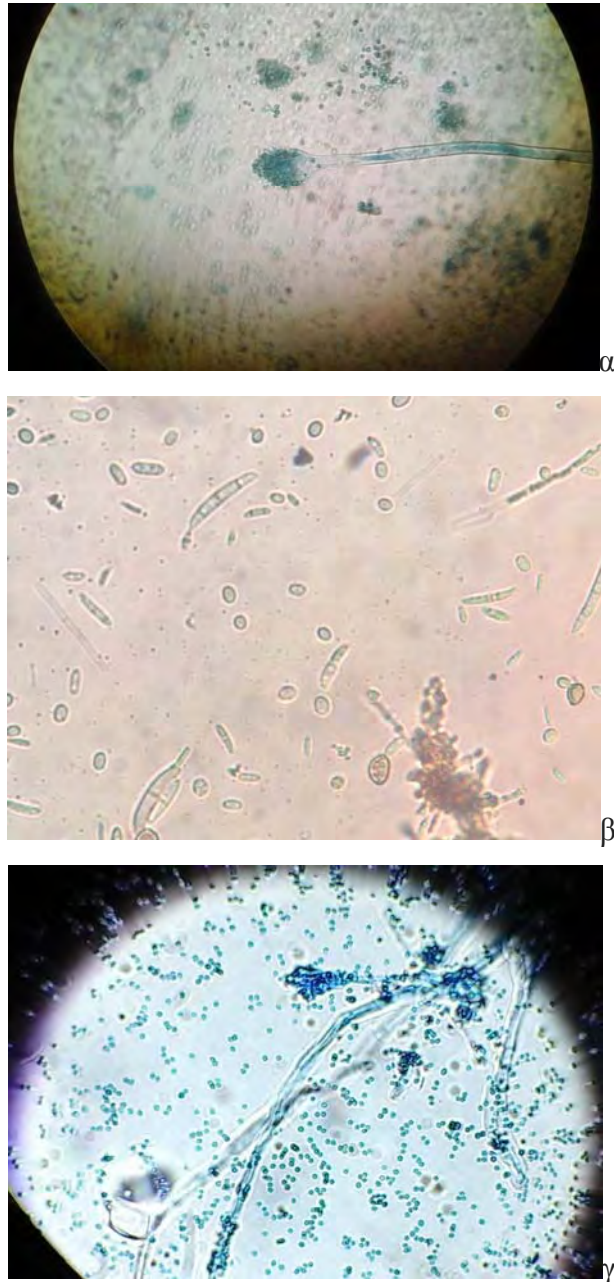


**Εικόνα 25.** Ανάπτυξη μυκήτων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο DG 18 όπου είχε τοποθετηθεί διάλυμα πεπτόνης και αραβοσιτάλευρο περιεκτικότητας  $10^{-2}$  g/ml

### **3.1.3 Ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section των μυκήτων που απομονώθηκαν και ανιχνεύθηκαν**

Βάση της κλείδας των Barnett και Hunder (2006) έγινε ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους για τα γένη *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Πρόκειται για τα γένη που παράγουν τις περισσότερες από τις μυκοτοξίνες που θεωρούνται επιβλαβής για την υγεία των ανθρώπων (CAST, 2003). Για όλες τις άλλες απομονώσεις που δεν κατατάχθηκαν σε κάποιο από τα παραπάνω γένη δεν προσδιορίστηκε το γένος και αναφέρονται στα αποτελέσματα ως άλλα γένη.

Στην εικόνα 26 φαίνονται οι κονιδιοφόροι και τα κονίδια μυκήτων των γενών *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Επίσης στις εικόνες 27-29 φαίνεται η ανάπτυξη των απομονώσεων μυκήτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA.



**Εικόνα 26.** Κονιδιοφόροι - κονίδια μυκήτων  
α) *Aspergillus* spp, β) *Fusarium* spp, γ) *Penicillium* spp



α



β



γ



δ

**Εικόνα 27.** Καλλιέργειες μυκήτων που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn σε PDA  
α), β) *Aspergillus* spp και *Fusarium* spp, γ) γένος *Aspergillus* spp, δ) γένος *Fusarium* spp



α



β

**Εικόνα 28.** Καλλιέργειες μυκήτων που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn σε PDA  
α) *Aspergillus* section *Circumdati*, β) *Aspergillus* section *Flavi*



**Εικόνα 29.** Καλλιέργειες μυκήτων του γένους *Penicillium* που απομονώθηκαν από αραβοσιτάλευρο σε PDA

### **3.1.3.1 Ταξινομική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section των μυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα κόκκων pop corn**

Στον πίνακα 12 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το πρώτο δείγμα κόκκων pop corn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 1 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το πρώτο δείγμα κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή section.

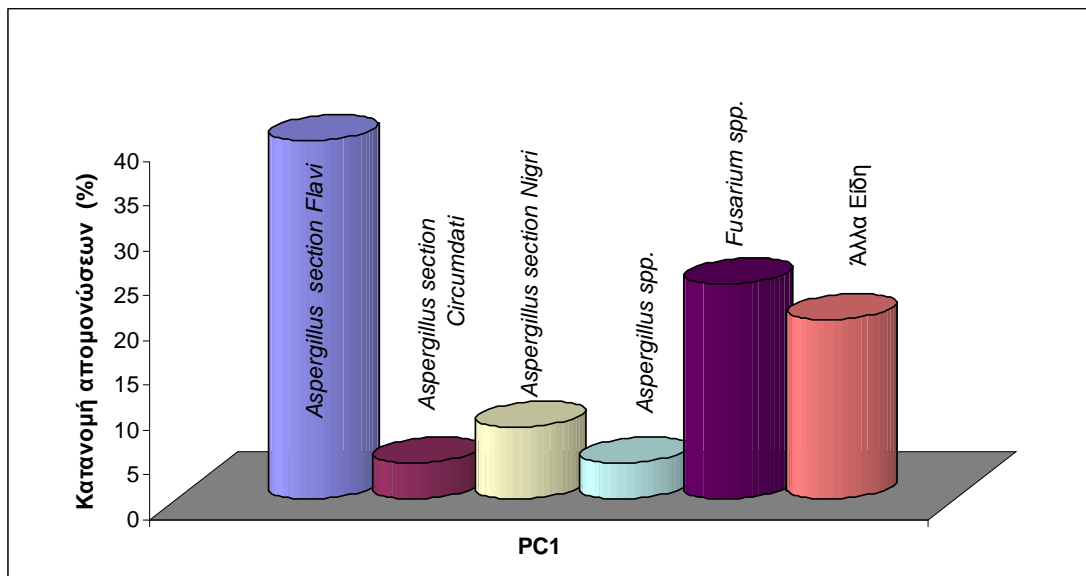
**Πίνακας 12.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το πρώτο δείγμα PC1, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Γένη	Επανάληψη <sup>1</sup>
PC1 1						X	1η
PC1 2	X <sup>2</sup>						
PC1 4					X		
	1 <sup>3</sup>				1	1	3
PC1 6			X				2η
PC1 8				X			
PC1 9					X		
			1	1	1		3
PC1 11			X				3η
PC1 12					X		
			1		1		
							2
PC1 14	X						4η
PC1 15					X		
PC1 17						X	
	1				1	1	3
PC1 20	X						5η
PC1 23	X						
PC1 25	X						
	3						3
PC1 27		X					6η
PC1 28					X		
PC1 29						X	
		1			1	1	3
PC1 31	X						7η
PC1 33						X	
	1					1	
PC1 34	X						8η
PC1 35						X	
	1					1	
PC1 37					X		9η
PC1 39	X						
PC1 40	X						
	2				1		3
PC1 51	X						10η
	1						1
<b>Σύνολο</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>25</b>

1: Όπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn.

2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section.

3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 1.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του πρώτου δείγματος pop corn.

Στο πρώτο δείγμα κόκκων pop corn μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Flavi* καταλαμβάνουν σχεδόν το μισό ποσοστό του συνόλου των απομονώσεων 40% ενώ μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* απομονώθηκαν σε ποσοστό 24%. Σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύθηκαν μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Nigri* και στο *Aspergillus section Circumdati* 8% και 4% αντίστοιχα. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο πρώτο δείγμα ανήλθε στο 25%

Στον πίνακα 13 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το δεύτερο δείγμα κόκκων pop corn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 2 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το δεύτερο δείγμα κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή section.

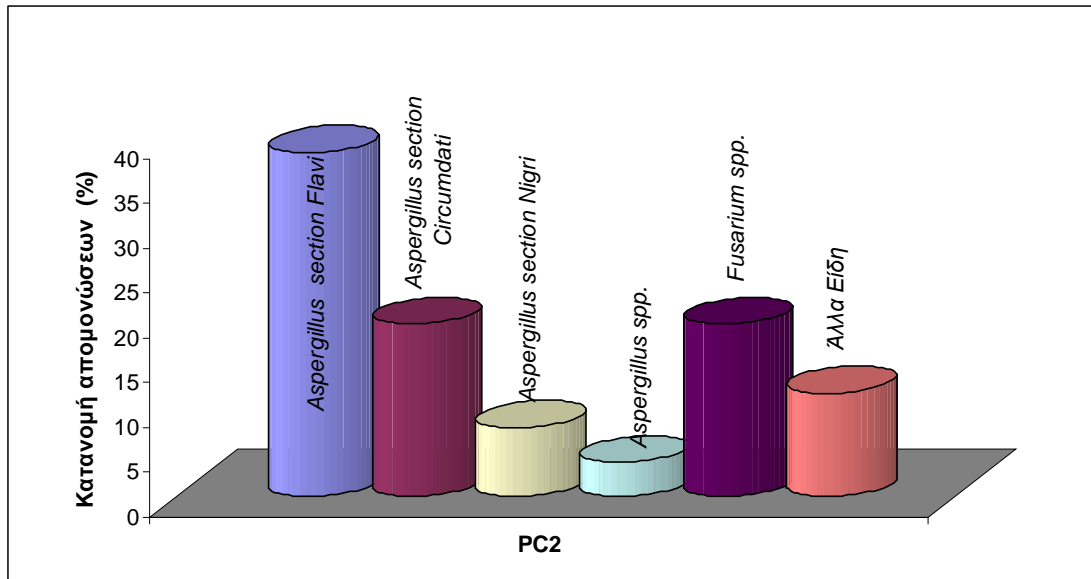
**Πίνακας 13.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το δεύτερο δείγμα PC2, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη <sup>1</sup>
PC2 1						X	1η
PC2 2	X <sup>2</sup>						
PC2 3				X			
PC2 6						X	
PC2 7		X					
	1 <sup>3</sup>	1		1		2	5
PC2 9					X		2η
PC2 10		X					
PC2 11		X					
PC2 12					X		
PC2 14	X						
	1	2			2		5
PC2 15	X						3η
PC2 17	X						
	2						2
PC2 19	X						4η
PC2 20	X						
PC2 21			X				
	2		1				3
PC2 22					X		5η
PC2 23		X					
		1			1		2
PC2 26		X					6η
		1					
PC2 27	X						7η
PC2 28					X		
	1				1		2
PC2 29						X	8η
PC2 30					X		
PC2 31	X						
	1				1	1	3
PC2 32	X						9η
PC2 33			X				
	1		1				2
PC2 34	X						10η
	1						
<b>Σύνολο</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>26</b>

1: Όπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn.

2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section.

3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 2.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του δεύτερου δείγματος popcorn.

Στο δεύτερο δείγμα κόκκων popcorn επίσης μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Flavi* καταλαμβάνουν σχεδόν το μισό ποσοστό του συνόλου των απομονώσεων 38,46% ενώ μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* και *Aspergillus section Circumdati* απομονώθηκαν με ποσοστό 19,23%. Το ποσοστό των απομονώσεων μυκήτων που ανήκουν στο *Aspergillus section Nigri* ήταν 7,69%. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο δεύτερο δείγμα ανήλθε στο 26%.

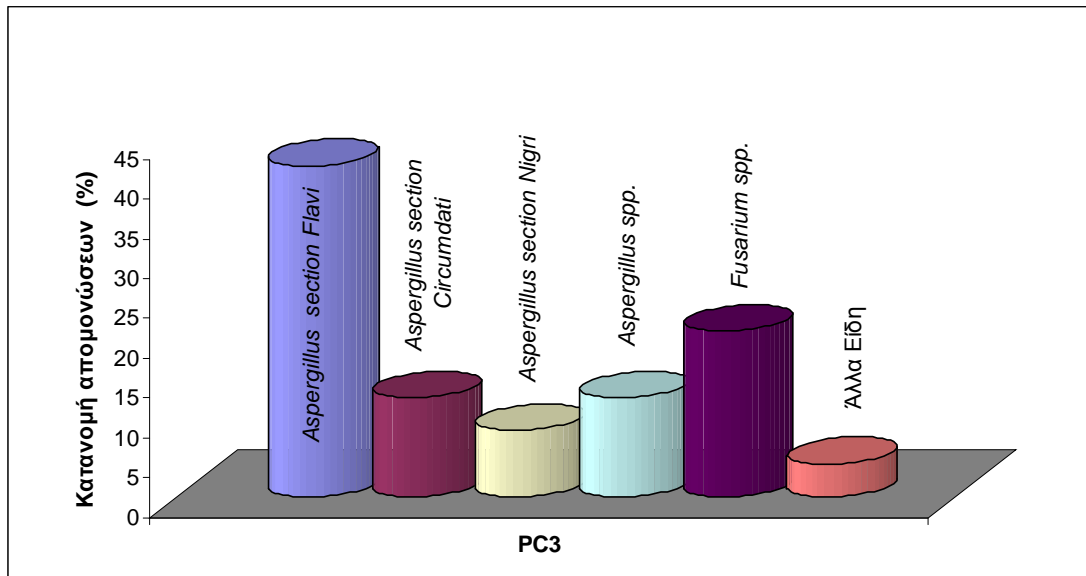
Στον πίνακα 14 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το τρίτο δείγμα κόκκων popcorn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 3 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το τρίτο δείγμα κόκκων popcorn σε επίπεδο γένους ή section.



**Πίνακας 14.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το τρίτο δείγμα PC3, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη <sup>1</sup>
PC3 1				X <sup>2</sup>			1η
PC3 2					X		
				1 <sup>3</sup>	1		2
PC3 3					X		2η
PC3 4	X						
PC3 5	X						
	2				1		3
PC3 6	X						3η
PC3 7			X				
PC3 8	X						
	2		1				3
PC3 9		X					4η
PC3 10					X		
PC3 11	X						
	1	1			1		3
PC3 12						X	5η
PC3 13				X			
				1		1	2
PC3 14			X				6η
PC3 15		X					
PC3 16	X						
	1	1	1				3
PC3 18					X		7η
PC3 19	X						
PC3 20		X					
	1	1			1		3
PC3 21					X		8η
PC3 22	X						
PC3 23	X						
	2				1		3
PC3 17	X						9η
PC3 25				X			
	1			1			2
Επιμόλυνση με βακτήρια							10η
							-
<b>Σύνολο</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>24</b>

- 1: Όπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn.
- 2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section.
- 3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 3.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του τρίτου δείγματος popcorn.

Στο τρίτο δείγμα κόκκων popcorn μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Flavi* καταλαμβάνουν όπως και στα προηγούμενα δύο δείγματα σχεδόν το μισό ποσοστό του συνόλου των απομονώσεων 41,67 % ενώ μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* απομονώθηκαν σε ποσοστό 20,83%. Μικρότερο ήταν το ποσοστό των μυκήτων που απομονώθηκαν και εντάχθηκαν στο *Aspergillus* section *Circumdati* και στο *Aspergillus* section *Nigri* 12,50% και 8,33% αντίστοιχα. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο τρίτο δείγμα ανήλθε στο 26,7%.

Στον πίνακα 15 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το τέταρτο δείγμα κόκκων popcorn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 4 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το τέταρτο δείγμα κόκκων popcorn σε επίπεδο γένους ή section.

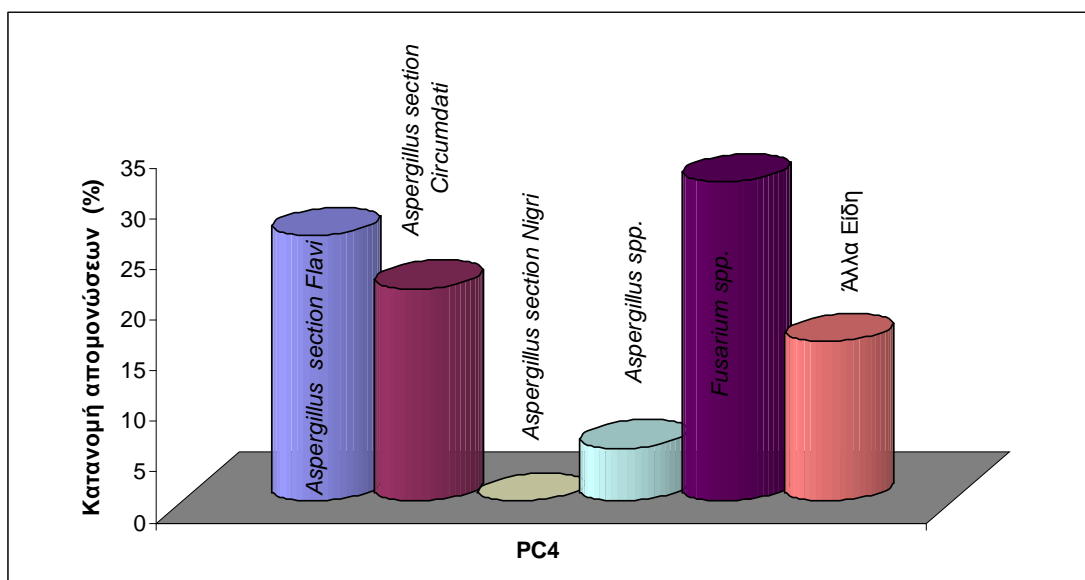
**Πίνακας 15.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το τέταρτο δείγμα PC4, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη <sup>1</sup>
PC4 1						X <sup>2</sup>	1η
						1 <sup>3</sup>	1
PC4 2	X						2η
PC4 3		X					
	1	1					2
PC4 5					X		3η
PC4 6				X			
				1	1		2
PC4 7	X						4η
PC4 8	X						
PC4 4		X					
	2	1					3
PC4 9		X					5η
PC4 10						X	
PC4 11	X						
	1	1				1	3
PC4 21	X						6η
PC4 22					X		
	1				1		2
PC4 23		X					7η
		1					1
PC4 24					X		8η
PC4 25						X	
PC4 26					X		
					2	1	3
PC4 27					X		9η
PC4 29					X		
					2		2
							10η
							0
<b>Σύνολο</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>19</b>

1: Όπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn.

2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section.

3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 4.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του τέταρτου δείγματος popcorn.

Στο τέταρτο δείγμα κόκκων popcorn μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* καταλαμβάνουν το υψηλότερο ποσοστό 31,58% του συνόλου των απομονώσεων ενώ μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Flavi* και στο *Aspergillus section Circumdati* απομονώθηκαν σε ποσοστό 26,32% και 21,05% αντίστοιχα. Δεν απομονώθηκε κανένας μύκητας που να ανήκει στο *Aspergillus section Nigri*. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο τέταρτο δείγμα ανήλθε στο 19%.

Στον πίνακα 16 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το πέμπτο δείγμα κόκκων popcorn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 5 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το πέμπτο δείγμα κόκκων popcorn σε επίπεδο γένους ή section.

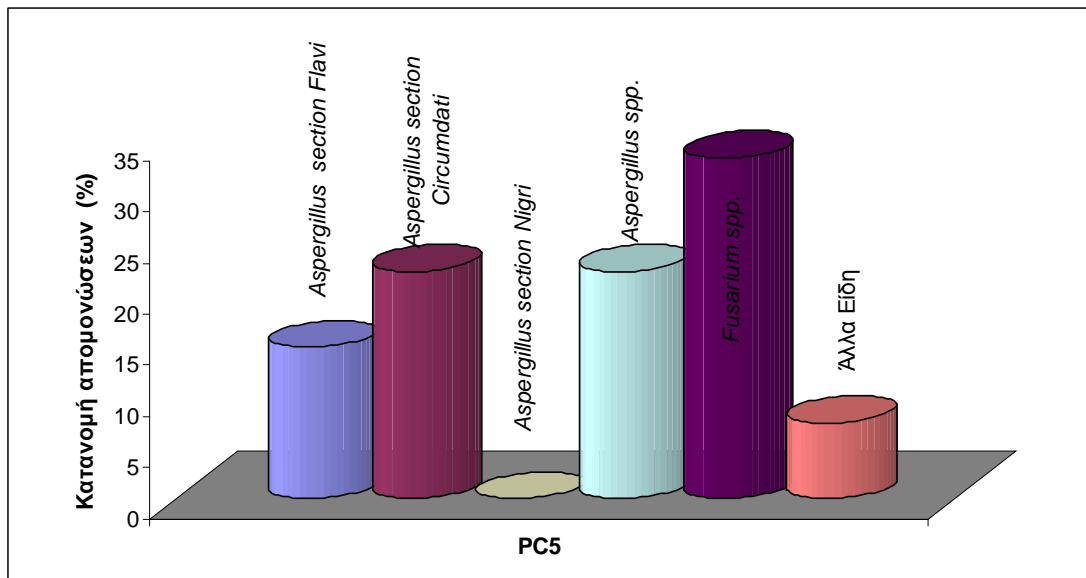
**Πίνακας 16.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το πέμπτο δείγμα PC5, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη <sup>1</sup>
PC5 1		X <sup>2</sup>					1η
PC5 2				X			
		1 <sup>3</sup>		1			2
PC5 3						X	2η
PC5 4					X		
PC5 5					X		
PC5 6				X			
				1	2	1	4
PC5 7		X					3η
PC5 8		X					
PC5 9					X		
		2			1		3
PC5 10		X					4η
PC5 11				X			
		1		1			2
PC5 12		X					5η
PC5 13		X					
PC5 14				X			
		2		1			3
PC5 21					X		6η
PC5 22				X			
				1	1		2
PC5 23						X	7η
PC5 24	X						
	1					1	2
PC5 25				X			8η
PC5 26					X		
PC5 27	X						
	1			1	1		3
PC5 28					X		9η
PC5 29					X		
PC5 30	X						
PC5 31					X		
	1				3		4
PC5 33					X		10η
PC5 34	X						
	1				1		2
<b>Σύνολο</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>27</b>

1: Οπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn.

2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section.

3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 5.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του πέμπτου δείγματος popcorn.

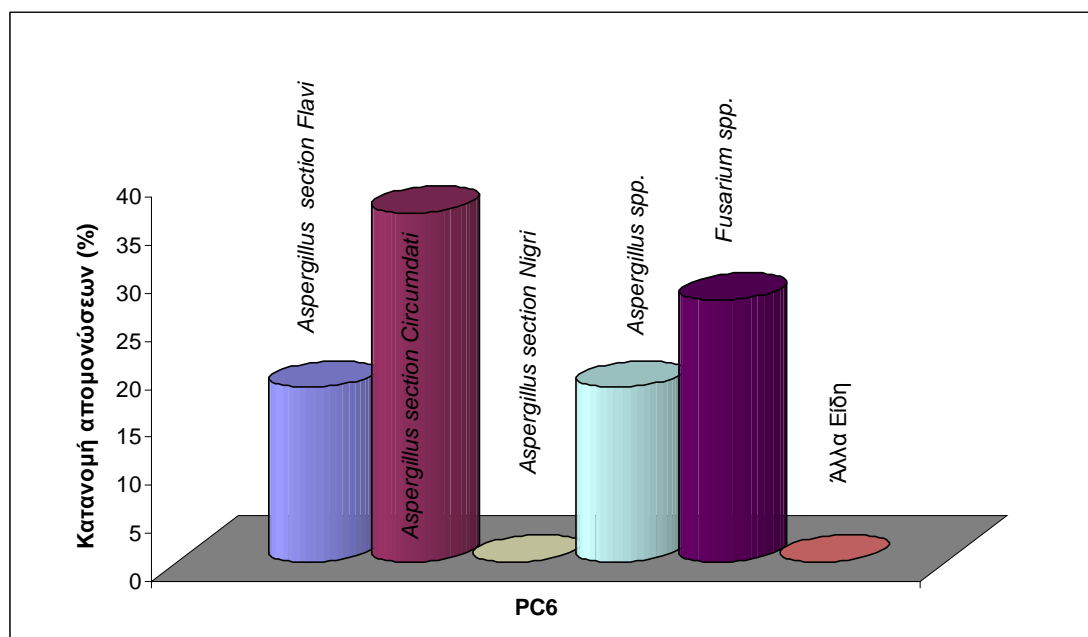
Στο πέμπτο δείγμα κόκκων popcorn μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* καταλαμβάνουν όπως και στο προηγούμενο το υψηλότερο ποσοστό 33,33% του συνόλου των απομονώσεων ενώ μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Circumdati* και στο *Aspergillus section Flavi* απομονώθηκαν σε ποσοστό 22,22% και 14,81% αντίστοιχα. Δεν απομονώθηκε κανένας μύκητας που να ανήκει στο *Aspergillus section Nigri*. Επίσης υψηλό ήταν το ποσοστό των απομονώσεων του γένους *Aspergillus* που δεν εντάχθηκε σε κάποιο από τα προαναφερόμενα section. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο πέμπτο δείγμα ανήλθε στο 27%.

Στον πίνακα 17 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το έκτο δείγμα κόκκων popcorn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 6 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το έκτο δείγμα κόκκων popcorn σε επίπεδο γένους ή section.

**Πίνακας 17.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το έκτο δείγμα PC6, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη <sup>1</sup>
							1η
							0
PC6 4				X			2η
PC6 5		X <sup>2</sup>					
		1 <sup>3</sup>		1			2
PC6 9		X					3η
PC6 10		X					
PC6 11		X					
		3					3
PC6 12					X		4η
PC6 17				X			
				1	1		2
PC6 21					X		5η
PC6 23	X						
PC6 24	X						
	2				1		3
PC6 28					X		6η
					1		1
							7η
							0
							8η
							0
							9η
							0
							10η
							0
<b>Σύνολο</b>	<b>2</b>	<b>4</b>		<b>2</b>	<b>3</b>		<b>11</b>

- 1: Όπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn.  
 2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section.  
 3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 6.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του έκτου δείγματος popcorn.

Στο έκτο δείγμα κόκκων popcorn το 1/3 και πλέον των απομονωθέντων μυκήτων εντάχθηκε στο *Aspergillus section Circumdati* ποσοστό 36,36% ενώ μύκητες που ανήκουν στο γένος *Fusarium* απομονώθηκαν σε ποσοστό 27,27%. Μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Flavi* απομονώθηκαν σε ποσοστό 18,18%. Δεν απομονώθηκε κανένας μύκητας που να ανήκει στο *Aspergillus section Nigri*. Επίσης υψηλό ήταν το ποσοστό απομονώσεων του γένους *Aspergillus* που δεν εντάχθηκε σε κάποιο από τα προαναφερόμενα section. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο έκτο δείγμα ανήλθε στο 11%.

Στον πίνακα 18 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από το έβδομο δείγμα κόκκων popcorn, σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section. Το διάγραμμα 7 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το έβδομο δείγμα κόκκων popcorn σε επίπεδο γένους ή section.



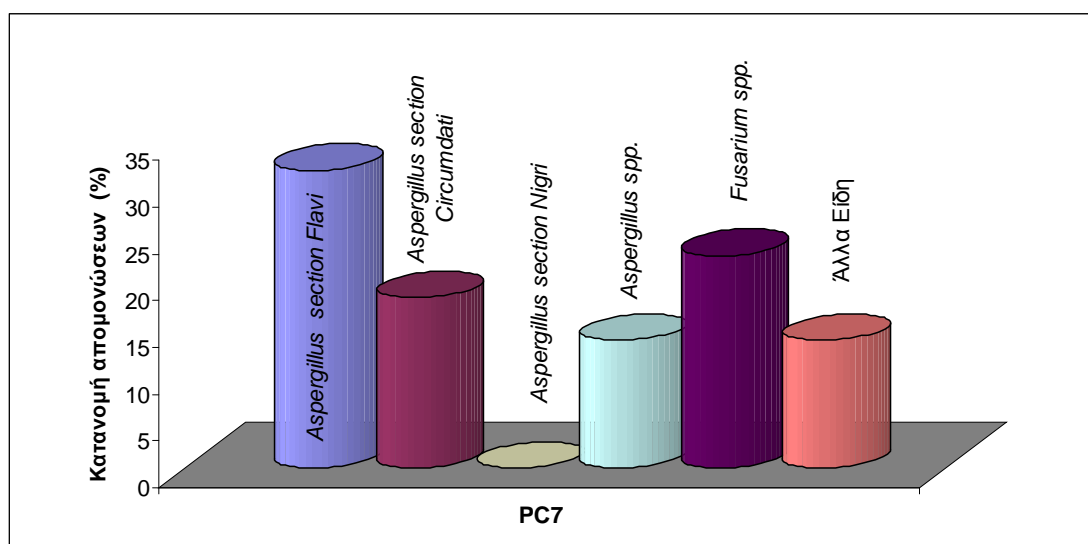
**Πίνακας 18.** Συστηματική κατάταξη των μυκήτων που απομονώθηκαν από το έβδομο δείγμα PC7, κόκκων pop corn σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη <sup>1</sup>
PC7 1	X <sup>2</sup>						1η
PC7 2	X						
PC7 3	X						
	3 <sup>3</sup>						3
PC7 4		X					2η
		1					1
PC7 5					X		3η
PC7 6				X			
PC7 7				X			
PC7 8		X					
		1		2	1		4
PC7 10	X						4η
PC7 11						X	
	1					1	2
PC7 13					X		5η
PC7 14						X	
					1	1	2
PC7 15						X	6η
						1	1
PC7 17					X		7η
					1		1
PC7 19				X			8η
PC7 20					X		
				1	1		2
PC7 22					X		9η
PC7 23		X					
		1			1		2
PC7 24		X					10η
PC7 25	X						
PC7 26	X						
PC7 27	X						
	3	1					4
<b>Σύνολο</b>	<b>7</b>	<b>4</b>		<b>3</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>22</b>

1: Όπου επανάληψη αναφέρεται κάθε ξεχωριστό τριβλίο που είχαν τοποθετηθεί 10 κόκκοι pop corn

2: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section

3: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 7.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων του έβδομου δείγματος pop corn.

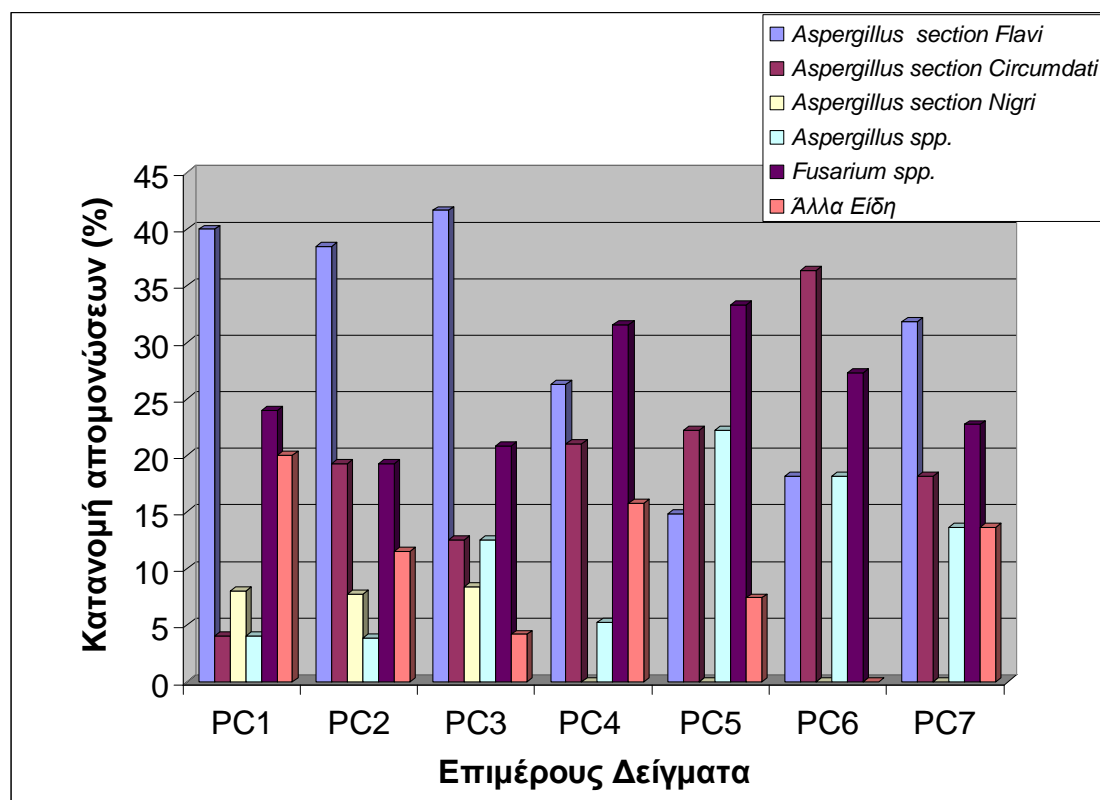
Στο έβδομο δείγμα κόκκων pop corn το 1/3 περίπου των απομονωθέντων μυκήτων εντάχθηκαν στο *Aspergillus section Flavi* ποσοστό 31,82%. Οι απομονώσεις του γένους *Fusarium* είχαν ποσοστό 22,73% ενώ μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus section Circumdati* απομονώθηκαν σε ποσοστό 18,18%. Δεν απομονώθηκε κανένας μύκητας που να ανήκει στο *Aspergillus section Nigri*. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων στο έβδομο δείγμα ανήλθε στο 22%.

Στον πίνακα 19 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section του συνόλου των απομονώσεων των επτά δειγμάτων κόκκων pop corn.

**Πίνακας 19.** Συστηματική κατάταξη του συνόλου των απομονώσεων από τα επτά δείγματα κόκκων pop corn

Κωδ. Απομ.	<i>Aspergillus section Flavi</i>	<i>Aspergillus section Circumdati</i>	<i>Aspergillus section Nigri</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	Άλλα Είδη	Σύν. Μολ. κόκκων
PC1	10	1	2	1	6	5	25
PC2	10	5	2	1	5	3	26
PC3	10	3	2	3	5	1	24
PC4	5	4	0	1	6	3	19
PC5	4	6	0	6	9	2	27
PC6	2	4	0	2	3	0	11
PC7	7	4	0	3	5	3	22
<b>Σύνολο</b>	<b>48</b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>39</b>	<b>17</b>	<b>154</b>

Το διάγραμμα 8 δείχνει τα ποσοστά κατανομής των απομονώσεων στα επιμέρους δείγματα



**Διάγραμμα 8.** Ποσοστό κατανομής των απομονώσεων στα επιμέρους δείγματα pop corn

### 3.1.3.2 Ταξινόμική κατάταξη σε επίπεδο γένους ή σε επίπεδο section των μυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα αραβοσιτάλευρου

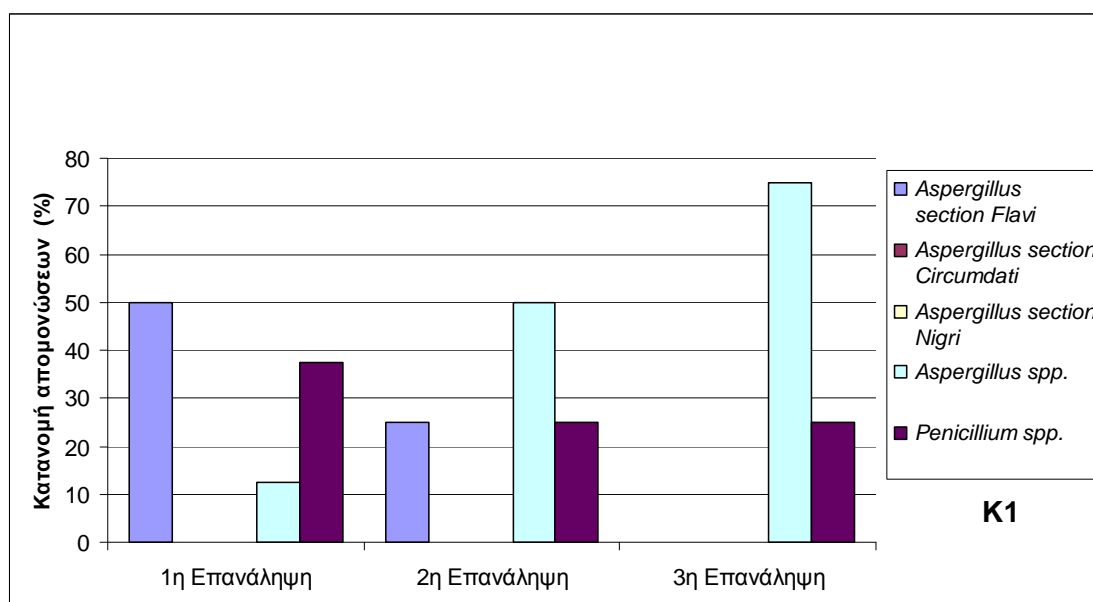
Στον πίνακα 20 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων που ελήφθησαν από τα τριβλία που η περιεκτικότητα ήταν  $10^{-1}$  g/ml για το πρώτο δείγμα αραβοσιτάλευρου. Στο διάγραμμα 9 που ακολουθεί απεικονίζεται την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το πρώτο δείγμα αραβοσιτάλευρου σε επίπεδο γένους ή section

**Πίνακας 20.** Συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου σε επίπεδο είδους ή σε επίπεδο section από το πρώτο δείγμα K1 σε συγκέντρωση  $10^{-1}$  g/ml

Κωδ. Δειγμ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη
K1 1					X <sup>1</sup>		1 <sup>n</sup>
K1 2					X		
K1 3				X			
K1 4					X		
K1 5	X						
K1 6	X						
K1 7	X						
K1 8	X						
	4 <sup>2</sup>			1	3		8
K1 11				X			2 <sup>n</sup>
K1 12				X			
K1 13				X			
K1 14					X		
K1 15				X			
K1 16					X		
K1 17	X						
K1 18	X						
	2			4	2		8
K1 21					X		3 <sup>n</sup>
K122				X			
K1 23				X			
K1 24				X			
				3	1		4
<b>Σύνολο</b>	<b>6</b>			<b>8</b>	<b>6</b>		<b>20</b>

1: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section

2: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 9.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων από το πρώτο δείγμα αραβοσιτάλευρου περιεκτικότητα  $10^{-1}$  g/ml

Στο πρώτο δείγμα αραβοσιτάλευρου μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Flavi* απομονώθηκαν σε ποσοστό 50 % στην πρώτη επανάληψη 25% στη δεύτερη επανάληψη και δεν απομονώθηκαν καθόλου στην τρίτη επανάληψη. Μύκητες που ανήκουν στο γένος *Penicillium* απομονώθηκαν σε ποσοστό 37,5 % στην πρώτη επανάληψη και 25% στην δεύτερη και τρίτη επανάληψη. Τέλος μύκητες που ανήκουν στο γένος *Aspergillus* απομονωθήκαν σε ποσοστό 12,5 % στην πρώτη επανάληψη, 50% στη δεύτερη επανάληψη και 75% στην τρίτη επανάληψη. Στο πρώτο δείγμα αραβοσιτάλευρου δεν βρέθηκε καμία απομόνωση που να ανήκει στο *Aspergillus* section *Nigri* και στο *Aspergillus* section *Circumdati*. Μύκητες του γένους *Fusarium* δεν ήταν δυνατόν να καταμετρηθούν και να απομονωθούν σε αυτή την περιεκτικότητα λόγω της υψηλής πυκνότητας των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τριβλίο.

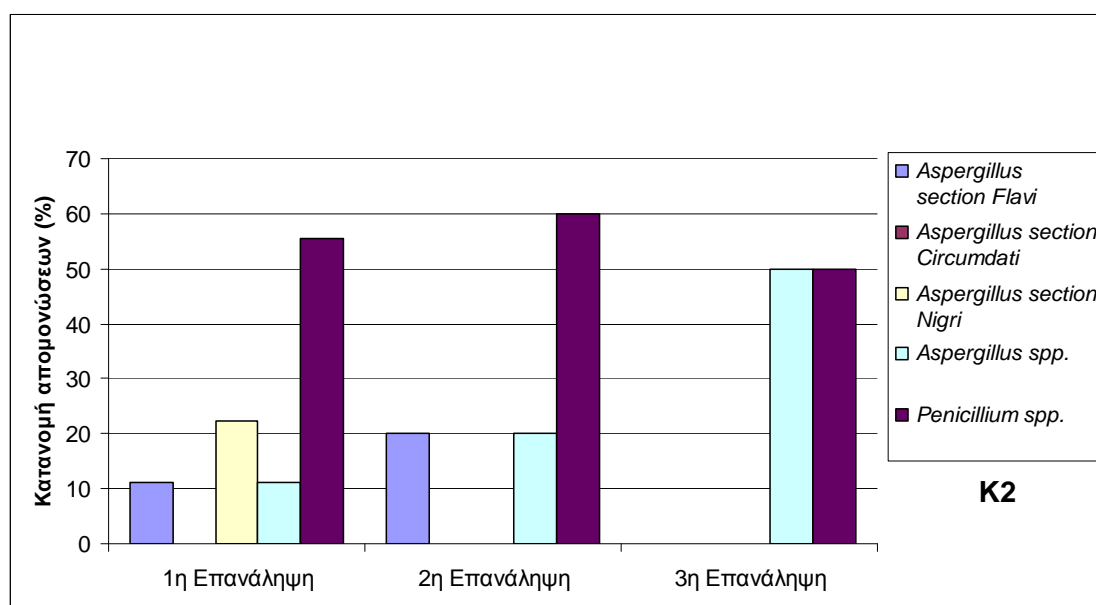
Στον πίνακα 21 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων που ελήφθησαν από τα τριβλία που η περιεκτικότητα ήταν  $10^{-1}$  g/ml για το δεύτερο δείγμα αραβοσιτάλευρου. Στο διάγραμμα 10 που ακολουθεί απεικονίζει την ποσοστιαία κατανομή των απομονώσεων μυκήτων από το δεύτερο δείγμα αραβοσιτάλευρου σε επίπεδο γένους ή section.

**Πίνακας 21.** Συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου σε επίπεδο είδους ή σε επίπεδο section από το δεύτερο δείγμα K2 σε συγκέντρωση  $10^{-1}$  g/ml

Κωδ. Δειγμ.	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	Άλλα Είδη	Επανάληψη
K2 6			X <sup>1</sup>				1 <sup>η</sup> Επανάληψη
K2 7	X						
K2 8			X				
K2 9					X		
K2 10					X		
K2 11					X		
K2 12					X		
K2 13				X			
K2 14					X		
	1 <sup>2</sup>		2	1	5		9
K2 15	X						2 <sup>η</sup> Επανάληψη
K2 16					X		
K2 17					X		
K2 18					X		
K2 19				X			
	1			1	3		5
K2 20				X			3 <sup>η</sup> Επανάληψη
K2 21					X		
				1	1		2
<b>Σύνολο</b>	<b>2</b>		<b>2</b>	<b>3</b>	<b>9</b>		<b>16</b>

1: Το X συμβολίζει την ένταξη της απομόνωσης σε συγκεκριμένο γένος ή section

2: Ο αριθμός των απομονώσεων που προέκυψαν για κάθε γένος ή section στην κάθε επανάληψη.



**Διάγραμμα 10.** Ποσοστιαία κατανομή απομονώσεων από το δεύτερο δείγμα αραβοσιτάλευρου περιεκτικότητας  $10^{-1}$  g/ml

Στο δεύτερο δείγμα αραβοσιτάλευρου μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Flavi* απομονώθηκαν σε ποσοστό 11,11 % στην πρώτη επανάληψη 20% στη δεύτερη επανάληψη και δεν απομονώθηκαν καθόλου στην τρίτη επανάληψη. Μύκητες που ανήκουν στο γένος *Penicillium* απομονώθηκαν σε ποσοστό 55,56 % στην πρώτη επανάληψη 60% στην δεύτερη επανάληψη και 50% στην τρίτη επανάληψη. Τέλος μύκητες που ανήκουν στο γένος *Aspergillus* απομονώθηκαν σε ποσοστό 11,11 % στην πρώτη επανάληψη, 20% στη δεύτερη επανάληψη και 50% στην τρίτη επανάληψη. Στο δεύτερο δείγμα αραβοσιτάλευρου μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Nigri* απομονώθηκαν σε ποσοστό 22,22% μόνο στην πρώτη επανάληψη ενώ δεν βρέθηκε καμία απομόνωση που να ανήκει στο *Aspergillus* section *Circumdati*. Μύκητες του γένους *Fusarium* δεν ήταν δυνατόν να καταμετρηθούν και να απομονωθούν σε αυτή την περιεκτικότητα λόγω της υψηλής πυκνότητας των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τριβλίο.

Στον πίνακα 22 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων που ελήφθησαν από τα τριβλία που η περιεκτικότητα ήταν  $10^{-1}$  g/ml και  $10^{-2}$  g/ml για τα δύο δείγματα αραβοσιτάλευρου. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα στη περιεκτικότητα  $10^{-2}$  g/ml οι μύκητες που απομονώθηκαν εντάχθηκαν αποκλειστικά στο γένος *Fusarium*.

**Πίνακας 22.** Συστηματική κατάταξη των απομονώσεων μυκήτων από αλεύρι αραβοσίτου σε επίπεδο είδους ή σε επίπεδο section από το πρώτο (K1) και δεύτερο (K2) δείγμα

Δείγμα/ Επανάληψη		Περιεκτικότητα $10^{-1}$ g/ml				Περιεκτικότητα $10^{-2}$ g/ml	
		<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
K1	1 <sup>η</sup>	4			1	3	13
	2 <sup>η</sup>	2			4	2	23
	3 <sup>η</sup>				3	1	17
Σύνολο		6	0	0	8	6	53
K2	1 <sup>η</sup>	1		2	1	5	1
	2 <sup>η</sup>	1			1	3	2
	3 <sup>η</sup>				1	1	9
Σύνολο		2	0	2	3	9	12

### 3.1.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των απομονώσεων μυκήτων από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο.

Στον πίνακα 23 παρουσιάζεται η σχετική πυκνότητα και η συχνότητα εμφάνισης των απομονώσεων μυκήτων από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο.

**Πίνακας 23.** Σχετική πυκνότητα και Συχνότητα Εμφάνισης των απομονώσεων μυκήτων από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο

Γένος – Section Μύκητα	Αριθμός απομονώσεων	Σχετική Πυκνότητα <sup>1</sup>	Συχνότητα Εμφάνισης <sup>2</sup>
Κόκκοι pop corn : Αριθμός δειγμάτων = 7			
<i>Aspergillus</i> spp.	98	63,6	100
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	48	31,1	100
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	27	17,5	100
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	6	3,9	42,8
<i>Fusarium</i> spp.	39	25,3	100
<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0
Αραβοσιτάλευρο: Αριθμός δειγμάτων = 2			
Πυκνότητα 10 <sup>-1</sup> g/ml			
<i>Aspergillus</i> spp.	21	58,3	100
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	8	22,2	100
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	0	0	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	2	5,5	50
<i>Penicillium</i> spp.	15	41,7	100
Πυκνότητα 10 <sup>-2</sup> g/ml			
<i>Fusarium</i> spp.	65	100	100

1. Σχετική πυκνότητα = (Αριθμό απομονώσεων συγκεκριμένου γένους ή section / Συνολικός αριθμός απομονώσεων) X 100

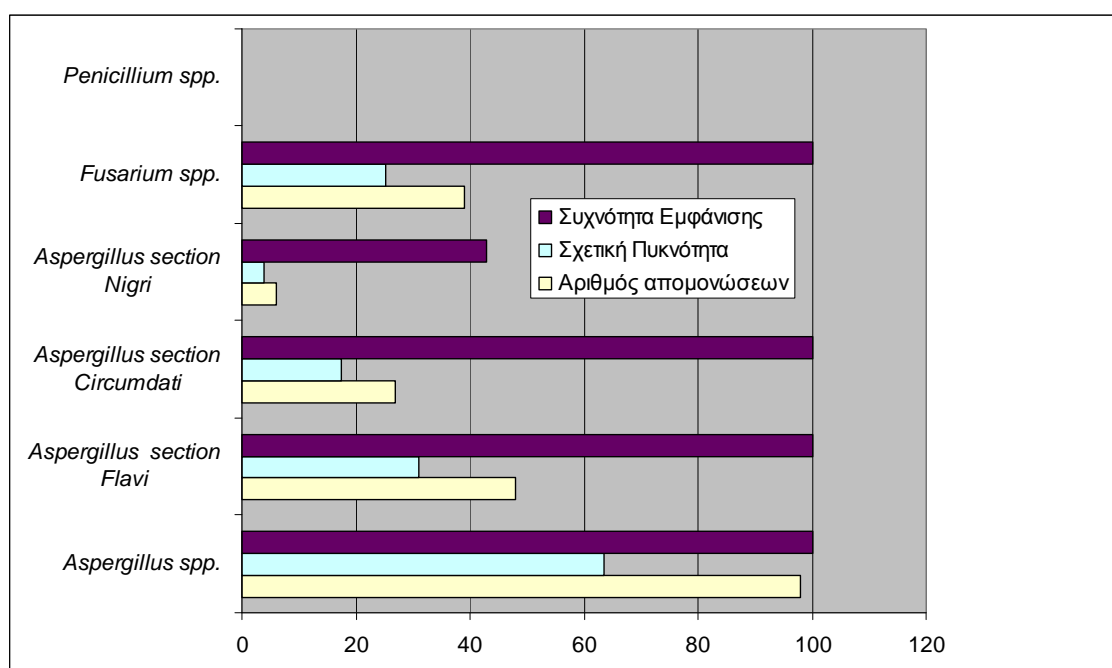
2. Συχνότητα Εμφάνισης = (Αριθμός δειγμάτων που ανιχνεύθηκε το συγκεκριμένο γένος ή section / Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν) X100

Σύμφωνα με το παραπάνω πίνακα μύκητες που εντάχθηκαν στο *Aspergillus* section *Flavi*, στο γένος *Fusarium* και στο *Aspergillus* section *Circumdati* εμφανίστηκαν στο 100% των δειγμάτων κόκκων pop corn και απομονώθηκαν σε σχετική πυκνότητα 31,1, 25,3 και 17,5 αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά μύκητες του *Aspergillus* section *Nigri* απομονώθηκαν από τα μισά περίπου δείγματα και η σχετική πυκνότητα τους ήταν χαμηλή 3,9. Μύκητες του γένους *Penicillium* δεν απομονώθηκαν από κανένα δείγμα κόκκων pop corn.

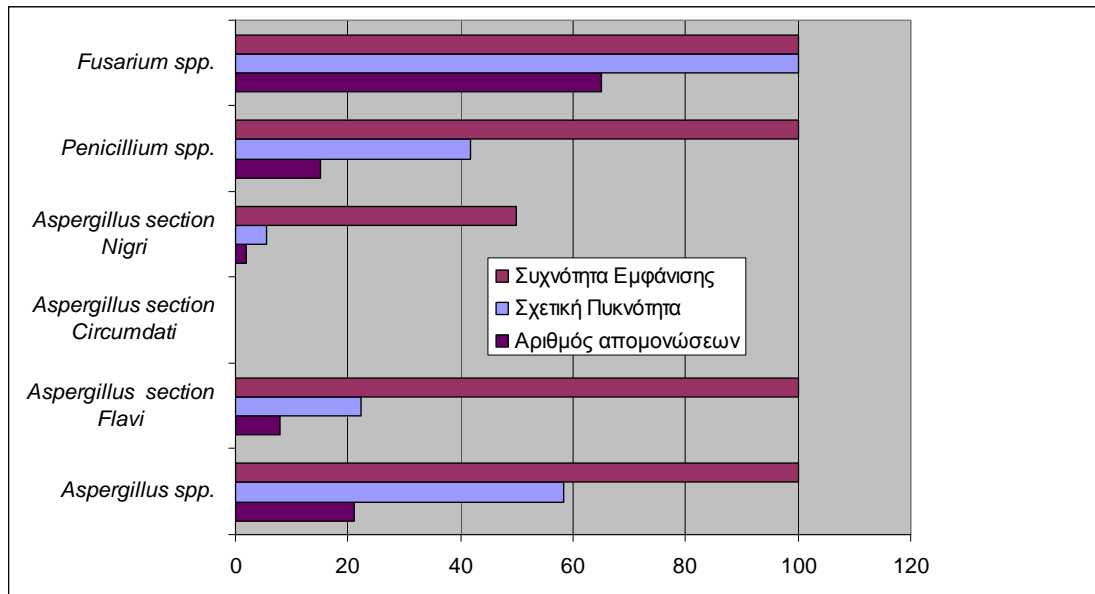


Επίσης σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα μύκητες που εντάχθηκαν στα γένη *Fusarium*, *Aspergillus* και *Penicillium* εμφανίσθηκαν στο 100% των δειγμάτων αραβοσιτάλευρου και απομονώθηκαν σε σχετική πυκνότητα 100, 58,3 και 41,7 αντίστοιχα. Σ' ότι αφορά τα επιμέρους section μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Flavi* και στο *Aspergillus* section *Nigri* ανιχνεύθηκαν στο 100% και στο 50% των δειγμάτων αντίστοιχα. Αντίθετα μύκητες που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Circumdati* δεν απομονώθηκαν από κανένα δείγμα αραβοσιτάλευρου.

Τα αποτελέσματα αυτά δίνονται και στα διαγράμματα 11 και 12 για τους κόκκους pop corn και για το αραβοσιτάλευρο αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 11.** Σχετική πυκνότητα και συχνότητα εμφάνισης των γενών ή των section μυκήτων που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn.



**Διάγραμμα 12.** Σχετική πυκνότητα και συχνότητα εμφάνισης των γενών ή των section μυκήτων που απομονώθηκαν από αραβοσιτάλευρο.

### 3.2 Αποτελέσματα συγκέντρωσης και καθαρότητας ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Fusarium*.

Στον πίνακα 24 παρουσιάζεται η συγκέντρωση και η καθαρότητα του ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Fusarium*. Η μέτρηση έγινε με τη χρήση NanoDrop σπεκτροφωτομέτρου. Αποδεκτές τιμές καθαρότητας για το DNA είναι μεταξύ του 1,81 και 2 (Sambrook *et al.*, 1989)

**Πίνακας 24.** Συγκέντρωση και καθαρότητα ολικού DNA απομονώσεων του γένους *Fusarium*

Κωδ. Δείγματος DNA	Κωδ. Απομόνωσης	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα
F1	PC1 4	61,5	1,90
F2	PC1 9	199,5	2,02
F3	PC1 12	396,5	2,05
F4	PC1 15	76	1,91
F5	PC1 28	29,8	1,90
F6	PC1 37	36,7	1,81
F7	PC2 9	17,4	1,59
F8	PC2 12	18	2,01
F9	PC2 22	4,7	1,74
F10	PC2 28	73,5	1,72
F11	PC2 30	46	2,12
F12	PC4 5	58,3	1,90
F13	PC4 22	317,1	2,14
F14	PC4 24	56,1	2,1
F15	PC4 26	322,3	2,16
F16	PC4 27	477,1	2,17
F17	PC4 29	147,4	2,12
F18	PC3 2	3966,98	2,11
F19	PC3 3	1306,4	2,16
F20	PC3 10	159,60	2,20
F21	PC3 21	934,25	2,18
F22	PC5 4	23,5	1,81
F23	PC5 5	2805,78	2,11
F24	PC5 9	51,6	1,97
F25	PC5 21	795	2,18
F26	PC5 26	2265,96	2,13
F27	PC5 28	46	2,08
F28	PC5 29	505,8	2,11
F29	PC5 31	57,69	2,29
F30	PC5 33	214,57	2,08
F31	PC7 5	288,5	2,09
F32	PC7 13	115,31	1,81
F33	PC7 17	4349,9	2,07
F34	PC7 20	1531,7	2,17

F35	PC6 12	64,98	1,99
F36	PC6 21	1626,2	2,15
F37	PC6 28	4100,21	2,07
F38	K1 10	3131,79	2,12
F39	K1 19	466,49	2,10
F40	K1 26	1339,26	2,12
F41	K2 1	2431,6	2,17
F42	K2 2	187,35	2,10
F43	K2 4	63,93	2,14
F44	PC3 18	465,10	2,12

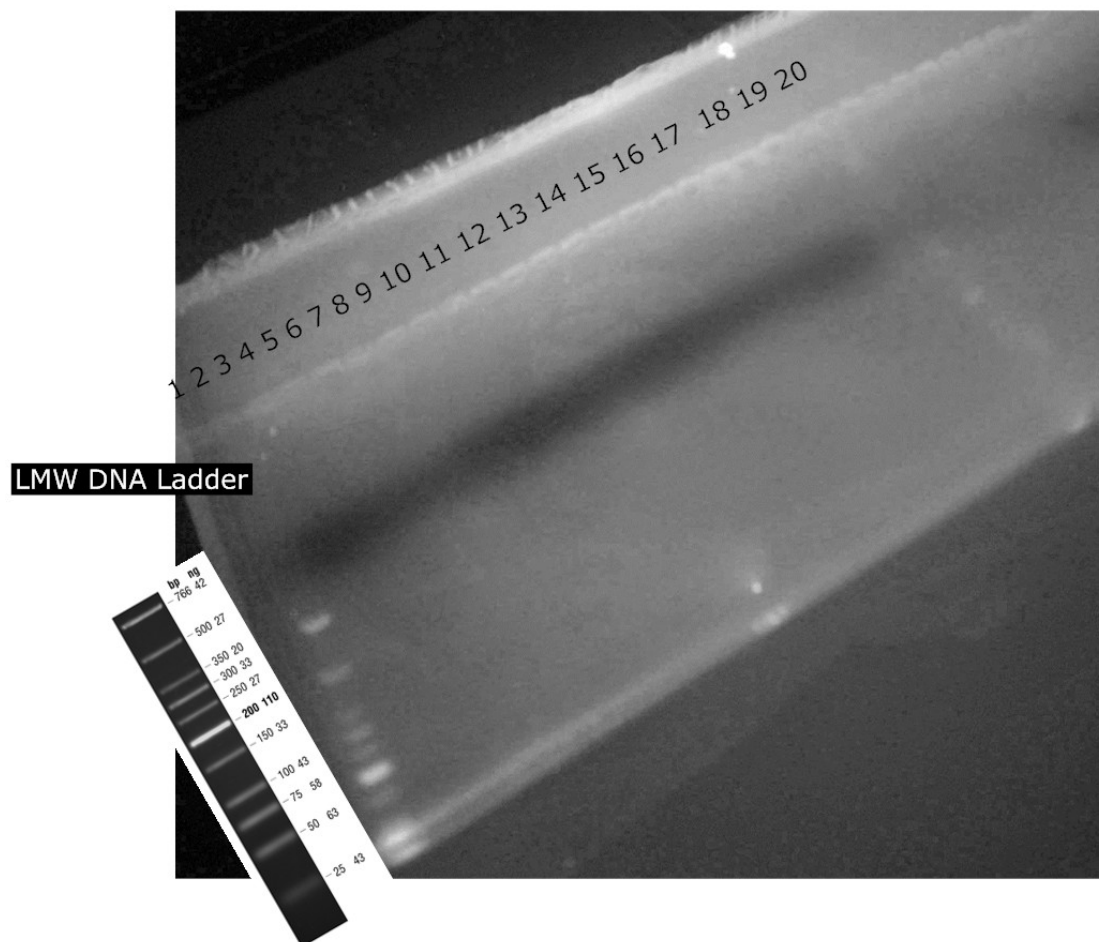
Όπως φαίνεται από τον πίνακα το ολικό DNA που προήλθε από τις περισσότερες απομονώσεις έδωσαν λόγο απορρόφησης 260/280 που κυμαίνονταν μεταξύ του 1,90 και 2,10. Υπήρξαν τρεις απομονώσεις που η καθαρότητα ήταν λίγο κάτω από το όριο του 1,80 οπότε θεωρούνταν γενικά απαλλαγμένες πρωτεϊνών.

Επίσης η συγκέντρωση του ολικού DNA ήταν στις περισσότερες των περιπτώσεων υψηλή και μάλιστα σε τέσσερις απομονώσεις πάρα πολύ υψηλή.

Ο παραπάνω πίνακας δείχνει ότι το προσαρμοσμένο πρωτόκολλο εξαγωγής ολικού DNA που εφαρμόστηκε για τις απομονώσεις του γένους *Fusarium* αν και χρονοβόρο είναι αποτελεσματικό και δίνει καλής ποιότητας DNA . Επίσης η σύνθλιψη των υφών στο ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς τη χρήση υγρού αζώτου δε φάνηκε να επηρεάζει την ποιότητα του DNA που τελικά εξήχθη.

### **3.3.1 Κατάταξη απομονώσεων του γένους *Fusarium* σε επίπεδο είδους με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών**

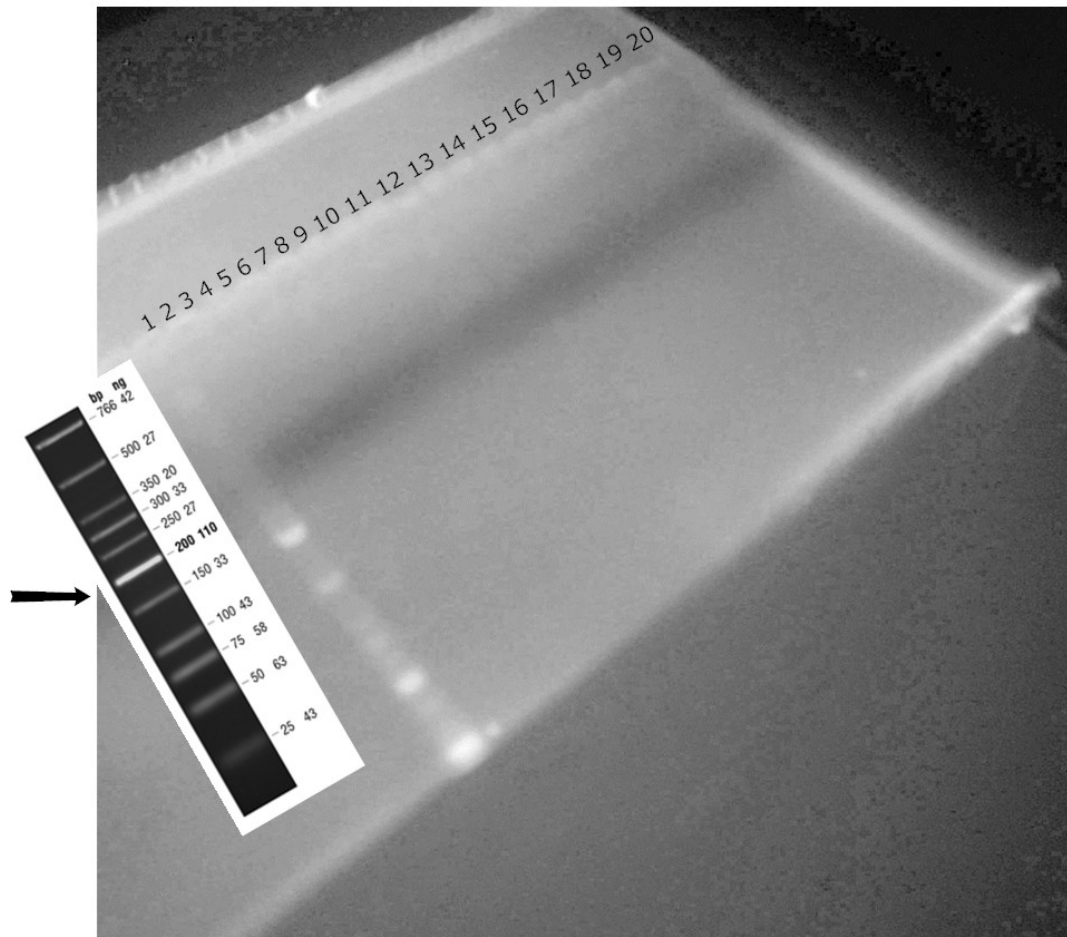
Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των προϊόντων της PCR όπου χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών Fgr και Fgc για την κατάταξη με μοριακές μεθόδους απομονώσεων του γένους *Fusarium* στο είδος *Fusarium graminearum* φαίνεται στην εικόνα 30. Καμία από τις απομονώσεις που ελέγχθηκαν δεν έδωσαν προϊόν PCR στα 500 bp όπως αναμένεται από απομονώσεις του είδους *Fusarium graminearum*.



**Εικόνα 30.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fgr / Fgc σε πήγμα αγαρόζης

**Θέση 1.:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** κενό, **Θέση 3:** PC1 9, **Θέση 4:** PC1 15, **Θέση 5:** PC2 30, **Θέση 6:** PC4 22, **Θέση 7:** PC4 26, **Θέση 8:** PC3 2, **Θέση 9:** PC3 3, **Θέση 10:** PC5 4, **Θέση 11:** PC5 26, **Θέση 12:** PC5 33, **Θέση 13:** PC7 5, **Θέση 14:** PC7 20, **Θέση 15:** PC6 21, **Θέση 16:** PC6 28, **Θέση 17:** K1 19, **Θέση 18:** K2 2, **Θέση 19:** Αρ.μάρ. – *B. cinerea* **Θέση 20:** Αρν. μάρ. - υπερκάθαρο νερό

Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των προϊόντων της PCR όπου χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών Fcu και Fgc για την κατάταξη απομονώσεων του γένους *Fusarium* με μοριακές μεθόδους στο είδος *Fusarium culmorum* φαίνεται στην εικόνα 31. Καμία από τις απομονώσεις που ελέγχθηκαν δεν έδωσαν προϊόν PCR στα 200 bp όπως αναμένεται από απομονώσεις του είδους *Fusarium culmorum*.

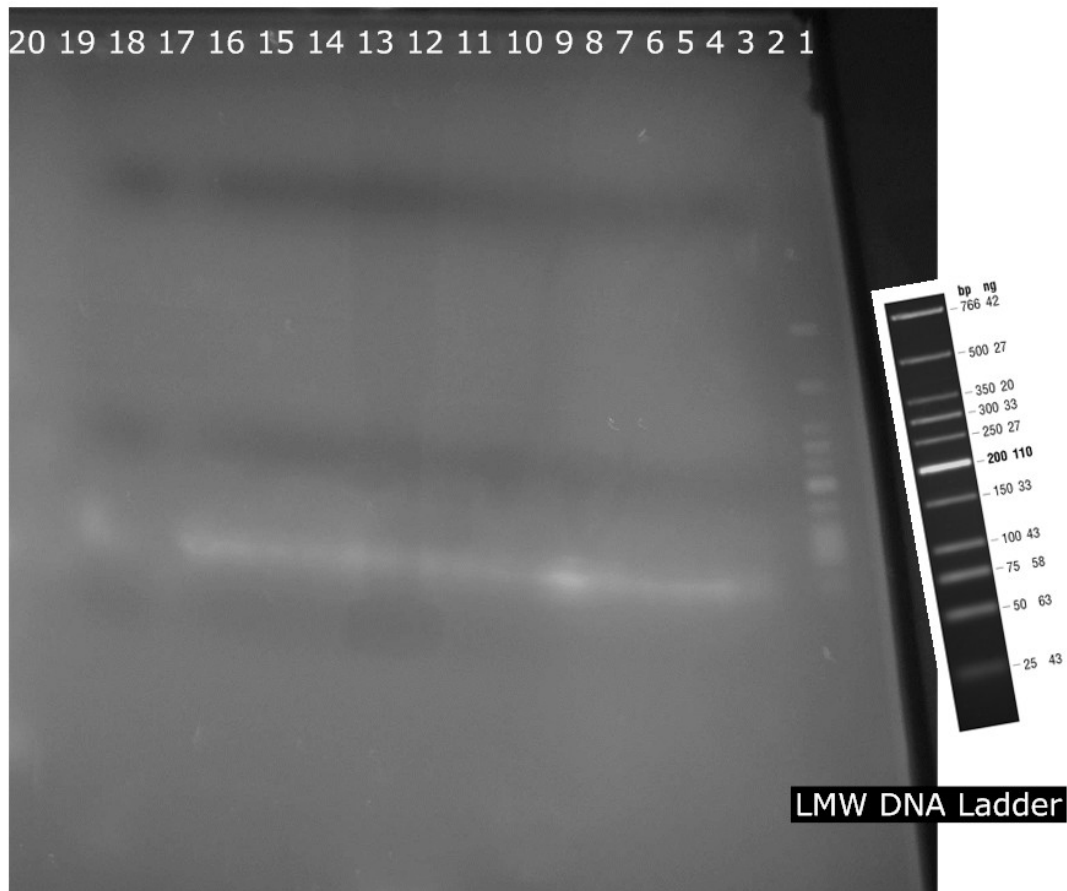


**Εικόνα 31.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fcu / Fgc σε πήγμα αγαρόζης

**Θέση 1.:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** κενό, **Θέση 3** PC1 9, **Θέση 4.** PC1 15, **Θέση 5:** PC2 30, **Θέση 6:** PC4 22, **Θέση 7:** PC4 26, **Θέση 8:** PC3 2, **Θέση 9:** PC3 3, **Θέση 10:** PC5 4, **Θέση 11:** PC5 26, **Θέση 12:** PC5 33, **Θέση 13:** PC7 5, **Θέση 14:** PC7 20, **Θέση 15:** PC6 21, **Θέση 16:** PC6 28, **Θέση 17:** K1 19, **Θέση 18:** K2 2, **Θέση 19:** Αρ.μάρ. – *B. cinerea*, **Θέση 20:** Αρν. μάρ.- υπερκάθαρο νερό

Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των προϊόντων της PCR που χρησιμοποιήθηκαν τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών Fps - Fsp και Fps - Fpo για την κατάταξη απομονώσεων του γένους *Fusarium* με μοριακές μεθόδους σε ένα από τα δύο είδη *F. sporotrichioides* ή *F. roae*. φαίνεται στην εικόνα 32. Καμία από τις απομονώσεις που ελέγχθηκαν δεν έδωσαν προϊόν PCR στα 400 bp όπως αναμένεται από απομονώσεις των ειδών *F. sporotrichioides* ή *F. roae*.

Οι ζώνες που εμφανίσθηκαν στην περιοχή των 25 bp είναι οι ζώνες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.



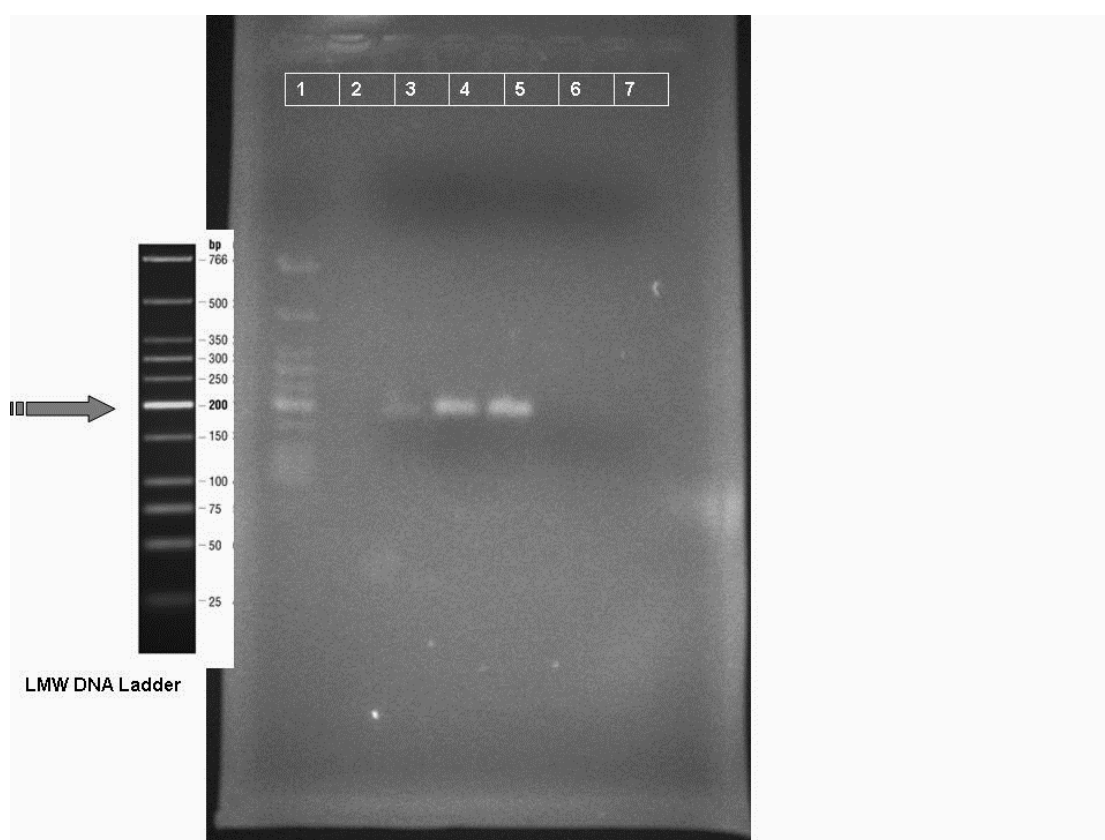
**Εικόνα 32.** Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών Fps/Fsp και Fps/Fpo

**Θέση 1:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** κενό, **Θέση 3:** PC1 9, **Θέση 4:** PC1 15:, **Θέση 5:** PC2 30, **Θέση 6:** PC4 22, **Θέση 7:** PC4 26, **Θέση 8:** PC3 2, **Θέση 9:** PC3 3, **Θέση 10:** PC5 4, **Θέση 11:** PC5 26, **Θέση 12:** PC5 33, **Θέση 13:** PC7 5, **Θέση 14:** PC7 20, **Θέση 15:** PC6 21, **Θέση 16:** PC6 28, **Θέση 17:** K1 19, **Θέση 18:** K2 2, **Θέση 19:** Αρ.μάρ.- *B. cinerea* **Θέση 20:** Αρν. μάρ. - υπερκάθαρο νερό

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της PCR καμία από τις 16 απομονώσεις που επιλέχθηκαν δεν εντάσσονται σε κάποιο από τα είδη *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*.

### 3.3.2 Μοριακή ανίχνευση του γονιδίου *fum1* που εμπλέκεται στην παραγωγή φουμονισίνης

Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την πρώτη σειρά αντιδράσεων όπου χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών Fum1 και Fum 2 για την ανίχνευση του γονιδίου που επάγει την παραγωγή φουμονισίνης φαίνεται στην εικόνα 33. Στο DNA των τριών απομονώσεων του γένους *Fusarium* όπως φαίνεται και από το πήγμα αγαρόζης ανιχνεύθηκε το γονίδιο *fum1*. Οι αναμενόμενες ζώνες εμφανίζονται στα 183 bp ενώ δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες.



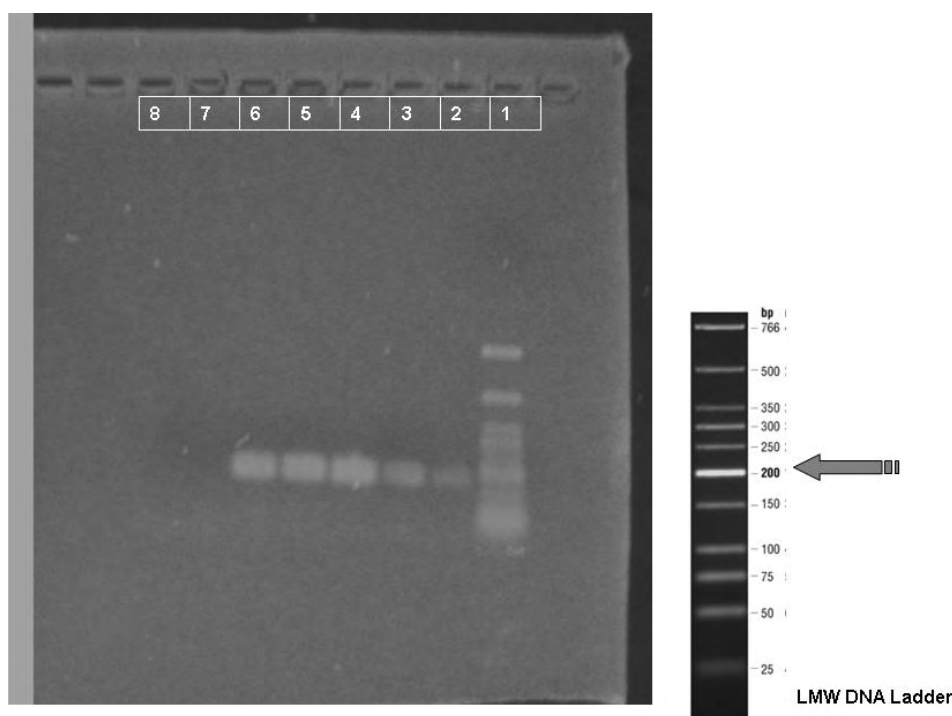
**Εικόνα 33.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης

**Θέση 1.:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** Κενό, **Θέση 3:** PC1 9, **Θέση 4.:** PC2 28, **Θέση 5:** PC2 30, **Θέση 6:** Αρ.μάρ. - *B. cinerea*, **Θέση 7:** Αρν. μάρ. - υπερκάθαρο νερό

Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των προϊόντων της PCR για τη δεύτερη σειρά αντιδράσεων όπου χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών Fum1 και Fum 2 για την ανίχνευση του γονιδίου που εμπλέκεται στην παραγωγή φουμονισίνης φαίνεται στην εικόνα 34. Στο DNA των τριών απομονώσεων του γένους *Fusarium* όπως φαίνεται και από το πήγμα αγαρόζης ανιχνεύθηκε το



γονίδιο *fum1*. Οι αναμενόμενες ζώνες εμφανίζονται στα 183 bp στις τρεις απομονώσεις και στους δύο θετικούς μάρτυρες (PC19 και PC2 28) που προέκυψαν από την πρώτη PCR ενώ δεν εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες.



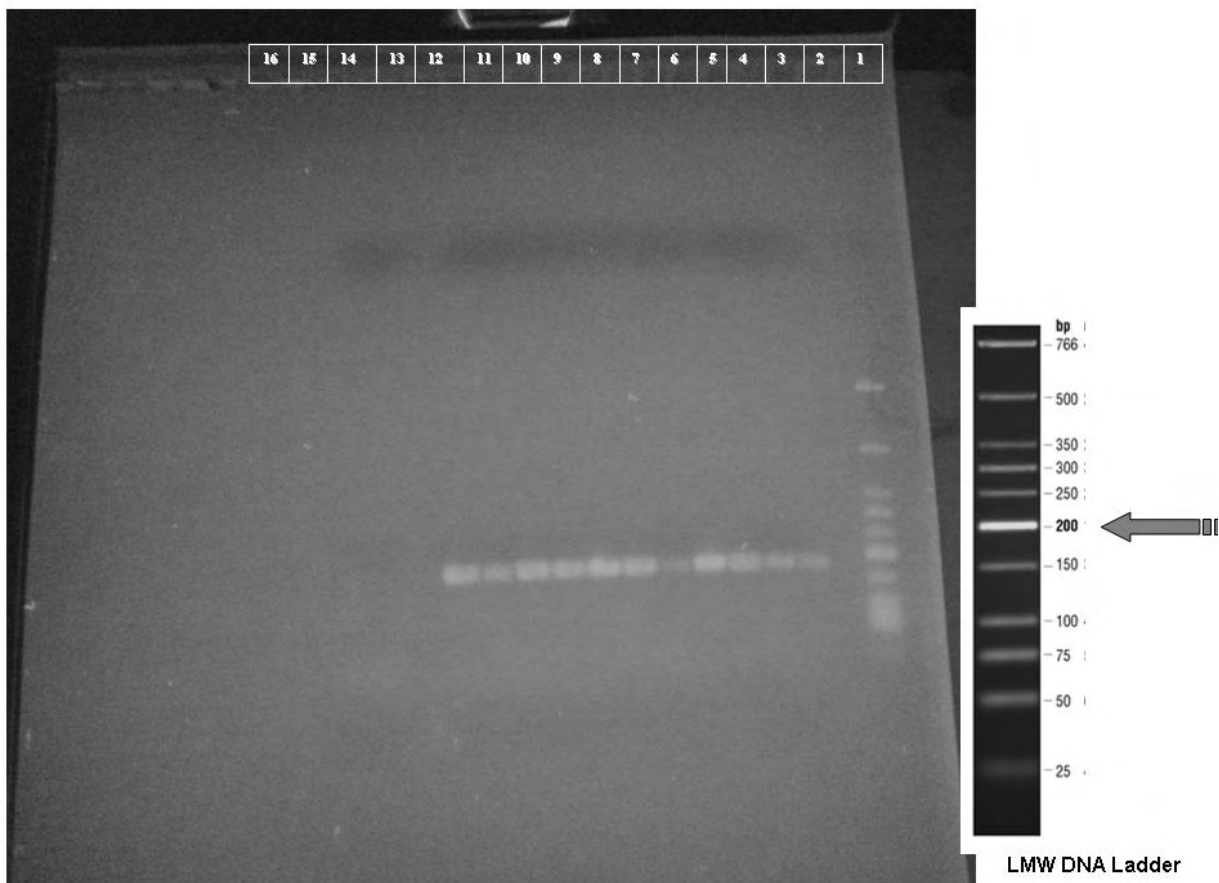
**Εικόνα 34.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης

**Θέση 1:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** PC1 9, **Θέση 3:** PC2 28, **Θέση 4:** PC1 4, **Θέση 5:** PC1 12, **Θέση 6:** PC1 15, **Θέση 7:** Αρ.μάρ. - *B. cinerea*, **Θέση 8:** Αρν. - μάρ. - υπερκάθαρο νερό

Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την τρίτη, τέταρτη και πέμπτη σειρά αντιδράσεων όπου χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών Fum1 και Fum 2 για την ανίχνευση του γονιδίου που εμπλέκεται στην παραγωγή φουμονισίνης φαίνεται στις εικόνες 35-37. Στην τρίτη σειρά αντιδράσεων ελέγχθηκαν 10 απομονώσεις του γένους *Fusarium* στη τέταρτη 14 και στην πέμπτη 14.

Στο DNA των 37 απομονώσεων του γένους όπως φαίνεται και από το πήκτωμα αγαρόζης ανιχνεύθηκε το γονίδιο *fum*. Ενώ σε 1 απομόνωση όπως φαίνεται στο πήκτωμα αγαρόζης δεν ανιχνεύθηκε (Εικ. 36, Θέση 12). Οι αναμενόμενες ζώνες εμφανίζονται στα 183 bp στις 37 απομονώσεις και στους θετικούς μάρτυρες ενώ δεν

εμφανίζονται ζώνες στους αρνητικούς μάρτυρες και στην απομόνωση με κωδικό PC5  
33.



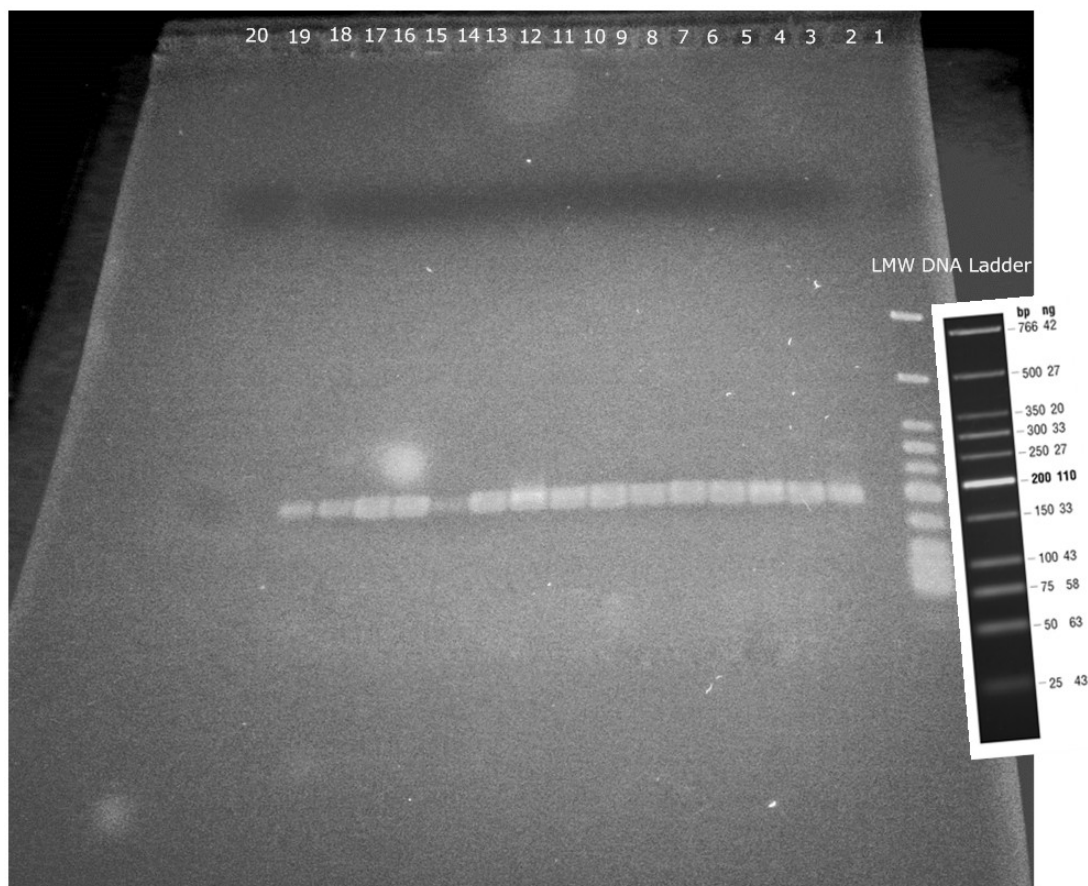
**Εικόνα 35.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πηγμα αγαρόζης

**Θέση 1.:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** κενό, **Θέση 3.** Θετ.μαρ. - PC2 28, **Θέση 4:**PC4 5, **Θέση 5:** PC4 22, **Θέση 6:** PC4 24, **Θέση 7:** PC4 26, **Θέση 8:** PC4 2, **Θέση 9:** PC4 29, **Θέση 10:** PC3 2, **Θέση 11:** PC3 3, **Θέση 12:** PC3 10, **Θέση 13:** PC3 21, **Θέση 14:** κενό, **Θέση 15:**Αρ.μάρ. – *B. cinerea*, **Θέση 16:** Αρν. μάρ. - υπερκάθαρο νερό



**Εικόνα 36.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών Fum1 /Fum 2 σε πήγμα αγαρόζης

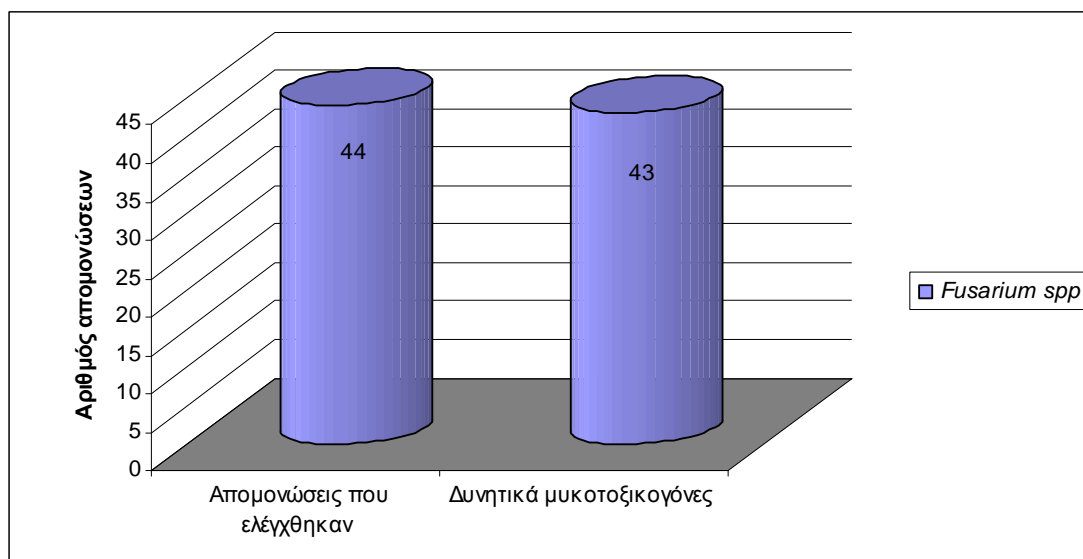
**Θέση 1:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** κενό, **Θέση 3:** Θετ.μάρ. - PC2 28, **Θέση 4:** PC5 4, **Θέση 5:** PC5 5, **Θέση 6:** PC5 9, **Θέση 7:** PC5 21, **Θέση 8:** PC5 26, **Θέση 9:** PC5 28, **Θέση 10:** PC5 29, **Θέση 11:** PC5 31, **Θέση 12:** PC5 33, **Θέση 13:** PC7 5, **Θέση 14:** PC7 13, **Θέση 15:** PC7 17, **Θέση 16:** PC7 20, **Θέση 17:** PC6 12, **Θέση 18:** κενό, **Θέση 19:** Αρ.μάρ. - *B. cinerea*, **Θέση 20:** Αρν. μάρ. - υπερκάθαρο νερό



**Εικόνα 37.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με τη χρήση των εκκινητών *Fum1* /*Fum 2* σε πηγάμα αγαρόζης

**Θέση 1.:** LMW DNA Ladder, **Θέση 2:** κενό, **Θέση 3.** Θετ. μαρ. - PC2 28, **Θέση 4.:** PC6 21, **Θέση 5:** PC6 28, **Θέση 6:** K1 10, **Θέση 7:** K1 19, **Θέση 8:** K1 26, **Θέση 9:** K2 1, **Θέση 10:** K2 2, **Θέση 11:** K2 4, **Θέση 12:** PC3 18, **Θέση 13:** PC1 28, **Θέση 14:** PC1 37, **Θέση 15:** PC2 9, **Θέση 16:** PC2 12, **Θέση 17:** PC2 22, **Θέση 18:** κενό, **Θέση 19:** Αρ.μάρ. - *B. cinerea*, **Θέση 20:** Αρν. μάρ. - υπερκάθαρο νερό

Με βάση τα αποτελέσματα της PCR το γονίδιο *fum1* ανιχνεύθηκε στα σαράντα τρία από τα σαράντα τέσσερα στελέχη του γένους *Fusarium* που απομονώθηκαν από κόκκους pop corn και αραβοσιτάλευρο αποτέλεσμα το οποίο απεικονίζεται στο διάγραμμα 13.



**Διάγραμμα 13.** Αποτελέσματα ελέγχου απομονώσεων του γένους *Fusarium* μέσω PCR για ανίχνευση του γονιδίου *fum1*.

### 3.4 Ανίχνευση της παραγωγής μυκοτοξινών: αφλατοξίνης, οχρατοξίνης και κιτρινίνης με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Coconut Cream Agar (CCA)

Από το σύνολο των απομονώσεων μυκήτων από τα δείγματα pop corn και αραβοσιτάλευρου 39 απομονώσεις του *Aspergillus* section *Flavi*, 19 απομονώσεις του *Aspergillus* section *Circumdati*, 6 απομονώσεις του *Aspergillus* section *Nigri* που προέρχονταν από τα δείγματα pop corn και 15 απομονώσεις του γένους *Penicillium* που προέρχονταν από τα δείγματα αραβοσιτάλευρου αναπτύχθηκαν σε Coconut Cream Agar για να ελεγχθεί η παραγωγή τοξινών από αυτές.

Στους πίνακες 25-30 παρουσιάζονται οι απομονώσεις με τις οποίες εμβολιάστηκαν τριβλία που είχαν επιστρωθεί με θρεπτικό μέσο CCA για τη ανίχνευση της παραγωγή μυκοτοξινών και τα αποτελέσματα της ανίχνευσης.

**Πίνακας 25.** Έλεγχος απομονώσεων των *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* για παραγωγή μυκοτοξινών από το πρώτο δείγμα κόκκων pop corn PC1

Section	Κωδ. Απομ.	Αποτελέσματα παρατήρησης		Ανίχνευση Παραγωγής:
		1 <sup>ης</sup> Επανάληψης	2 <sup>ης</sup> Επανάληψης	
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	PC1 2	- <sup>1</sup>	-	Αφλατοξίνης
	PC1 14	-	-	
	PC1 20	-	-	
	PC1 23	-	-	
	PC1 25	-	-	
	PC1 31	-	-	
	PC1 34	-	-	
	PC1 39	-	-	
	PC1 40	-	-	
	PC1 51	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	PC1 27	-	-	Ωχρατοξίνης
<b>Σύνολο</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	PC1 6	-	-	Ωχρατοξίνης
	PC1 11	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

1 To – συμβολίζει την απουσία φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

To + συμβολίζει την ύπαρξη φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

**Πίνακας 26.** Έλεγχος απομονώσεων των *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* για παραγωγή μυκοτοξινών από το δεύτερο δείγμα κόκκων pop corn PC2

Section	Κωδ. Απομ.	Αποτελέσματα παρατήρησης	Αποτελέσματα παρατήρησης	Ανίχνευση Παραγωγής:
		1 <sup>ης</sup> Επανάληψης	2 <sup>ης</sup> Επανάληψης	
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	PC2 2	- <sup>1</sup>	-	Αφλατοξίνης
	PC2 14	-	-	
	PC2 15	-	-	
	PC2 17	-	-	
	PC2 19	-	-	
	PC2 20	-	-	
	PC2 27	-	-	
	PC2 31	-	-	
	PC2 32	-	-	
	PC2 34	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	PC2 7	-	-	Ωχρατοξίνης
	PC2 10	+ <sup>1</sup>	+	
	PC2 11	-	-	
	PC2 23	+	+	
	PC2 26	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	PC2 21	-	-	Ωχρατοξίνης
	PC2 33	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

<sup>1</sup> To - συμβολίζει την απουσία φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

To + συμβολίζει την ύπαρξη φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

**Πίνακας 27.** Έλεγχος απομονώσεων των *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* για παραγωγή μυκοτοξινών από το τρίτο δείγμα κόκκων pop corn PC3

Section	Κωδ. Απομ.	Αποτελέσματα παρατήρησης		Ανίχνευση Παραγωγής:
		1 <sup>ης</sup> Επανάληψης	2 <sup>ης</sup> Επανάληψης	
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	PC3 4	- <sup>1</sup>	-	Αφλατοξίνης
	PC3 5	-	-	
	PC3 6	-	-	
	PC3 7	-	-	
	PC3 11	-	-	
	PC3 16	-	-	
	PC3 17	-	-	
	PC3 19	-	-	
	PC3 22	-	-	
	PC3 23	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	PC3 9	-	-	Ωχρατοξίνης
	PC3 15	-	-	
	PC3 20	+ <sup>1</sup>	+	
<b>Σύνολο</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	PC3 7	-	-	Ωχρατοξίνης
	PC3 14	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

1 To - συμβολίζει την απουσία φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

To + συμβολίζει την ύπαρξη φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)



**Πίνακας 28.** Έλεγχος απομονώσεων των *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* για παραγωγή μυκοτοξινών από το τέταρτο δείγμα κόκκων pop corn PC4

Section	Κωδ. Απομ.	Αποτελέσματα παρατήρησης		Ανίχνευση Παραγωγής:
		1 <sup>ης</sup> Επανάληψης	2 <sup>ης</sup> Επανάληψης	
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	PC4 2	- <sup>1</sup>	-	Αφλατοξίνης
	PC4 7	-	-	
	PC4 8	-	-	
	PC4 11	-	-	
	PC4 21	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	PC4 3	-	-	Ωχρατοξίνης
	PC4 4	-	-	
	PC4 9	-	-	
	PC4 23	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

1 To – συμβολίζει την απουσία φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

To + συμβολίζει την ύπαρξη φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

**Πίνακας 29.** Έλεγχος απομονώσεων των *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri* για παραγωγή μυκοτοξινών από το πέμπτο δείγμα κόκκων pop corn PC5

Section	Κωδ. Απομ.	Αποτελέσματα παρατήρησης		Ανίχνευση Παραγωγής:
		1 <sup>ης</sup> Επανάληψης	2 <sup>ης</sup> Επανάληψης	
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	PC5 24	- <sup>1</sup>	-	Αφλατοξίνης
	PC5 27	-	-	
	PC5 30	-	-	
	PC5 34	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	PC5 1			Ωχρατοξίνης
	PC5 7			
	PC5 8			
	PC5 10	+ <sup>1</sup>	+	
	PC5 12			
	PC5 13	+	+	
<b>Σύνολο</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	

1 To – συμβολίζει την απουσία φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

To + συμβολίζει την ύπαρξη φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

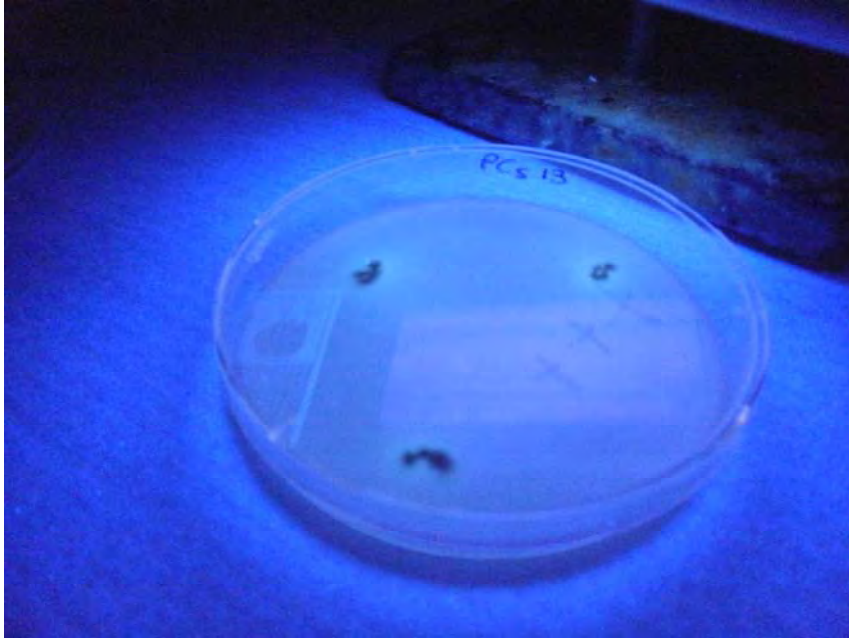
**Πίνακας 30.** Έλεγχος απομονώσεων του γένους *Penicillium* για παραγωγή κιτρινίνης από το πρώτο K1 και δεύτερο K2 δείγμα αραβοσιτάλευρου

Γένος	Κωδ. Απομ.	Αποτελέσματα παρατήρησης		Ανίχνευση Δυνητικής Παραγωγής:
		1 <sup>ης</sup> Επανάληψης	2 <sup>ης</sup> Επανάληψης	
<i>Penicillium</i>	K1 1	-	-	Κιτρινίνης
	K1 2	-	-	
	K1 4	-	-	
	K1 14	-	-	
	K1 16	-	-	
	K1 21	-	-	
<b>Σύνολο</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<i>Penicillium</i>	K2 9	-	-	Κιτρινίνης
	K2 10	-	-	
	K2 11	-	-	
	K2 12	-	-	
	K2 14	-	-	
	K2 16	-	-	
	K2 17	-	-	
	K2 18	-	-	
K2 21	-	-		
<b>Σύνολο</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

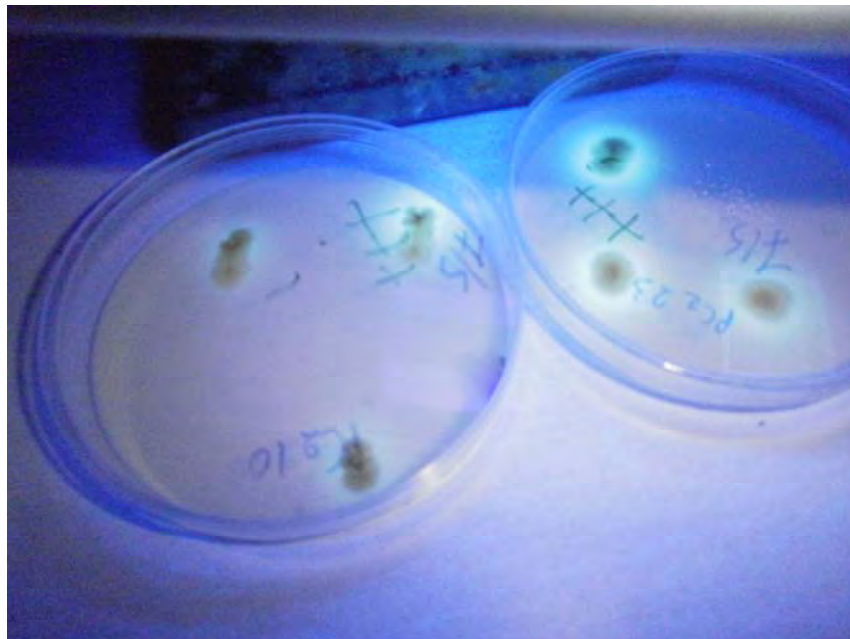
1 Το - συμβολίζει την απουσία φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

Το + συμβολίζει την ύπαρξη φθορισμού μετά από έκθεση και παρατήρηση της καλλιέργειας σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm)

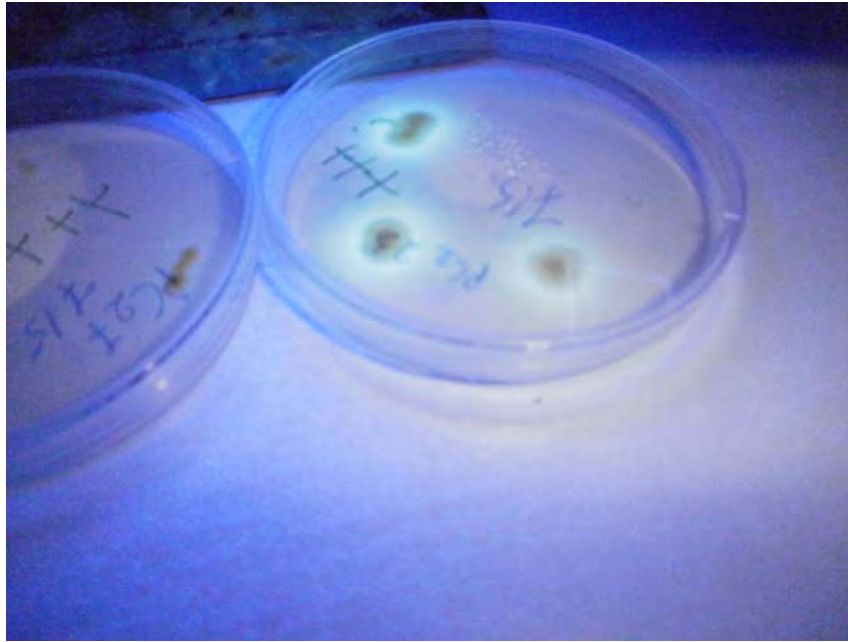
Στις εικόνες 38,39 φαίνεται η έκθεση καλλιεργείων *Aspergillus section Circumdati* που αναπτύχθηκαν σε Coconut Cream Agar σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm). Ο εμφανής φθορισμός υποδηλώνει την παραγωγή ωχρατοξίνης ενώ στην εικόνα 40 φαίνεται η παρουσία (δεξιά) και απουσία φθορισμού (αριστερά) από τις καλλιέργειες δύο διαφορετικών απομονώσεων που υποδηλώνει την παραγωγή και μη παραγωγή ωχρατοξίνης αντίστοιχα .



**Εικόνα 38.** Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιέργειας μύκητα που ανήκει στο *Aspergillus* section *Circumdati* σε CCA

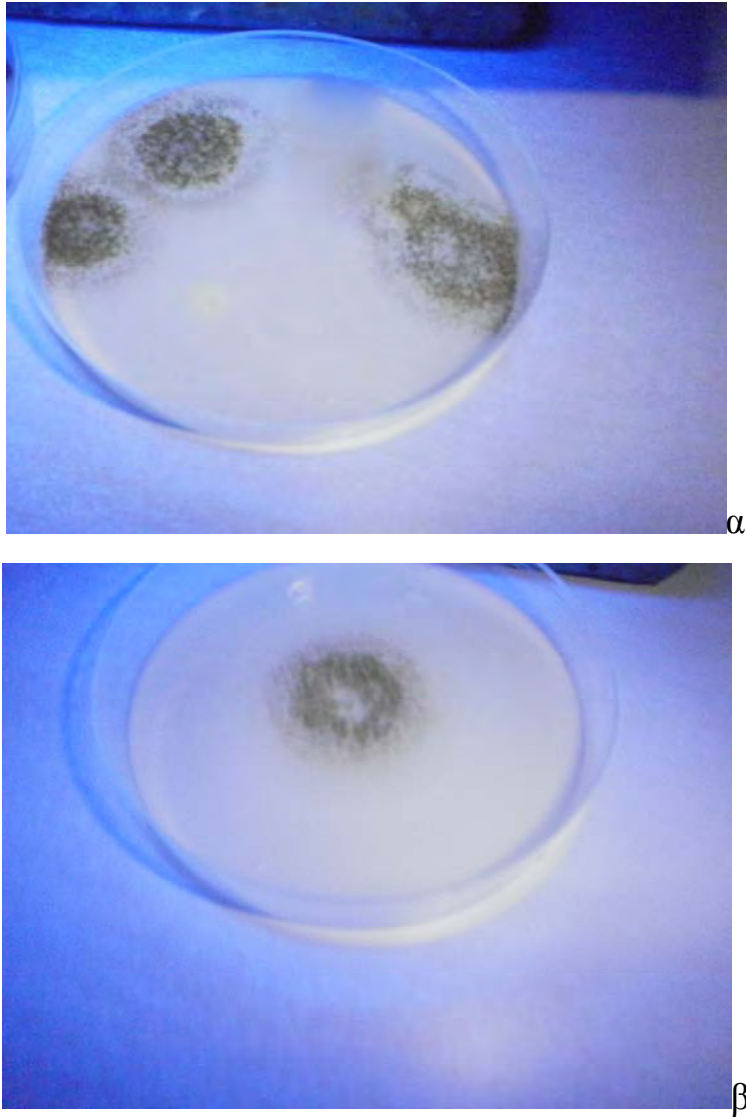


**Εικόνα 39.** Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μυκήτων που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Circumdati* σε CCA



**Εικόνα 40.** Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μυκήτων που ανήκουν στο *Aspergillus section Circumdati* σε CCA

Στην εικόνα 41 φαίνεται η έκθεση καλλιεργειών *Aspergillus section Flavi* που αναπτύχθηκαν σε Coconut Cream Agar σε υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm) για έλεγχο της παραγωγής αφλατοξίνης. Η απουσία φθορισμού υποδηλώνει τη μη παραγωγή αφλατοξίνης.



**Εικόνα 41.** Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μύκητων που ανήκουν στο *Aspergillus* section *Flavi* σε CCA. Απουσία φθορισμού

Στην εικόνα 42 φαίνεται η ανάπτυξη καλλιεργειών του γένους *Penicillium* σε Coconut Cream Agar με σκοπό τον έλεγχο παραγωγής κιτρινίνης ενώ στην εικόνα 43 φαίνεται η έκθεση των ανωτέρω καλλιεργειών σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η απουσία φθορισμού υποδηλώνει τη μη παραγωγή κιτρινίνης.

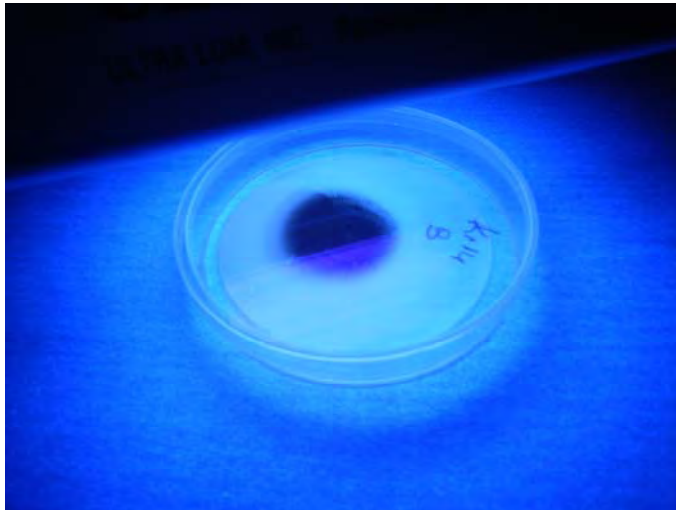


α

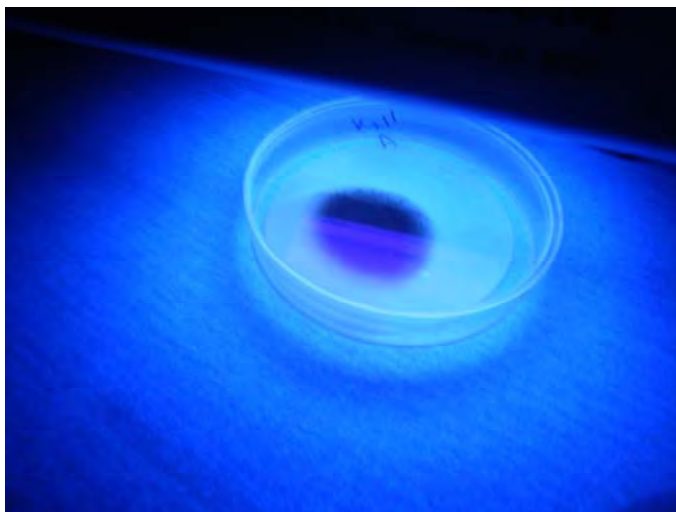


β

**Εικόνα 42.** Ανάπτυξη καλλιεργειών απομονώσεων του γένους *Penicillium* σε CCA.



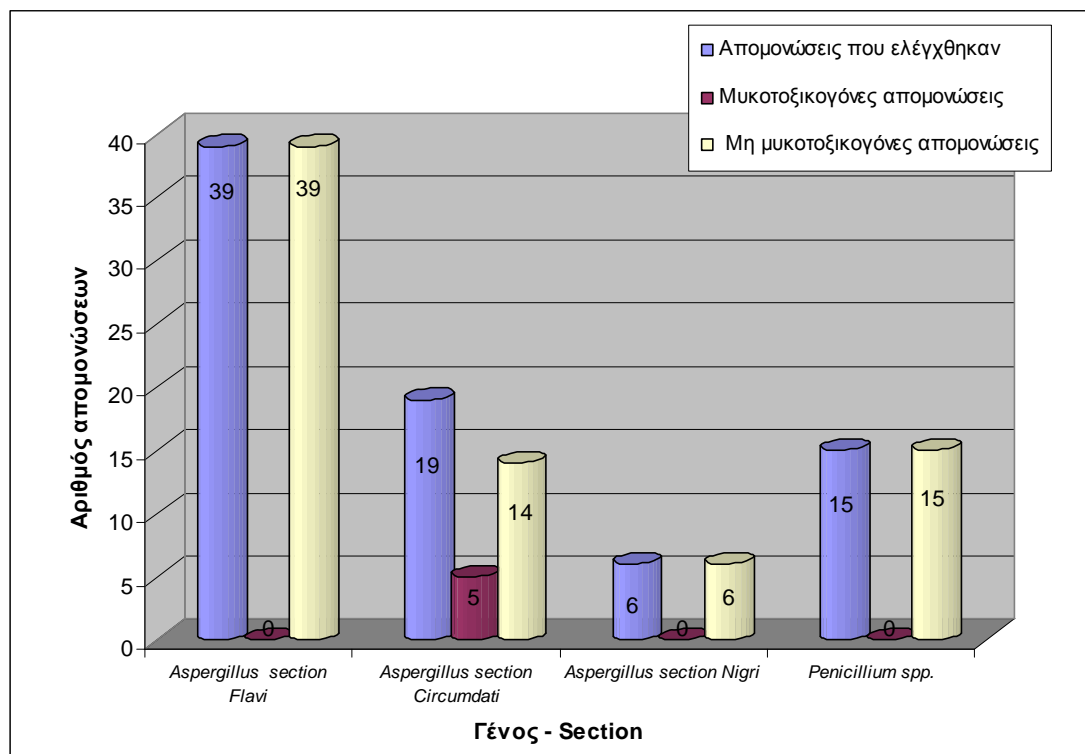
α



β

**Εικόνα 43.** Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καλλιεργειών μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Penicillium* σε CCA

Στο διάγραμμα 14 φαίνεται ο αριθμός των απομονώσεων που ελέγχθηκαν για παραγωγή τοξινών σε Coconut Cream Agar καθώς και οι μυκοτοξιογόνες ή μη μυκοτοξιογόνες απομονώσεις



**Διάγραμμα 14.** Αποτελέσματα ελέγχου απομονώσεων του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* που αναπτύχθηκαν σε CCA για παραγωγή μυκοτοξινών.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 14 και τους πίνακες 25 έως 30 καμία από τις 39 συνολικά απομονώσεις του γένους *Aspergillus section Flavi* που ελέγχθηκαν δεν βρέθηκε να παράγει αφλατοξίνη. Οι 6 απομονώσεις του *Aspergillus section Nigri* δεν βρέθηκε ότι μπορούν να παράγουν ωχρατοξίνη. Επίσης καμία από τις 15 απομονώσεις του γένους *Penicillium* δεν βρέθηκε ότι μπορεί να παράγει κιτρινίνη. Από τις 19 απομονώσεις του *Aspergillus section Circumdati* που ελέγχθηκαν οι 5, ποσοστό 26,3% βρέθηκε ότι μπορούν να παράγουν ωχρατοξίνη. Οι απομονώσεις αυτές προήλθαν δύο από το δεύτερο δείγμα μία από το τρίτο δείγμα και δύο από το πέμπτο δείγμα.





#### 4.1 Μικροβιακό φορτίο ποπ κορν

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας σε όλα τα δείγματα ποπ κορν ανιχνεύθηκαν βιώσιμα σπόρια μυκήτων τα οποία συμπεριλαμβάνονται στα είδη των μυκοτοξικογόνων μυκήτων. Το ποσοστό των μολυσμένων κόκκων ανά δείγμα κυμάνθηκε από 11% μέχρι 27%.

Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές πηγές που αναφέρονται στο εισαγωγικό μέρος προκύπτει ότι τα βιώσιμα σπόρια των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν πιθανότατα συμπεριλαμβάνονται σε γένη και section των οποίων η ανάπτυξη επί των κόκκων ξεκίνησε προ της συγκομιδής, όπως *Aspergillus section Flavi* και *Fusarium*, ή κατά το στάδιο της αποθήκευσης, όπως *Aspergillus section Circumdadi*, *Aspergillus section Nigri*. Σε κάποια από τα δείγματα το γένος *Fusarium* ανιχνεύθηκε σε υψηλότερο ποσοστό, ενώ σε άλλα δείγματα πιο συχνά εμφανιζόμενο γένος ήταν το γένος *Aspergillus*.

Το μικροβιακό φορτίο κόκκων pop corn έχει μελετηθεί και σε μια σειρά από άλλες έρευνες, τα αποτελέσματα των οποίων συζητούνται παρακάτω.

Στις Η.Π.Α μελετήθηκε το μικροβιακό φορτίο διαφορετικών τύπων κόκκων ποπ κορν. Από τους μύκητες που ανιχνεύθηκαν το γένος *Fusarium* ανιχνεύθηκε πιο συχνά στα δείγματα κίτρινου ποπ κορν για φούρνο μικροκυμάτων και λευκού ποπ κορν για κλασική παρασκευή, ενώ το γένος *Aspergillus* ήταν το γένος που ανιχνεύθηκε σε υψηλή συχνότητα στα δείγματα κίτρινου ποπ κορν που δεν ήταν κατάλληλο για φούρνο μικροκυμάτων. Στην ίδια έρευνα εντός του γένους *Fusarium* το είδος *F. verticillioides* ανιχνεύθηκε σε υψηλή συχνότητα, ενώ εντοπίστηκαν και τα είδη *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, και *F. graminearum* σε μικρότερη συχνότητα. Από την άλλη πλευρά η παρουσία των ειδών *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* ήταν αμελητέα στα δείγματα που αξιολογήθηκαν (Katta *et al.*, 1995).

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αργεντίνη, η οποία συνιστά την πρώτη χώρα εξαγωγής ποπ κορν σε όλο τον κόσμο καθώς εξάγει ποπ κορν σε περισσότερες από 40 χώρες, είχε ως στόχο τον εντοπισμό και την απομόνωση ειδών μυκήτων που τυχόν είχαν επιμολύνει πρόσφατα συγκομιζόμενο ποπ κορν. Η έρευνα διεξήχθη στην επαρχία του Μπουένος Άιρες, το 1999. Σε όλα τα δείγματα ποπ κορν εντοπίστηκε επιμόλυνση από μύκητες. Τα είδη που ανιχνεύθηκαν ήταν με φθίνουσα σειρά

ποσοστών ανίχνευσης *Fusarium verticillioides*, *Penicillium funiculosum*, *F. graminearum* και *Alternaria alternata*. Τα είδη *Aspergillus niger* και *Aspergillus ochraceus* ανιχνεύθηκαν σε μικρό ποσοστό (Pacin *et al.*, 2002).

Στην Ισπανία σε ανάλογη έρευνα με στόχο την απομόνωση μυκήτων από ποπ κορν τα γένη που απομονώθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα ήταν τα γένη *Fusarium* και *Aspergillus* ενώ το γένος *Penicillium* εντοπίστηκε σε μικρότερα ποσοστά, στην περίπτωση που οι κόκκοι ποπ κορν είχαν υποστεί εξωτερική απολύμανση. Από τα είδη του γένους *Fusarium* που ταυτοποιήθηκαν κυρίαρχο ήταν το είδος *Fusarium verticillioides* σε ποσοστό 73%, ενώ μικρότερο ποσοστό εμφάνισης είχε το είδος *F. proliferatum* και το είδος *F. subglutinans*. Μεταξύ των ειδών του γένους *Aspergillus* που ταυτοποιήθηκαν τα είδη *Aspergillus flavus* και *Aspergillus niger* ήταν τα πιο συχνά εμφανιζόμενα είδη (Alborch *et al.*, 2012).

Το ποπ κορν γενικά θεωρείται ένα ασφαλές προϊόν από θέμα μικροβιακού φορτίου λόγω της χαμηλής ενεργότητας ύδατος ωστόσο η μελέτη έδειξε ότι εγκυμονούν κίνδυνοι καθώς υπάρχουν σ' αυτό βιώσιμα σπόρια. Η θερμική επεξεργασία που υφίστανται οι κόκκοι ποπ κορν πριν την κατανάλωσή τους καταστρέφει τα βιώσιμα σπόρια των μυκήτων. Εάν όμως οι κόκκοι είναι μολυσμένοι με μυκοτοξίνες τότε αυτές δεν καταστρέφονται κατά το στάδιο της θερμικής επεξεργασίας αφού οι περισσότερες από αυτές, με βάση τα ερευνητικά δεδομένα που αναφέρονται στην εισαγωγή της παρούσας, είναι μόρια που δε διασπώνται σε υψηλές θερμοκρασίες.

## 4.2 Μικροβιακό φορτίο αραβοσιτάλευρου

Στα δύο δείγματα αραβοσιτάλευρου ανιχνεύθηκαν βιώσιμα σπόρια μυκήτων. Σπόρια μυκήτων ικανά να βλαστήσουν βρέθηκαν και στην περιεκτικότητα  $10^{-1}$  g/ml και στην περιεκτικότητα  $10^{-2}$  g/ml.

Το αραβοσιτάλευρο είχε υψηλό μικροβιακό φορτίο από το γένος *Fusarium*. Στην περιεκτικότητα  $10^{-1}$  g/ml λόγω της βλάστησης μεγάλου αριθμού σπορίων μυκήτων που ανήκουν στο παραπάνω είδος ήταν αδύνατον να απομονωθούν και να καταμετρηθούν. Επίσης είχε σχετικά υψηλό μικροβιακό φορτίο από μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* οι οποίοι απομονώθηκαν μόνο από την περιεκτικότητα  $10^{-1}$  g/ml ενώ στην περιεκτικότητα  $10^{-2}$  g/ml δε βρέθηκαν βιώσιμα σπόρια μυκήτων των δύο παραπάνω γενών.

Με βάση τα αναφερόμενα στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, τα βιώσιμα σπόρια μυκήτων του γένους *Fusarium* και ίσως κάποια από τα σπόρια μυκήτων του γένους *Aspergillus* πιθανότατα μόλυναν τους κόκκους που προορίζονταν για άλεση προ της συγκομιδής και επιβίωσαν των σταδίων της επεξεργασίας και άλεσης. Τα βιώσιμα σπόρια των μυκήτων του γένους *Penicillium* και κάποια σπόρια του γένους *Aspergillus* πιθανότατα επιμόλυναν το αλεύρι κατά το στάδιο της επεξεργασίας και άλεσης ή κατά το στάδιο της αποθήκευσης.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ολλανδία για πέντε δείγματα αραβοσιτάλευρου, οι μύκητες που απομονώθηκαν εντάχθηκαν στα γένη *Fusarium*, *Aspergillus* και *Penicillium*. Η συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των γενών διέφερε από δείγμα σε δείγμα. Το είδος *Aspergillus flavus* απομονώθηκε από τρία δείγματα αραβοσιτάλευρου, ενώ όλες οι απομονώσεις του γένους *Fusarium* κατατάχθηκαν στο είδος *F. proliferatum* (Kamphuis *et al.*, 1992).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα αραβοσιτάλευρου στη Νότια Αφρική ανιχνεύθηκαν μύκητες του γένους *Fusarium*, που ήταν το κυρίαρχο γένος, ακολουθούμενο από το γένος *Aspergillus*. Εντός του γένους *Fusarium* κυρίαρχο είδος ήταν το *Fusarium verticillioides*, ενώ εντός του γένους *Aspergillus* οι απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν εντάσσονταν στα είδη *Aspergillus flavus/parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* (Simpanya *et al.*, 2001).

Σε παρόμοια έρευνα στην Ισπανία σε δείγματα αραβοσιτάλευρου απομονώθηκαν μύκητες που εντάχθηκαν σε είδη των γενών *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*. Εντός του γένους *Aspergillus* τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είχαν τα είδη *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* και *Aspergillus fumigatus*, ακολουθούμενα από τα είδη *Eurotium chevaalieri*, *Eurotium amstelodami* και *Aspergillus niger*. Ενώ εντός του γένους *Fusarium* τα είδη που ταυτοποιήθηκαν ήταν *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. subglutinans* (Alborch *et al.*, 2012).

Στην Αργεντινή εξετάστηκαν δείγματα καλαμποκιού και κλάσματα άλεσης από βιομηχανικό μύλο για μόλυνση από μύκητες. Τα είδη *Fusarium verticillioides* και *Aspergillus flavus* ήταν τα είδη που κυρίως ανιχνεύθηκαν από τους πυρήνες του αραβοσίτου που προορίζονταν για άλεση αλλά μύκητες του είδους *F. verticillioides* εντοπίστηκαν και σε όλα τα άλλα κλάσματα άλεσης. Επίσης απομονώθηκαν μύκητες που εντάχθηκαν στα είδη *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum* και *P. funiculosum* (Broggi *et al.*, 2002).

Η θερμική επεξεργασία που υφίσταται το αλεύρι κατά την προετοιμασία διαφόρων τροφίμων καταστρέφει τα βιώσιμα σπόρια των μυκήτων.

Εάν όμως οι κόκκοι άλεσης είναι μολυσμένοι με μυκοτοξίνες τότε αυτές, με βάση τα αναφερόμενα στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, δεν καταστρέφονται κατά τα στάδια της άλεσης και θερμικής επεξεργασίας. Επιπρόσθετα η παρουσία βιώσιμων σπορίων στο αλεύρι ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης των μυκήτων εφόσον η σχετική υγρασία ανεβεί πάνω από το επίπεδο 12% (Hesseltine and Graves, 1966) με κίνδυνο την ανάπτυξη μυκήτων να ακολουθήσει η παραγωγή μυκοτοξινών.

Τα αποτελέσματα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στην οποία χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για να ενταχθούν κάποιες επιλεγμένες απομονώσεις εντός του γένους *Fusarium* σε επίπεδο είδους έδειξαν ότι καμία από τις επιλεγμένες απομονώσεις δεν ανήκει σε κάποιο από τα είδη *F. graminearum*, *F. culmrorum*, *F. poae* και *F. sporotrichoides*. Στις έρευνες που προαναφέρθηκαν το είδος εντός του γένους *Fusarium* που ανιχνεύθηκε σε υψηλότερο ποσοστό ήταν το είδος *F. verticillioides* ακολουθούμενο από το είδος *F. proliferatum*. Συνεπώς τα αποτελέσματα της PCR θεωρούνται αποδεκτά και αναμενόμενά λόγω της περιορισμένης συχνότητας εμφάνισης των ειδών για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές σε προϊόντα καλαμποκιού, όπως είναι το ποπ κορν και το αραβοσιτάλευρο.

### **4.3 Έλεγχος δυνητικής παραγωγής φουμονισίνης**

Στις σαράντα τρεις από τις σαράντα τέσσερις απομονώσεις του γένους *Fusarium* που ελέγχθηκαν με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών μέσω PCR ανιχνεύθηκε το γονίδιο *fum1* που εμπλέκεται στην παραγωγή φουμονισίνης.

Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό της δυνητικής μυκοτοξικογόνου ικανότητας μυκήτων των ειδών *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. anthophilum*, *F. pallidoroseum*, *F. oxysporum* και *F. sporotrichioides* που απομονώθηκαν από σόργο. Σε ποσοστό 100% τα στελέχη των ειδών *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και *F. anthophilum* έδωσαν θετικά αποτελέσματα στη παρουσία του γονιδίου *fum1*. Αντίθετα το γονίδιο δεν ανιχνεύθηκε στα υπόλοιπα προαναφερόμενα είδη (Sreenivasa *et al.*, 2008).

Το ίδιο ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παρουσίας του γονιδίου *fum1* σε 21 απομονώσεις του γένους *Fusarium* που εντάσσονταν στα είδη *F.verticillioides* (15), *F. proliferatum* (3) και *F. anthophilum* (3). Το γονίδιο *fum1* ανιχνεύθηκε στο γονιδίωμα όλων των απομονώσεων που ελέγχθηκαν. (El. Yazeed *et al.*, 2011).

Απομόνωση μυκήτων του γένους *Fusarium* από ωτία καλαμποκιού και ανίχνευση της ύπαρξης του γονιδίου *fum1* σ' αυτές τις απομονώσεις με το ίδιο ζεύγος εκκινητών πραγματοποιήθηκε στην Πολωνία. Από το σύνολο των 71 απομονώσεων που ελέγχθηκαν μεταξύ των οποίων 53 εντάσσονταν στο είδος *F. roae*, 10 στο είδος *F. graminearum*, 5 στο είδος *F. oxysporum*, 1 στο είδος *F. verticillioides* και 2 στο είδος *F. proliferatum* μόνο σε τρεις απομονώσεις εντοπίστηκε το γονίδιο *fum1* στο γονιδίωμά τους. Αυτές οι απομονώσεις εντάσσονταν στα είδη: *F. roae*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* (Lenart *et al.*, 2013).

Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων ερευνών υπογραμμίζουν την εξειδίκευση των συγκεκριμένων εκκινητών ως προς τη συγκεκριμένη αλληλουχία στόχου.

Η ανίχνευση του γονιδίου από μόνη της δεν αρκεί για να προσδιορίσει τη μόλυνση των τροφίμων που εξετάστηκαν με φουμονισίνη. Το γονίδιο μπορεί να υπάρχει αλλά να μην εκφράζεται. Αλλά και στην περίπτωση που αυτό εκφράζεται μπορεί οι συνθήκες να μην επιτρέψουν την παραγωγή φουμονισίνης. Εάν βέβαια η παρουσία του γονιδίου σημαίνει ταυτόχρονα και παραγωγή φουμονισίνης τότε λόγω του αυξημένου ποσοστού των απομονώσεων από το παραπάνω γένος τόσο από το δείγματα ποπ κορν όσο και από το αλεύρι σημαίνει ότι υπάρχει σοβαρός κίνδυνος αυτά να είναι μολυσμένα με φουμονισίνη

Στελέχη του γένους *Fusarium* που απομονώθηκαν από πυρήνες αραβοσίτου από περιοχές του Μεξικού ελέγχθηκαν σχετικά με την παρουσία του γονιδίου *fum1*. Ταυτόχρονα έγινε έλεγχος για ανίχνευση της παραγόμενης φουμονισίνης B1 από αυτές τις απομονώσεις σε καθαρές καλλιέργειες με την τεχνική TLC. Τα περισσότερα από τα στελέχη που περιείχαν το συγκεκριμένο γονίδιο παράγαγαν φουμονισίνη σε καθαρές καλλιέργειες η οποία ανιχνεύθηκε με τη χρωματογραφική τεχνική. Μόνο για επτά απομονώσεις οι οποίες περιείχαν το γονίδιο στο γονιδίωμά τους δεν ανιχνεύθηκε η φουμονισίνη στις καθαρές καλλιέργειες τους. Το είδος *F. verticillioides* ήταν το κυρίαρχο είδος που απομονώθηκε από τις προαναφερθείσες περιοχές (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

Στελέχη του μύκητα *F. verticillioides* που απομονώθηκαν από καλαμπόκι σε περιοχές της Ιταλίας ελεγχθήκαν μεταξύ άλλων για τη δυνητική παραγωγή φουμονισίνης με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών με στόχο την ανίχνευση του *fum1* γονιδίου. Η παραγωγή φουμονισίνης σε καθαρές καλλιέργειες μυκήτων φουμονισίνης ελέγχθηκε με την τεχνική LC-MS/MS. Στις 25 απομονώσεις που ελέγχθηκαν για την παρουσία του γονιδίου *fum1* ανιχνεύθηκε το γονίδιο και από αυτές οι 20 απομονώσεις παρήγαγαν φουμονισίνη σε καθαρή καλλιέργεια (Covarelli *et al.*, 2012).

Η διαφορετική αυτή φαινοτυπική έκφραση μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις ή σε μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου (Sanchèz-Rangel *et al.*, 2005).

Στις δύο προηγούμενες εργασίες τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικά από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα. Ωστόσο τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών έδειξαν ότι η παρουσία του γονιδίου *fum1* που ανιχνεύθηκε και στην παρούσα μελέτη, σημαίνει σε υψηλό ποσοστό και έκφρασή του.

Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών δείχνουν υψηλή μυκοτοξικογόνο ικανότητα στελεχών του είδους *F. verticillioides*. Η μυκοτοξικογόνος ικανότητα στελεχών του γένους *Fusarium* που απομονώθηκαν από καλαμπόκι προ της συγκομιδής στη Βόρεια Κροατία έχει ελεγχθεί μέσω TLC. Το συχνότερα εμφανιζόμενο είδος ήταν το *F. verticillioides*. Το 100% και το 55% των στελεχών που απομονώθηκαν σε δύο διαφορετικές καλλιεργητικές περιόδους του παραπάνω είδους βρέθηκε ότι παράγει φουμονισίνη B1 (Cvetnić, *et al.*, 2005).

Μια σειρά από ερευνητικές εργασίες αναφέρουν την επιμόλυνση ποπ κορν και αραβοσιτάλευρου με φουμονισίνες ανά τον κόσμο σε χώρες όπως Ιταλία, Γερμανία, Τουρκία, Αγγλία, Ολανδία, ΗΠΑ (Soriano and Dragacci, 2004). Σε έρευνα στην Αργεντινή σε 42 δείγματα ποπ κορν δε βρέθηκε επιμόλυνση με αφλατοξίνες, ζεραλενόνη, δεοξινιβαλενόλη και ωχρατοξίνη αλλά βρέθηκε επιμόλυνση με φουμονισίνη στα 41 από τα 42 δείγματα (Pacin *et al.*, 2002).

Σε πρόσφατη έρευνα στην Βραζιλία, ανιχνεύθηκε φουμονισίνη στα 32 από τα 39 δείγματα ποπ κορν, στα 19 από τα 25 δείγματα αραβοσιτάλευρου. Επίσης ανιχνεύθηκε σε 25 από τα 32 δείγματα από σμιγδάλι αραβοσίτου (Bordin *et al.*, 2014).

Μόλυνση των κόκκων ποπ κορν με φουμονισίνες μπορεί να συμβεί ακόμα και από το χωράφι, ενώ η παρουσία εντόμων εντείνει αυτό το φαινόμενο. Η μόλυνση με

φουμονισίνες επηρεάζεται επιπλέον από τις καιρικές συνθήκες αλλά και από την προηγούμενη καλλιέργεια (Patrick and Johnson, 2009).

#### **4.4 Έλεγχος παραγωγής αφλατοξίνης, ωχρατοξίνης, κιτρινίνης**

##### **4.4.1 Έλεγχος παραγωγής αφλατοξίνης**

Όλες οι απομονώσεις μυκήτων που ανήκουν στο *Aspergillus section Flavi* που ελέγχθηκαν για παραγωγή αφλατοξίνης έδειξαν μέσω του φθορισμού σε θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar ότι δεν παράγουν αφλατοξίνη. Οι απομονώσεις του συγκεκριμένου section είχαν και την υψηλότερη σχετική πυκνότητα στα δείγματα ποπ κορν. Η πιθανή ερμηνεία αυτού του αποτελέσματος είναι, είτε ότι ανήκουν σε μη αφλατοξιγόνα είδη του section είτε ότι ανήκουν σε αφλατοξιγόνα είδη του section αλλά πρόκειται για μη αφλατοξιγόνα στελέχη. Σύμφωνα με τους Klich and Pitt, (1988), το 40% των απομονώσεων του είδους *Aspergillus flavus* παράγουν αφλατοξίνη και σχεδόν όλες οι απομονώσεις του είδους *Aspergillus parasiticus* παράγουν αφλατοξίνη. Στην παρούσα έρευνα καμία απομόνωση δεν βρέθηκε να παράγει αφλατοξίνη οπότε πιθανότατα το ποσοστό των απομονώσεων που ανήκουν στα προαναφερόμενα είδη είναι πολύ μικρό.

Σε παρόμοιες έρευνες που έχουν διεξαχθεί υπάρχει υψηλό ποσοστό συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων ανίχνευσης αφλατοξίνης μέσω του φθορισμού στο θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar και των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από χρωματογραφικές τεχνικές.

Στην έρευνα των Dyer and McCammon, (1994), σε 86 από τα 95 στελέχη του είδους *Aspergillus flavus* που έδειξαν φθορισμό σε Coconut Cream Agar ανιχνεύθηκε η παραγωγή αφλατοξίνης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, ποσοστό 90,5%. Ενώ για τα υπόλοιπα στελέχη που έδειξαν φθορισμό σε Coconut Cream Agar δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή αφλατοξίνης με τη μέθοδο TLC.

Στελέχη του *Aspergillus section Flavi* απομονώθηκαν από σπόρους καλαμποκιού αμέσως μετά τη συγκομιδή και την ξήρανση στην Ιταλία. Τα στελέχη αυτά ελέγχθηκαν για παραγωγή μυκοτοξινών με δύο μεθόδους. Μέσω του φθορισμού σε θρεπτικό υλικό Coconut Extract Agar και μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Το ποσοστό των αφλατοξιγόνων στελεχών όπου παρατηρήθηκε φθορισμός σε Coconut Extract Agar ήταν 73 %. Το ποσοστό των ίδιων στελεχών για

τα οποία ανιχνεύθηκε μέσω της υγρής χρωματογραφίας η παραγωγή αφλατοξίνης ήταν 70%. Στη μελέτη αυτή σε 6 στελέχη τα οποία εμφάνισαν φθορισμό δεν επιβεβαιώθηκε η παράγωγή αφλατοξινών όταν ελέγχθηκαν μέσω HPLC ενώ σε 4 στελέχη που δεν παρατηρήθηκε φθορισμός ανιχνεύθηκε η παραγωγή αφλατοξίνης μέσω HPLC (Giorni *et al.*, 2007).

Επιπλέον στελέχη του *Aspergillus section Flavi* που είχαν απομονωθεί από φιστίκια προερχόμενα από περιοχή της Αιγύπτου ελέγχθηκαν για την αφλατοξιγόνο ικανότητά τους. Ο έλεγχος έγινε μέσω φθορισμού στο θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar και μέσω HPLC. Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν σε ποσοστό 89,7% αφλατοξιγόνα μέσω φθορισμού σε Coconut Cream Agar, ενώ βρέθηκαν αφλατοξιγόνα σε ποσοστό 94,3% όταν ελέγχθηκαν μέσω HPLC (Sultan and Magan, 2010).

Στελέχη των ειδών *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα καλαμποκιού, τα οποία είχαν συλλεχθεί από οικιακές εγκαταστάσεις αποθήκευσης στην Κένυα ελέγχθηκαν για την παρουσία δύο γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία βιοσύνθεσης αφλατοξινών, τα γονίδια *aflD* και *aflQ*. Όλα τα στελέχη στα οποία ανιχνεύθηκε κάποιο από τα δύο γονίδια ή και τα δύο γονίδια, όταν αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar εμφάνισαν φθορισμό, ενώ σε όσα από τα στελέχη δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο δεν παρατηρήθηκε φθορισμός. Όταν ελέγχθηκε η παραγωγή αφλατοξίνης μέσω χρωματογραφικής τεχνικής όλα τα στελέχη στα οποία είχε ανιχνευθεί το γονίδιο παρήγαγαν αφλατοξίνη B1 (Okoth *et al.*, 2012).

Από τα προαναφερόμενα προκύπτει ότι ο φθορισμός σε Coconut Cream Agar έδωσε σε κάποιες περιπτώσεις ψευδή θετικά αποτελέσματα και σε κάποιες άλλες ψευδή αρνητικά αποτελέσματα. Το ποσοστό όμως των μη εξακριβωμένων θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων ήταν πολύ μικρό.

Στην προαναφερόμενη έρευνα στην Ισπανία, 14 από τα 30 δείγματα αραβοσιτέλευρου και 2 από τα 30 δείγματα ποπ κορν βρέθηκαν μολυσμένα με αφλατοξίνη. Εντούτοις τα αφλατοξιγόνα στελέχη του είδους *A. flavus* και *A. parasiticus* που εντοπίστηκαν στην ίδια έρευνα προέρχονταν από μη μολυσμένα δείγματα (Alborch *et al.*, 2012).



#### 4.4.2 Έλεγχος παραγωγής ωχρατοξίνης

Οι έξι απομονώσεις του *Aspergillus section Nigri* όταν ελέγχθηκαν μέσω του φθορισμού σε θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar έδειξαν ότι δεν παράγουν ωχρατοξίνη Α. Αυτό σημαίνει είτε ότι ανήκουν σε μη ωχρατοξιγόνα είδη του section είτε ότι ανήκουν σε ωχρατοξιγόνα είδη του section αλλά πρόκειται για μη ωχρατοξιγόνα στελέχη.

Στελέχη *Aspergillus section Nigri* που απομονώθηκαν από φιστίκια προερχόμενα από περιοχές της Αιγύπτου μελετήθηκαν για την ωχρατοξιγόνο ικανότητα τους μέσω φθορισμού σε Coconut Cream Agar και τα αποτελέσματα αυτά συσχετισθήκαν με την ανίχνευση ωχρατοξίνης σε καθαρή καλλιέργεια των στελεχών μέσω HPLC. Για τα στελέχη αυτά διαπιστώθηκε η μη παραγωγή ωχρατοξίνης τόσο μέσω του Coconut Cream Agar όσο και μέσω της τεχνικής HPLC (Sultan and Magan, 2010).

Στελέχη του είδους *A. niger* που απομονώθηκαν από δείγματα ποπ κορν και αλεύρι ελέγχθηκαν για την ωχρατοξιγόνο ικανότητά τους μέσω της τεχνικής HPLC. Από το σύνολο των 25 στελεχών μόνο σε 1 εντοπίστηκε η παραγωγή ωχρατοξίνης (Alborch *et al.*, 2012).

Από την άλλη πλευρά στην παρούσα έρευνα οι πέντε από τις δεκαεννέα απομονώσεις *Aspergillus section Circumdadi* έδειξαν ότι παράγουν ωχρατοξίνη όταν ελέγχθηκαν μέσω του φθορισμού σε θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar.

Σε παρόμοιες έρευνες υπάρχει υψηλό ποσοστό συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων ανίχνευσης ωχρατοξίνης με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Coconut Cream Agar και των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από χρωματογραφικές τεχνικές.

Απομονώσεις του *Aspergillus section Circumdadi* από φιστίκια από περιοχές της Αιγύπτου ελέγχθηκαν για την ωχρατοξιγόνο ικανότητά τους τόσο μέσω του φθορισμού σε θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar όσο και μέσω HPLC. Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν σε ποσοστό 51,5% ωχρατοξιγόνα μέσω του φθορισμού σε Coconut Cream Agar, ενώ βρέθηκαν ωχρατοξιγόνα σε ποσοστό 45,3% όταν ελέγχθηκε η παραγωγή ωχρατοξίνης σε καθαρές καλλιέργειες αυτών των στελεχών μέσω HPLC (Sultan and Magan, 2010).

Από δείγματα καλαμποκιού στην Αργεντινή αποθηκευμένα σε σιλό που προορίζονταν για κατανάλωση απομονώθηκαν μύκητες που εντάχθηκαν στο είδος *A.*

*ochraceus* και στο *Aspergillus section Nigri*. Το 25% των στελεχών που εντάχθηκαν στο *Aspergillus section Nigri* βρέθηκαν ότι μπορούν να παράγουν ωχρατοξίνη, ενώ το ένα από τα 4 στελέχη του είδους *Aspergillus ochraceus* βρέθηκε ότι μπορεί να παράγει ωχρατοξίνη. Ο έλεγχος της παραγωγής ωχρατοξίνης από τα ανωτέρω στελέχη έγινε μέσω HPLC. Εντούτοις σε όλα τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν οι ωχρατοξικογόνοι μύκητες δεν ανιχνεύθηκε επιμόλυνση με ωχρατοξίνη μέσω HPLC (Magnoli *et al.*, 2006).

Μόλυνση με ωχρατοξίνη A βρέθηκε σε 4 από τα 30 δείγματα αραβοσιτάλευρου και σε 10 από τα 30 δείγματα ποπ κορν σε επίπεδα μόλυνσης κάτω από τα επιτρεπτά όρια (Alborch *et al.*, 2012).

Ωχρατοξίνη βρέθηκε σε αραβοσιτάλευρο στη Βραζιλία σε επίπεδα πιο ψηλά από τα όρια που έχουν θεσπιστεί, ενώ στην ίδια έρευνα δεν ανιχνεύθηκε ωχρατοξίνη σε δείγματα ποπ κόρν τα οποία όμως βρέθηκαν μολυσμένα με αφλατοξίνη σε ποσοστό 8,3% και ζεαραλενόνη σε ποσοστό 4 % (Sekiyama *et al.*, 2004).

#### **4.4.3 Έλεγχος παραγωγής κιτρινίνης**

Καμία από τις 15 απομονώσεις του γένους *Penicillium* που απομονώθηκαν από το αλεύρι δεν έδειξε ότι μπορούν να παράγουν κιτρινίνη όταν ελέγχθηκαν μέσω του φθορισμού στο θρεπτικό υλικό Coconut Cream Agar. Αυτό σημαίνει είτε ότι ανήκουν σε είδη που δεν παράγουν κιτρινίνη είτε ότι τα συγκεκριμένα στελέχη δεν μπορούν να παράγουν κιτρινίνη.

Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές τα αποτελέσματα μέσω του φθορισμού σε Coconut Cream Agar για την ανίχνευση της κιτρινίνης ταυτίζονται με τα αποτελέσματα μέσω χρωματογραφικών τεχνικών. Στο 100% των απομονώσεων του είδους *Penicillium citrinum* που έδειξαν φθορισμό σε Coconut Cream Agar ανιχνεύθηκε η παραγωγή κιτρινίνης σε καθαρή καλλιέργεια αυτών των απομονώσεων μέσω της τεχνικής TLC. (Mohamed *et al.*, 2013).

Κιτρινίνη βρέθηκε ότι μπορούν να παράγουν 8 από τα 71 στελέχη του γένους *Penicillium* που απομονώθηκαν από αραβοσιτάλευρο καθώς και 3 από τα 48 στελέχη του συγκεκριμένου γένους που απομονώθηκαν από ποπ κορν. Ο έλεγχος της παραγωγής κιτρινίνης έγινε μέσω TLC. Ωστόσο σε κανένα από τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν τα παραπάνω στελέχη δεν ανιχνεύθηκε κιτρινίνη (Alborch *et al.*, 2012).

Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης των δυνητικά μυκοτοξικογόνων απομονώσεων του γένους *Fusarium* ενέχει τον κίνδυνο όλα τα ελεγμένα δείγματα να είναι μολυσμένα με φουμονισίνη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με την εφαρμογή χρωματογραφικών ή ανοσοενζυμικών τεχνικών.

Επίσης το υψηλό ποσοστό ανίχνευσης του γονιδίου *fum1* στις απομονώσεις της έρευνας σε συνδυασμό και με τη συχνότητα εμφάνισης των ειδών *F. verticillioides* και *F. proliferatum* σε ποπ κορν και αραβοσιτάλευρο και τη συχνότητα με την οποία ανιχνεύεται το γονίδιο αυτό στα παραπάνω είδη, οδηγεί στην υπόθεση ότι το μεγαλύτερο μέρος των απομονώσεων εντάσσεται σ' αυτά τα είδη. Υπόθεση που μπορεί επιβεβαιωθεί μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Εξειδικευμένοι εκκινητές για τα παραπάνω είδη έχουν σχεδιαστεί από τους Mule *et al.*, (2004), Patino *et al.*, (2004) και έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές ερευνητικές εργασίες. Επιπλέον θα μπορούσε να διερευνηθεί το ποσοστό έκφρασης του ανιχνεύομενου γονότυπου των συγκεκριμένων απομονώσεων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης καμία από τις δεκαέξι επιλεγμένες απομονώσεις του γένους *Fusarium* δεν εντάσσεται στα είδη που μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι παράγουν τριχοθηκίνες. Θα μπορούσε επομένως να θεωρηθεί ότι πιθανόν δεν υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης των ελεγμένων δειγμάτων με τριχοθηκίνες.

Οι απομονώσεις του *Aspergillus* section *Flavi* με βάση τα αποτελέσματα βρέθηκαν 100% μη αφλατοξιγόνες. Οι απομονώσεις αυτές θα μπορούσαν να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Στην περίπτωση που ενταχθούν σε κάποιο είδος κατεξοχήν αφλατοξιγόνο και επιβεβαιωθεί η μη αφλατοξιγόνος ικανότητά τους τότε θα μπορούσαν σε προγράμματα ολοκληρωμένης προστασίας των καλλιεργειών να χρησιμοποιηθούν τα στελέχη αυτά ως βιολογικοί παράγοντες, όπως αυτό ήδη εφαρμόζεται στις ΗΠΑ (Cotty and Mellon, 2006). Πολύ περισσότερο εάν αυτές οι μη αφλατοξιγόνες απομονώσεις διαθέτουν γονίδια που επάγουν την παραγωγή αφλατοξίνης τότε θα μπορούσαν να ενταχθούν σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Με βάση τα αποτελέσματα για τα συγκεκριμένα δείγματα λοιπόν δεν υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης με αφλατοξίνες και απομένει να επιβεβαιωθεί μέσω χρωματογραφικών ή ανοσοενζυμικών τεχνικών.

Οι απομονώσεις του *Aspergillus section Circumdati* εντοπίστηκαν σε ποσοστό 26,3% ωχρατοξιγόνες. Η υπόθεση ότι τα συγκεκριμένα δείγματα από τα οποία προήλθαν οι εν λόγω απομονώσεις, είναι μολυσμένα με ωχρατοξίνη θα πρέπει να επιβεβαιωθεί μέσω χρωματογραφικών ή ανοσοενζυμικών τεχνικών για να αποκλειστεί το μικρό ποσοστό των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων που είχε εντοπιστεί σε κάποιες έρευνες. Επιπρόσθετα με βάση τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών, που παρατέθηκαν παραπάνω, ο εντοπισμός ωχρατοξιγόνων στελεχών σε κάποια δείγματα δε σημαίνει απαραίτητα και επιμόλυνση των συγκεκριμένων δειγμάτων με ωχρατοξίνη και το αντίθετο. Επίσης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των ειδών εντός του συγκεκριμένου section και να διαπιστωθεί εάν τα μυκοτοξικογόνα στελέχη εντάσσονται στα καταγεγραμμένα, ως ωχρατοξιγόνα, είδη του section.

Το ποπ κορν αποτελεί δημοφιλές σνακ που καταναλώνεται από τα παιδιά αλλά και από τους ενήλικους. Το αραβοσιτάλευρο αποτελεί προϊόν που χρησιμοποιείται στην ελληνική κουζίνα ιδιαίτερα στις μέρες μας όπου υπάρχει η τάση για παρασκευή εναλλακτικών τροφίμων με μειωμένη περιεκτικότητα σε γλουτένη αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων ως επικάλυψη κάποιων προπαρασκευασμένων φαγητών. Η παρούσα μελέτη ήταν μια πρώτη προσέγγιση για τα ελληνικά δεδομένα που αποσκοπούσε στην ανίχνευση μυκοτοξικογόνων μυκήτων σε αυτές τις δύο ομάδες τροφίμων και της εκτίμησης της δυνητικής ικανότητας παραγωγής μυκοτοξινών από αυτούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι τα προϊόντα αυτά διατροφής φέρουν μικροβιακό φορτίο από μυκοτοξικογόνους μύκητες.

Οι μύκητες που ανιχνευθήκαν με βάση τη διερεύνηση που έγινε μπορούν να παράγουν ωχρατοξίνη A και μπορούν δυνητικά να παράγουν φουμονισίνη ενώ δεν μπορούν να παράγουν αφλατοξίνη και κιτρινίνη. Η ανίχνευση της παραγωγής καθώς και της δυνητικής ικανότητας παραγωγής μυκοτοξινών μπορεί να οδηγήσει σε υποθέσεις για την επιμόλυνση, των ελεγχθέντων δειγμάτων με κάποια από τις παραπάνω τοξίνες. Εντούτοις απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν αυτές οι υποθέσεις.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δημιουργούν προβληματισμό σχετικά με το πόσο ασφαλής είναι η κατανάλωση αυτών των τροφίμων τα οποία τρόφιμα μάλιστα έχουν αποδέκτες κυρίως την ευαίσθητη ομάδα των παιδιών.

Η ανίχνευση μυκήτων και μάλιστα μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες σε αυτή την ομάδα τροφίμων υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της αξιοποίησης, της

υπάρχουσας γνώσης και τεχνολογίας με σκοπό το σχεδιασμό και την εφαρμογή, ολοκληρωμένων προγραμμάτων παραγωγής που θα διασφαλίζουν την ποιότητα, των εν λόγω προϊόντων και θα προστατεύουν τους καταναλωτές από την έκθεση σε τοξικές ουσίες.



Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G., Caban˜es, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2650–2652.

Abarca, M.L., Accensi F., Bragulat, M.R., Castella G., Caban˜es, F.J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. Journal of Food Protection 66, 504–506.

Abbas, H.K., Riley, R.T. (1996). The presence and phytotoxicity of fumonisins and aal-toxin in *alternaria alternata*. Toxicon 34, 133–136

Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablotowics, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A., Weaver, Ma. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. Toxin Reviews 28, 142-153

Alborch, L., Bragulat, R. M., Castellá, M. Abarca, L. G., Cabañe, J. F. (2012). Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. Food Microbiology 32, 97 – 103

Auerbach, H., Oldenburg, E., Weissbach, F. (1998). Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. Journal of the Science of Food and Agriculture 76, 565–572.

Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Schurz Rogers, H., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L. and the Aflatoxin Investigative Group. (2005). Case control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. Environmental Health Perspectives 113, 1779–1783.

Barnet H.L., Hunter B. B. (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society

Barron, G.L., Lichtwardt, R.W. (1959). Quantitative estimations of the fungi associated with deterioration of stored corn in Iowa. Iowa State Journal Scienc 34, 147–155.

Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á., Bartók, M. (2006). Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin- like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Rapid Comm Mass Spectrometry 20, 2447–2462.

Beuchat, L.R., Nail, B.V., Brackett, R.E., Fox, T.L. (1990). Evaluation of a culture film (Petrifilm™ YM) method for enumerating yeasts and molds in selected dairy and highacid foods. Journal of Food Protection 53: 864, 869–874.

Bilgrami, K.S., Ranjan, K.S. , Sinha, A.K. (1992). Impact of crop damage on occurrence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin in rainy-season maize (*Zea mays*). Indian Journal of Agricultural Sciences 62, 704–709

Bittencourt, A. B. F., Oliveira, C. A. F., Dilkin, P., Corrêa, B. (2005). Mycotoxin occurrence in corn-meal and flour traded in São Paulo, Brazil. Food Control 16, 117-120.

Blanc, P. J., Loret, M. O., Goma, G. (1995a). Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnology Letters 17(3), 291.

Bluhm, B.H., Flaherty, J.E., Cousin, M.A., Woloshuk, C.P. (2004). Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. Journal of Food Protection 65, 1955–1961.

Bordin, K., Rosim, R.E., Neeff, D.V., Rottinghaus, G.E., Oliveira, C.A.F.

(2014) Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. *Food Chemistry* 155, 174-178

Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 80, 85–103.

Broggi, L.E., González, H.H.L., Resnik, S.L., Pacin, A.M. (2002) Mycoflora distribution in dry-milled fractions of corn in Argentina. *Cereal Chemistry* 79(5), 741-744

Bullerman, L.B., Baca, J.M., Stott, W.T. (1975). An evaluation of potential mycotoxin-producing molds in corn meal. *Cereal Foods World* 20, 248–253.

Bullerman, L.B., Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119, 140–146.

Cabañas, R., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Cabañes, F.J. (2008). Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food Microbiology* 25, 642-647.

Christensen, C.M., Cohen, M. (1950). Numbers, kinds and sources of molds in flour. *Cereal Chemistry* 27, 178–85.

Christensen, C.M. (1987). Field and storage fungi, in *Food and Beverage Mycology* (ed L.R. Beuchat), 2nd, Van Nostrand Reinhold, New York., 211–232.

Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A., March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2797–2801

Ciegler, A., Kurtzman, C.P. (1970). Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agricultural commodities. *Applied Microbiology* 20, 761–4.

Corn Annual. (2010) Corn Refiners Assosiation, Annual Report Washington DC, and Renewable Fuels Assosiation

Corn Refiners Association Food Safety Information Papers. (2011). Mycotoxins available

Cotty P. J., Mellon J. E. (2006). Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Research* 22, 110–117

Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ames, IA, Task Force Report 139.

Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L. Lattanzio, V.M.T., Albertini, E. (2012). Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology* 31 (1), 17-24

Cundliff, E., Davies, J. (1977). Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11, 491–499.

Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Šegvić, M. (2005). Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 56 (3), 275-280

Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.O., Leslie, J.F., Nelson, P.E. (1992). Heritability of fumonisin B1 production in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2799–2805.

Desjardins, A.E., Busman, M. (2006). Mycotoxins in developing countries: a case study of maize in Nepal. *Mycotoxin Research* 22, 92–95.

Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kuhne, B., Van de Walle, Courtens T,



Gellynck X. (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. Review Journal of Cereal Science 48, 243-257.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13-15

Duarte, C. S., Tanello, A., Pena, A., Lino, M. C., Matos, D. C., Oliveira, P.P. M.B., Alves, R. M. (2010). Evaluation of ochratoxin A exposure degree in two Portuguese cities through wheat and maize bread consumption during the winter 2007. Food Control 21, 702–707

Dvorackova, I., Kusak, V., Vesely', D., Vesela, J., Nesnvdal, P. (1977). Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). Ann. Nutr. Aliment. 31, 977–989.

Dvorackova, I., Pvcnova, V. (1986). Pulmonary interstitial fibrosis with evidence of aflatoxin B1 in lung tissue. Journal of Toxicology and Environmental Health 18, 153–157.

Dyer, S.K., McCammon, S. (1994). Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. Journal of Applied Bacteriology 76, 75–78.

El Yazeed, H.A., Hassan, A., Moghaieb, R.E.A., Hamed, M., Refai, M. (2011). Molecular detection of Fumonisin-producing *Fusarium* species in animal feeds using polymerase chain reaction (PCR). Journal of Applied Sciences Research 7 (4), 420-427

Elmholt, S., Rasmussen, P.H. (2005). *Penicillium verrucosum* occurrence and ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice. Mycopathologia 159, 421-432.

Eriksen, G.S., Alexander, J. (1998). *Fusarium* Toxins in Cereals – A Risk Assessment. Nordic Council of Ministers, TemaNord 502, Copenhagen, Denmark.

Eskola, M. (2002). Study of Trichothecenes Zearalenone and Ochratoxin A in Finnish Cereals: Occurrence and Analytical Techniques (Dissertation). EELA Publications, Helsinki.

European Commission Regulation (EC). (2007). Official Journal of the European Union, 2006 R/1881, 1-31.

European Food Safety Authority (EFSA), (2007). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. EFSA Journal 446, 1–127.

European Food Safety Authority (EFSA). 2011a. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. EFSA Journal 9, 2197, 1-124.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011c). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA Journal 9, 2481, 1-187.

European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. The EFSA Journal 10(3) 1-82

European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Scientific opinion on ergot alkaloids in food and feed. EFSA J. 10, 2798, 1-158.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper no. 81. FAO, Rome, Italy, 1728–3264.

Food and Agriculture Organization (FAO). (1999). The state of food insecurity in the world, 1-33, <http://www.fao.org/NEWS/1999/img/sof I99-e.pdf>

Fapohunda O. S., Ngedu, A, Okeke, O.F.I, Fapohunda, T, Wahab M.K.A., Okeke, F. (2014).Ochratoxins - A review Basic Research Journal of Agricultural Science and Review 3(11),105-115

Fente, A. C., Jaimez Ordaz, J.,Va'Zquez, B., Franco, M. C., Cepeda, A. (2001) New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. Applied and Environmental Microbiology 67 (10), 4858–4862

Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C., Buhr, M.M. (1989). Measurement of the relative binding-affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen-receptors in swine, rats and chickens – an indicator of estrogenic potencies. Comparative Biochemistry and Physiology 94, 691–694.

Flajs, D., Peraica, M. (2009). Toxicological properties of citrinin. Arh Hig Rada Toksikolo 60, 457–464.

Food and Drug Administration (FDA) (2001). Guidance for industry fumonisin levels in human foods and animal feeds. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation>.

Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraeken, J. (2004). New ochratoxin producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies in Mycology 50, 23–43.

Frisvad, J.C., Samson R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Studies in Mycology 49, 1–173.

Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., Samson, R.A. (2006b). Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. In Advances in Food Mycology – Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 571, eds A.D. Hocking, J.I. Pitt, R.A. Samson and U. Thrane. Berlin: Springer-Verlag, 33–46.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(23), 9727-9732.

Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics (Samson, R.A., Pitt, J.I., eds). Plenum Press, New York: 55–62.

Geiser, D.M., Pitt, J.I., Taylor, J.W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95, 388–393

Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R., Kriek, N.P.J. (1988). Fumonisin — Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Applied and Environmental Microbiology 54, 1806–1811

Gelderblom, W. C., Abel, S., Smuts, C. M., Marnewick, J., Marasas, W. F., Lemmer, E. R., Ramljak, D. (2001). Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion, Environmental Health Perspectives 109, 291–300

Gibson L., Benson G. (2002). Origin, History, and Uses of Corn (*Zea mays*) Iowa State University. University Press.

Giorni, P., Magan, N. , Pietri, A. , Bertuzzi, T. , Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. International Journal of Food Microbiology 113, 330–338

Graves, R.R., Rogers, R.F., Lyons, A.J., Hesseltine, C.W. (1967) Bacterial and actinocycete flora of Kansas-Nebraska and Pacific Northwest wheat and wheat flour. *Cereal Chemistry* 44, 288–99.

Grove, J.F., 1988. Non-macrocycle trichothecenes. *Natural Product Reports* 5, 187–209.

Grove, J.F., 1993. Macrocycle trichothecenes. *Natural Product Reports* 10, 429–448.

Hagler, W.M., Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Behrens, J.C., 1979. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* Gibbosum in rice culture. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 849–853.

Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I. (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using conconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1, 67–72.

Hesseltine, C.W., Graves, R.R. (1966). Microbiology of flours. *Economic Botany* 20, 156–68

Hetherington, A. C., Raistrick, H. (1931). Studies in biochemistry of microorganism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, 220, 269–297.

Hocking, A.D., Pitt, J.I. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 488–492.

Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (eds). (2006a). *Advances in Food Mycology*. Springer, New York.

Horn, B.W. (2003). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology Toxin Reviews* 22, 355–383.

Horn, B.W. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. *Food Additives & Contaminants* 24, 1088–1101.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*, IARC Press, vol. 56.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, Lyon, IARC Press, vol. 82.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. London (ICMSF). (1996). Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB, editors. *Microorganisms in foods 5: microbiological specifications of food pathogens.*, UK: Blackie Academic and Professional. An Imprint of Chapman & Hall, 347–381.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (2001). Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food WHO Food Additives Series 47. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2008). Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 59. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v59je01.pdf>

Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J.-S., Ellis, W.O., Phillips, T.D., Williams, J.H. (2008). Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human

immunodeficiency virus disease. *Clinical and Development Immunology* vol. 2008, 1-12

Juan, C., Pena, A., Lino, C., Moltó, C. J., Mañes, J. (2008). Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. *International Journal of Food Microbiology* 127, 284–289

Jurado, M., Vazquez, C., Patino, B., Gonzalez-Jaen, M.T. (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides* *Systematic and Applied Microbiology* 28, 562–568.

Kamphuis, H.J., van der Horst, M.I., Samson, R.A., Rombouts, F.M., Notermans, S. (1992). Mycological condition of maize products. *International Journal of Food Microbiology* 16, 237- 245.

Katta, K. S., Eskridge, M. K., Bullerman, B.L. (1995). Mold Content of Commercial Popcorn. *Journal of food protection* 58(9), 1014-1017.

Kent, N.L., Evers, A.D. (1994). *Technology of Cereals*, Pergamon Press, Oxford, New York.

Kent-Jones, D.W., Amos, A.J. (1957). *Modern Cereal Chemistry*, 5th edn, Northern Publishers, Liverpool, UK.

Klich, M.A., Pitt, J.I. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 99–108.

Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V., Tilak, T.B.G. (1975). Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of Western India. *Indian Journal of Medical Research* 63, 1036–1048.

Krska, R., Welziga, E., Boudra, H. (2007). Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137, 241–264.

Lee, H.B., Magan, N. (2000). Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 61, 11-16.

Lenart, A.M., Klimek-Kopyra, A., Boroń, P.M. (2013). Morphological and molecular identification and PCR amplification to determine the toxigenic potential of *Fusarium* spp. isolated from maize ears in southern Poland. *Phytoparasitica* 41 (3), 241-248

Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspective* 113, 1763–1767.

Li, F., Xu, G., Li, Y., Chen, Y. (2003). Study on the production of citrinin by *Monascus* strains used in food industry. *Wei Sheng Yan Jiu* 32(6), 602–605.

Lillehoj, E.B., Fennell, D.I., Kwolek, W.F. (1976a). *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Iowa corn before harvest. *Science* 193, 495–496.

Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Peterson, R.E., Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W. (1976b). Aflatoxin contamination, fluorescence, and insect damage in corn infected with *Aspergillus flavus* before harvest. *Cereal Chemistry* 53, 505–512.

Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Homer, E.S. (1980). Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. *Cereal Chemistry* 57, 255–7.

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Reisch, B.I. (1994). A simple and

efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 6–13.

Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 597–609.

Lopez-Garcia, R., Park, D.L., Phillips, T.D. (1999). Integrated mycotoxin management systems. Tunis, Tunisia: Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, <http://www.fao.org/docrep/x2100t/x2100t07.htm>.

Mac Faddin, J. F. (1985). Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S., Dalcero, A.M., (2006). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia* 161, 53-58.

Mansfield, M.A., Jones, A.D., Kuldau, G.A. (2008). Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology* 98, 330–336.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Tousson, T.A. (1984). *Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*, Pennsylvania State University Press, University Park, PA.

Marasas, W.F.O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau van Waes, J., et al. (2004). Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition* 134, 711-716

Marin, S., Ramos, J. A., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013), *Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment Food and Chemical Toxicology* 60, 218–237

Martin, C.R., Sauer, D.B. (1976). Physical and biological characteristics of grain dust. *Trans. ASAE* 19, 720–723.

Martins, H. M., Almeida, I., Marques, M. F., Guerra, M. M. (2008a). Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 46(7), 2585-2587.

Martins, H. M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M. M., Bernardo, F. (2008b). Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. *Mycotoxin Research* 24(1), 19-23.

Mazzani, C., Luzon, O., Beomont, P., Chavarri, M. (2004). Mycobiota associated to maize kernels in Venezuela and in vitro aflatoxigenicity of the *Aspergillus flavus* isolates. *Fitopatol. Venezolana* 17, 19–23

Manonmani H.K., Anand S., Chandrashekar A., Rati E.R. (2005). Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry* 40, 2859–2864

Merrill, A. H., Jr., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A., Riley, R. T. (2001). Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins, *Environmental Health Perspectives* 109, 283–289.

Miller, J.D. (2000). Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives* 109, 321–324

Mirete, S., Patino, B., Vazquez, C., Jimenez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C., Gonzalez Jaen, M.T. (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species, *International Journal of Food Microbiology* 89, 213–221.

Mirete S., Vazquez, M.G., Jurado, M., Gonzalez- Jaen, M.T. (2004).

Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1a sequence analyses, *European Journal of Plant Pathology* 110, 515–523.

Mohamed, S. (2013). Toxigenic fungi and mycotoxin production in Maldivian fish (smoked dried tuna fish). PhD thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Mohamed, S., Flint, S., Palmer, J. G., Fletcher, C., Pitt, J. I. (2013). An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production *Letters in Applied Microbiology* 57, 214–219

Montani, M., Vaamonde, G., Resnik, S.L., Buera, P. (1988). Temperature influence on *Penicillium citrinum* growth and citrinin accumulation kinetics. *International Journal of Food Microbiology* 7 (2), 115-122

Moss, O. M. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins, In: Lund, B., Baird-Parker C. A., Grahame W. G., *The microbiological safety and quality of food of food*. Springer 53, 1490-1517

Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. (2004) A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* *European Journal of Plant Pathology* 110 (5-6), 495-502

Mullis, K.B., Fallana, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335 -350.

Munkvold, G.P., Carlton, W.M. (1997). Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Disease* 81, 211–216

Munkvold, G.P., McGee, D.C., Carlton, W.M. (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87, 209–217

Muriuki, G.K., Siboe, G.M. (1995). Maize flour contaminated with toxigenic fungi and mycotoxins in Kenya. *African Journal of Health Sciences* 2, 236–241.

Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science* 71 (5), R51-R65

Nielsen, K.F., Grafenhan, T., Zafari, D., Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8190–8196.

Nikolov, I.G., Petkova-Bocharova, D., Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz, C., Gill, N., Day, C., Chernozemsky, I.N. (1996). Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 15, 201–207.

O'Callaghan, J., Caddick, X. M., Dobson, W. A. D. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149, 3485–3491

Okoth, S., Nyongesa, B., Ayugi, V., Kang'ethe, E., Korhonen, H., Joutsjoki, V. (2012). Toxigenic Potential of *Aspergillus* Species Occurring on Maize Kernels from Two Agro-Ecological Zones in Kenya. *Toxins* 4, 991-1007

Ostry, V., Malir, F., Ruprich, J. (2013). Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins* 5, 1574-1586

Pacin, A.M., Boca, R.T., González, H.H., Resnik S.L., Burak, R., Broccoli, A.M., de Souza, J.C. (2002). Natural occurrence of mycotoxins and mycoflora of argentinian popcorn. *Mycotoxin Research* 18(2), 90-96

Palliyaguru, D.L., Wu, F., 2013. Global geographical overlap of aflatoxin and

- hepatitis C, controlling risk factors for liver cancer worldwide. *Food Add. Contam.* – A. (inpress). *Food Additives and Contaminants Part A* 30(3), 534–540.
- Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G.M., Gleadle, A.E. (1997). Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Additives and Contaminants* 14, 187–191
- Patino, B., Mirete, S., Gonzalez - Jaen, T., Mule, G., Rodriguez, T.M., Vazquez, C. (2004). PCR detection assay of Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection* 6, 1278–1283.
- Patrick, F.D., Johnson T.E. (2010). Field incidence of mycotoxins in commercial popcorn and potential environmental influences. *Mycotoxin Research* 26, 15-22 .
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. , Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93, 689–703
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, A. R. (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 61 – 99
- Pitt, J.I. (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* 65, 1135–1157.
- Pitt, J.I. (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin, in *Water Relations of Foods* (ed. R.B. Duckworth), Academic Press, London, 273–307.
- Pitt, J.I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 266–269.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P. (1993). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology* 20, 211–26.
- Pitt, J.I. (1993b). Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 56, 265–269.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* 23, 35–53.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*, 2nd Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Miscamble, B.F., Dharmaputra, O.S., Kuswanto, K.R., Rahayu, E.S., Sardjono. (1998a). The mycoflora of food commodities from Indonesia. *Journal of Food Mycology*, 1, 41–60.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Hohn, T.M. (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology* 38, 237–249.
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), (2012). Annual Reports 2012. European Commission.  
[http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff\\_publications\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_publications_en.htm).
- Reid L.M., Hamilton R.I. (1996). Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. *Agriculture and Agri-Food Canada Technical Bulletin* 1996-5E
- Ribeiro, S.A.L., Cavalcanti, M.A.Q., Fernandes, M.J.S., Lima, D.M.M.

(2003). Filamentous fungi isolated from corn-derived products. *Rev. Brazilian Botany* 26, 223–229.

Richardson, K.E., Hagler, W.M., Mirocha, C.J., (1985). Production of zearalenone, a– zearalenol and b–zearalenol by *Fusarium spp.* in rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 862–866.

Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y., Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 159, 18-46

Roberts, A. T. , Cordier, J -L., Gram, L., Tompkin, B. R., Pitt, I . J., Gorris, M. L. G., Swanson, J. K. M. (2005). Cereals and cereal products In *Micro-Organisms in Foods* 6, 392-439

Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D., Wilson, T.M. (1990). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3225–3226

Ross, P.F., Rice, L.G., Reagor, J.C., Osweiler, G.D., Wilson, T.M., Nelson, H.A., Owens, D.L., Plattner, R.D., Harlin, K.A., Richard, J.L., Colvin, B.M., Banton, M.I. (1991b). Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 3, 238–241

Ryu, D., Hanna, M.A., Bullerman, L.B., 1999. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection* 62, 1482–1484.

Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Manabe, M. (1989). Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. *Japan Agricultural Research Quarterly* 23, 151–154

Samapundo S., Devlieghere F., De Meulenaer B., Atukwase A., Lamboni Y., Debevere J. M. (2007). Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of whole yellow dent corn. *Journal of Food Engineering* 79, 168-175

Sambrook, G., Fritsch, A.F., Maniatis, T.(1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory Press, Second edition

Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I., King, A.D. (eds) (1992). *Modern Methods in Food Mycology*, Elsevier Bioscience, Amsterdam

Samson A. R. , Hong S–B., Frisvad C. J., (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus* *Medical Mycology* 2006, 44, 133-148

Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A., Plasencia, J. (2005). Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (22), 8565-8571

Sargeant, K., O’Kelly, J., Carnaghan, R.B.A., Allcroft, R. (1961). The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Record* 73, 1219–1222.

Sartori, M.R., Taniwaki, M.H., Eiroa, M.N.U., Pettinelli, A. (1991). Storage of maize with moderately high moisture content in an underground polyethylene silo. *Colet. Inst. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.)* 21, 309–316.

Sauer, D.B., Meronuck, R.A., Christensen, C.M. (1992). Microflora, in *Storage of Cereal Grains and Their Products* American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 313–340.

SCOOP, 2003. Reports on Tasks for Scientific Cooperation – Report of Experts Participating in Task 3.2.10 – Collection of Occurrence Data of *Fusarium* Toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member



States.

Seidman A.L., (2011). Εργαστηριακοί υπολογισμοί στις βιολογικές επιστήμες. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.

Sekiyama, B.L., Alessandra Braga Ribeiro, A.B., Paulo André Machinski, P.A., Miguel Machinski Junior, M. (2005). Aflatoxins, Ochratoxin, A and Zearalenone in maize – basic food products. *Brazilian Journal of Microbiology* 36, 289-294

Semeniuk, G. (1954). Microflora, in *Storage of Cereal Grains and Their Products* (eds J.A. Anderson and A.E. Alcock), Monograph Ser. 2, American Society of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 77–151.

Shelby, R.A., Rottinghaus, G.E., Minor, H.C. (1994a). Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detecting fumonisin on maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 2064–2067

Shelby, R.A., White, D.G., Bauske, E.M. (1994b). Differential fumonisin production in maize hybrids. *Plant Disease* 78, 582–584

Shotwell, O.L. (1977). Aflatoxin in corn. *Journal of the American Oil Chemists Society* 54, 216A–224A

Simpanya, F.M., Allotey, J., Mpuchane, S. (2001). Insect and mycoflora interactions in maize flour. *African Journal of Food and Nutritional Sciences* 1, 1-8.

Schönborn C. (1989). The long-time survival of dermatophytes and moulds under paraffin oil. *Mycoses* 32 (7), 349-353

Soriano, J.M., Dragacci, S., (2004) Occurrence of fumonisins in foods, *Food Research International* 37, 985-1000

Sreenivasa, M.Y., Dass, R.S., Raj, A.P.C., Janardhana, G.R. (2008). PCR method for the detection of genus *Fusarium* and fumonisin-producing isolates from freshly harvested sorghum grains grown in Karnataka, India. *Journal of Food Safety* 28 (2), 236-247

Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, Bhat RV, Breiman R, et al. (2006). Public Health Strategies for Reducing Aflatoxin Exposure in Developing Countries: A Workgroup Report. *Environmental Health Perspectives* 12, 1898-1903.

Sultan, Y., Magan, N. (2010), Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions of Egypt. *Mycotoxin Research* 26, 133–140

Sun, G., , Su, J., Huang, T., Yu, J., Tang, L, Gao, W., Wang, J.-S. (2007). Fumonisin B1 contamination of home grown corn in high-risk areas for esophageal cancer in China. *Food Additives and Contaminants* 24, 181–185.

Thatcher, F.S., Coutu, C., Stevens, F. (1953). The sanitation of Canadian flour mills and its relationship to the microbial content of flour. *Cereal Chemistry* 30, 71–102.

Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. (1992). The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117, 3–9

Thrane, U. (2001). Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In: Summerbell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., Burgess, L.W. (Eds.), *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, 29–49.

Thrane, U., Adler, A., Clasen, P., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F., Ritieni, A., (2004). Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* 95, 257–266.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L. (1965). Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. Journal of the Chemical Society 5, 7083–7088.

Van der Westhuizen, L., Shephard, G. S., Scussel, V. M., Costa, L. L. F., Vismer, H. F., Rheeder, J. P., et al. (2003). Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(18), 5574-5578.

Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Studies in Mycology 69, 57–80.

Visagie M. C., Varga J., Houbraken J., Meijer M., Kocsub\_e S , Yilmaz N., Fotedar R. , Seifert A. K., Frisvad C J. , Samson A. R. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*) Studies in Mycology 78, 1–61.

Wan Norhasima, W. M., Abdulamir, A. S., Abu Bakar, F., Son, R., Norhafniza, A. (2009). The health and toxic adverse effects of Fusarium fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. American Journal of Infectious Diseases 5(4), 283-291.

Weidenboerner, M., Wieczorek, C., Appel, S., Kunz, B. (2000). Whole wheat and white wheat flour – the mycobiota and potential mycotoxins. Food Microbiology 17, 103–107

World Health Organization (WHO). (1990). Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. Environmental Health Criteria 105, 1-263.

Wichmann, G., Herbarth, O., Lehmann, I. (2002). The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. Environmental Toxicology 17, 211–218.

Wicklow, D.T., Weaver, D.K., Throne, J.E. (1998). Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. Journal of Stored Products Research 34, 355–361.

Williams, W.P., Windham, G.L., Buckley, P.M., Daves, C.A. (2006). Aflatoxin accumulation in corn hybrids infested at different growth stages with southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Agricultural and Urban Entomology 23, 97–103.

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.

Zinedine, A., Blesa, J., Mahnine, N., El Abidi, A., Montesano, D., Mañes, J. (2010). Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. Food Control 21 (2), 132-135