

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Προσδιορισμός μυκήτων και μυκοτοξινών σε ιχθυοτροφές
και συστατικά ιχθυοτροφών»**



**Ευαγγελία Χατζηχρήστου
Επιβλέπων Καθηγητής: Ιωάννης Μποζιάρης**

ΒΟΛΟΣ 2016

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT**

MASTER'S THESIS

**“ Determination of fungi and mycotoxins
in fish feed and fish feed constituents”**

Evangelia Chatzichristou

VOLOS 2016

Αφιέρωση

Την ερευνητική αυτή εργασία, την αφιερώνω με όλη μου την αγάπη στην οικογένεια μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας τη παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Βέλλιο για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη για την προμήθεια των ιχθυοτροφών και των συστατικών τους καθώς και για τις χρήσιμες επισημάνσεις του στο τελικό κείμενο της μεταπτυχιακής διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρόβλημα με τις μυκοτοξίνες είναι σημαντικό, αναφέρεται ως παγκόσμιος κίνδυνος και θεωρείται ως μία από τις πλέον σοβαρές προκλήσεις για την ασφάλεια των τροφίμων, την υγεία των ανθρώπων, των ζώων και για τη σύγχρονη τοξικολογία. Οι μυκοτοξίνες θεωρούνται γενικά επικίνδυνες ουσίες που παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων των γενών *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* κ.α.

Αντικείμενο της μελέτης είναι η διερεύνηση της προσβολής των ιχθυοτροφών με μύκητες. Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των μυκήτων και ο έλεγχος για παράγωγη μυκοτοξίνης. Για τον παραπάνω σκοπό επιλέχθηκαν τα εξής συστατικά ιχθυοτροφών: άλευρο πουλερικών, ιχθυάλευρο, γλουτένη καλαμποκιού, πτεράλευρο, κρεατάλευρο και ηλιάλευρο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο μεγαλύτερος πληθυσμός μυκήτων αναπτύσσεται σε προϊόντα φυτικής προέλευσης (καλαμποκάλευρο, ηλιάλευρο) σε σχέση με τα ζωικής. Επιπλέον αφού απομονώθηκαν ακολούθησε ο προσδιορισμός και η ταυτοποίηση μυκήτων των ιχθυοτροφών διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα περιείχαν μύκητες των γενών *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*. Η ανάλυση για τυχόν παραγωγή μυκοτοξίνης έγινε με τη χρήση ακτίνων UV μετά από ανάπτυξη των μυκήτων σε θρεπτικό υλικό coconut agar. Συμπερασματικά τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι οι μύκητες που απομονώθηκαν από τα συγκεκριμένα δείγματα δεν παράγουν μυκοτοξίνες.

ABSTRACT

Mycotoxins are a very important problem of toxicology worldwide for the food safety, animal and human health. Mycotoxins are compounds that produced by various fungi genera such as *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* etc.

The present study deals with the exploration of contamination of fish feedstuffs by fungi. The aim of the study is the determination of potential mycotoxinogenic moulds in fish feedstuffs. For this purpose, fish-feed constituents such as poultry meal, fish meal, corn gluten, feather meal, pork meal and sunflower meal were examined.

Results showed that the highest moulds population was found in plant origin constituents such as corn gluten and sunflower meal compared to those of animal origin. Furthermore the moulds were isolated and subsequently identified. Some of the identified moulds belong to the genera of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Further testing for mycotoxin production was performed using UV after growth on coconut agar. None of the tested moulds were found to produce mycotoxins.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	1
1.1 Εισαγωγή	1-3
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	4
1.1.2 Κυριότερα γένη μυκήτων.....	5-6
1.1.3 Κατηγορίες μυκοτοξινών.....	7-13
1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΥΝΟΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	
ΜΥΚΟΤΟΞΙΚΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ	14
1.2.1 Η παρουσία των διάφορων μυκοτοξινών στα διάφορα τρόφιμα και αγροτικά προϊόντα.....	15
1.2.2 Επιμόλυνση των φυτικών προϊόντων με μυκοτοξίνες.....	16
1.2.3 Στρατηγικές ελέγχου μετά τη συγκομιδή και ελαχιστοποίηση των μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα	17-19
1.2.4 Πρόληψη προσβολής από μυκοτοξίνες.....	20
1.2.5 Αντιμετώπιση	20-21
1.3 Η ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ-ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	22
1.3.1 Κώδικας ορθής πρακτικής εκτροφής ζώων	22-24
1.3.2 Έλεγχος της ποιότητας των ιχθυοτροφών και των συστατικών τους	24-25
1.4 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΕ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΙ ΨΑΡΙΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ.....	26
1.4.1 Σύσταση των ιχθυαλεύρων.....	26-27
1.4.2 Ιχθυηλασιμότητα των τροφίμων.....	28-30
1.4.3 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα άλευρα.....	31-32
1.4.4 Οι μύκητες στα συστατικά των ιχθυοτροφών και οι συνέπειές τους.....	32-34
1.4.5 Αφλατοξίνες ως πηγή μόλυνσης των ιχθυοτροφών.....	34-36

1.5 ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ - ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	37-38
1.5.1 Αποθήκευση των ιχθυοτροφών	38-39
1.6. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ.....	40-41
1.6.1 Μόλυνση από μυκοτοξίνες και τα συμπτώματα αφλατοξίκωσης στα ψάρια.....	42
1.6.2 Οι κίνδυνοι των μυκοτοξινών στα ψάρια και τη δημόσια υγεία.....	43-44
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	44
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
2.1 Δειγματοληψία	45
2.2 Παρασκευή υποστρωμάτων.....	45
2.2.1 Παρασκευή (Plate Count Agar) PCA	45
2.2.2 Παρασκευή DG18	45
2.2.3 Πεπτονόχο νερό (Peptone Water).....	46
2.2.4 Παρασκευή θρεπτικού υλικού P.D.A. (πατάτα).....	46
2.2.5 Παρασκευή coconut cream.....	46
2.3 Πειραματική διαδικασία.....	47
2.4 Παρασκευή κατάλληλων αραιώσεων για κάθε τροφή.....	47
2.5 Απομόνωση -Προσδιορισμός μυκήτων σε ιχθυοτροφές	48
2.6 Μικροσκοπική Παρατήρηση.....	48
2.7 Έλεγχος παραγωγής μυκοτοξινών σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα	49

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
3.1 Πειραματική διαδικασία 1 ^η	50
3.1.1 Απομόνωση και απαρίθμηση μυκήτων.....	50-51
3.1.2 Ταυτοποίηση.....	52-57
3.2 Πειραματική διαδικασία 2 ^η	58
3.2.1 Μελέτη ανάπτυξης μυκήτων.....	58-61
3.2.2 Παρατήρηση σε μικροσκόπιο 2 ^η	62-67
3.3 Αποτελέσματα - Coconut cream.....	68
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69-71
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	72
5.1 Ελληνική βιβλιογραφία	72-74
5.2 Διεθνής βιβλιογραφία.....	74-75

1. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι μυκοτοξίνες είναι μικρού μοριακού βάρους προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού μυκοτοξικογόνων μυκήτων οι οποίες παράγονται από την ανάπτυξη μυκήτων είτε στο φυτό είτε σε αποθηκευμένους καρπούς τροφές και ζωοτροφές που έχουν ως βάση τα δημητριακά και τους ελαιούχους σπόρους. Είναι παράγωγα ή συγγενείς ενώσεις με την κουμαρίνη, τα τερπενοειδή, ανθρακινόνες, μακρολίδια, στεροειδή, και τετρονικά οξέα. Οι μυκοτοξίνες είναι οι μεταβολίτες οι οποίες παράγονται καθώς ο μύκητας αναπτύσσεται παρασιτικά στον ξενιστή που έχει προσβάλει (Καλογερίας, 2010).

Οι μυκοτοξίνες προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα ζώα και τον άνθρωπο. Η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων σε κάποια τοξική ουσία (προσβολή από μικροοργανισμούς) μπορεί να οδηγήσει σε μυκοτοξίκωση (*Mycotoxycosis*), μια παθολογική κατάσταση που μπορεί να εκδηλωθεί με μια μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων όπως: αναφυλαξία, αλλεργίες κάθε είδους, πονοκέφαλοι, δυσκολία στην ομιλία, άνοια, απώλεια μνήμης, άγχος, κατάθλιψη, ταχυκαρδία, σύγχυση, καρκίνοι και θάνατο σε ακραίες περιπτώσεις. Πολλές μυκοτοξίνες είναι ικανές να προκαλέσουν διάφορες μορφές καρκίνου, ασθένειες του ήπατος, των νεφρών κ.α. Οι αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, είναι πολύ τοξικές μυκοτοξίνες που προκαλούν καρκίνο του ήπατος (Ευαγγέλου, 2014).

Η ίδια μυκοτοξίνη μπορεί να παράγεται από περισσότερους του ενός είδους μύκητες, ενώ ο ίδιος μύκητας μπορεί να παράγει περισσότερες από μία μυκοτοξίνες. Η κατανάλωση μυκοτοξινών κατά πάσα πιθανότητα προκαλείται είτε άμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων καρπών, είτε έμμεσα από την κατανάλωση ζωικών προϊόντων.

Σύμφωνα με έρευνα, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο ότι, ένα τρόφιμο που δεν είναι προσβεβλημένο από μύκητες δεν σημαίνει ότι είναι απαραίτητα απαλλαγμένο και από μυκοτοξίνες, γιατί οι μυκοτοξίνες εισχωρούν στο τρόφιμο και παραμένουν εκεί ακόμα και μετά την απομάκρυνση του μύκητα που τις παρήγαγε (Πετρωτός, 2010).

Από τα 200.000 είδη μυκήτων που είναι γνωστά σήμερα περίπου 100 είδη παράγουν τοξίνες επικίνδυνες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Σήμερα, οι μυκοτοξίνες που είναι γνωστές δεν υπερβαίνουν τις 20, εκτιμάται ότι ο αριθμός των δευτερογενών μεταβολιτών των μυκοτοξιγόνων μυκήτων είναι πάνω από 200. Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες είναι : Αφλατοξίνες, Φουμονισίνες, Ζεαραλενόνη, Τριχοθηκίνη (τοξίνη T-2), Δεοξυνιβαλενόλη, Ωχρατοξίνες, Πατουλίνη (Μαρκόγλου, 2010).

Μεγάλο ρόλο για την ανάπτυξη των μυκοτοξινών παίζει το κλίμα, συνεπώς η συγκέντρωσή τους δεν είναι χρονικά σταθερή. Έχει παρατηρηθεί ότι η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται όταν ο καρπός υφίσταται στρες από καιρικά φαινόμενα, π.χ. μακρά διάρκεια ξηρασίας ακολουθούμενη από ισχυρή βροχόπτωση, η όταν υποστεί βλάβη από πουλιά, έντομα ή ακόμα όταν υπάρχει ανταγωνισμός με άλλα βότανα. Όλες αυτές οι συνθήκες προκαλούν αδυναμία στον καρπό και δίνουν την ευκαιρία στους σπόρους του μύκητα να τον προσβάλουν. Κατόπιν έρευνας που έχει γίνει, η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται επίσης όταν η αποθήκευση των καρπών γίνεται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας (Καλογερίας, 2010).

Οι μυκοτοξίνες είναι δύσκολο να ταξινομηθούν εξαιτίας των ποικίλων χημικών δομών που τις χαρακτηρίζουν, των διαφορετικών βιοσυνθετικών μηχανισμών που ακολουθούν, των μυριάδων βιολογικών αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν, καθώς και από το ευρύ φάσμα των μυκήτων από τους οποίους προέρχονται. Οι γιατροί τις κατατάσσουν με γνώμονα το όργανο το οποίο προσβάλουν (Καλογερίας, 2010).

Έτσι, οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ηπατοτοξικές νεφροτοξικές νευροτοξικές, ανοσοτοξικές κ.τ.λ. Οι βιολόγοι τις κατατάσσουν σε γενικότερες ομάδες ικανές να προκαλέσουν τερατογένεση μετάλλαξη καρκινογένεση και αλλεργία. Οι χημικοί τις ταξινομούν με βάση τη χημική δομή τους, οι βιοχημικοί με βάση τη αποσυνθετική προέλευση τους και οι μυκητολόγοι με βάση τους μύκητες από τους οποίους προέρχονται. Η αφλατοξίνη για παράδειγμα είναι ηπατοτοξική ικανή να προκαλέσει μετάλλαξη και καρκινογένεση. Περιέχει δυο φουράνια προέρχεται από πολυκετίδιο, και παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus*. (Καλογερίας, 2010)

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, η περιγραφή μιας και μόνο μυκοτοξίνης περιλαμβάνει εκτεταμένη ορολογία δεδομένου ότι, πολλοί ερευνητές από διαφορετικές ειδικότητες παρατηρούν και εμπλουτίζουν την γνώση πάνω σε αυτές τις φυσικά απαντώμενες τοξίνες. Η ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις μυκοτοξίνες περιλαμβάνει τρεις κύριες κατευθύνσεις: την μυκητολογία, τη χημεία των μυκοτοξινών και την τοξικολογία. Η μυκητολογία περιλαμβάνει την ταξινόμηση των μυκήτων, καθώς και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που ακολουθούνται για την δημιουργία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Η χημεία των μυκοτοξινών είναι ουσιαστικά οι μέθοδοι και οι διαθέσιμες τεχνικές που υπάρχουν για την ταυτοποίηση τους. Τέλος η τοξικολογία αναφέρεται στις επιπτώσεις που έχει η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων στις μυκοτοξίνες, εφόσον οι ενώσεις αυτές μπορεί να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα από παθολογικά συμπτώματα (Καλογερίας, 2010).

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η παθογόνος φύση ορισμένων μυκήτων στα φυτά έχει παρατηρηθεί από την αρχή της γεωργίας. Οι Ρωμαίοι τιμούσαν τη θεότητα Ρόμπιγκους, για να κατευνάσουν την οργή τους προκειμένου να προστατευτούν οι καρποί και τα δέντρα. Εορτάζονταν στις 25 του Απρίλη, περίοδος όπου είναι περισσότερο πιθανό για τα σπαρτά να προσβληθούν από μύκητες. Ακόμα και στα πρώτα στάδια της γεωργίας οι αγρότες είχαν παρατηρήσει πως η κατανάλωση μουχλιασμένων δημητριακών η καρπών είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών. Αναφέρεται ότι πολλές από τις μάστιγες τις κεντρικής Ευρώπης έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση από μουχλιασμένα σιτηρά.

Αυτό έκανε τους επιστήμονες να σκεφτούν ότι πιθανόν να υπάρχουν δύσκολα ανιχνεύσιμοι μεταβολίτες που προέρχονται από μούχλα, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν ακόμα και το θάνατο. Έτσι οι επιστήμονες επινόησαν τον όρο μυκοτοξίνη για να περιγράψουν αυτήν την τοξική συμπεριφορά που παρατηρήθηκε για αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σύμφωνα με έρευνες έχουν βρεθεί συνολικά περίπου στις 300 με 400 ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως μυκοτοξίνες εκ των οποίων περίπου οι είκοσι από αυτές έχει αποδειχτεί ότι απαντώνται στις τροφές σε συχνότητα και σε επίπεδα τέτοια, ώστε να θεωρούνται απειλή για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων (Καλογερίας, 2010).

Οι μύκητες είναι οργανισμοί που δεν έχουν χλωροφύλλη. Εμφανίζονται ως απλοί μονοκύτταροι ή και πολυκύτταροι οργανισμοί, για να αναπτυχθούν τρέφονται με τα θρεπτικά συστατικά του ξενιστή που προσβάλουν. Κατά την περίοδο της ανάπτυξης τους παράγουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων, τους μεταβολίτες. Ορισμένοι από τους μεταβολίτες είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο, όπως οι μυκοτοξίνες, ενώ άλλοι είναι επικερδείς όπως τα αντιβιοτικά (Καλογερίας, 2010).

1.1.2 Κυριότερα γένη μυκήτων

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί, μη φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και ανήκουν σε ξεχωριστό Βασίλειο, το Βασίλειο των μυκήτων. Βρίσκονται παντού στη φύση. Υπάρχουν πολλές χιλιάδες είδη, ενώ πάνω από 500 έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις. Χωρίζονται σε παρασιτικούς (λοιμογόνους) και σαπροφυτικούς (μη παθογόνους). Οι μύκητες μπορεί να παράγουν αντιβιοτικά. Υπάρχουν τέλος μύκητες τοξινογόνοι των οποίων οι τοξίνες προκαλούν μεγάλες ζημιές στα ζώα αλλά ίσως και στον άνθρωπο όταν καταναλώνονται μέσω της τροφής (Γεωργακάς 2013).

Τοξίνες του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* βρίσκεται σε πολλές περιοχές του κόσμου, ιδιαίτερα σε περιοχές με τροπικό κλίμα. Περιλαμβάνει περισσότερα από εκατό γνωστά είδη μυκήτων, πολλοί από τους οποίους είναι υπαίτιοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες αυτού του γένους με τη μεγαλύτερη σημασία είναι: η αφλατοξίνη B1, η ωχρατοξίνη A, η κιτρινίνη και η πατουλίνη. Αν και έχει αποδειχτεί η καρκινογόνος δράση της αφλατοξίνης B1, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μερικά από τα είδη του γένους *Aspergillus*, έχουν και ωφέλιμες εφαρμογές, όπως η παραγωγή αφεψημάτων.

Τοξίνες του γένους *Penicillium*

Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει περίπου εκατόν πενήντα γνωστά είδη μυκήτων. Η ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1929 ήταν η αρχή για την ανακάλυψη και άλλων μεταβολιτών του γένους αυτού με αντιβιοτικές ιδιότητες. Τουλάχιστον εκατό είδη μυκήτων από το γένος *Penicillium* έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι πιο γνωστές από τις μυκοτοξίνες του γένους *Penicillium* είναι: οι ωχρατοξίνες A, B, C, η κιτρεοβριδίνη, η κιτρινίνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ, η πατουλίνη, οι ρουμπρατοξίνες A, B και το πενικιλικό οξύ (Γεωργακάς 2013).

Τοξίνες του γένους *Fusarium*

Τα είδη που παράγονται από τις τοξίνες του γένους αυτού, είναι παθογόνα των φυτών και η ανάπτυξη τους πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Μολύνουν καρπούς δημητριακών, ελαιούχους σπόρους και μπιζέλια. Το γένος *Fusarium* παράγει τις περισσότερες μυκοτοξίνες σε σχέση με τα άλλα γένη μυκήτων. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες αυτού του γένους είναι: οι φουμονισίνες, τα τριχοθεκένια, η ζεαρελενόνη, κ.α. (Γεωργακάς 2013).

Τοξίνες του γένους *Alternaria*

Το γένος αυτό βρίσκεται σε αφθονία, στην ατμόσφαιρα, στο έδαφος και στα πρωτογενή γεωργικά προϊόντα. Τα είδη του γένους αυτού, προσβάλλουν τα φυτά στις καλλιέργειες, (σιτάρι, ζαχαροκάλαμο, κριθάρι), παράλληλα μπορούν να βρεθούν σε φρούτα και λαχανικά κατά την αποθήκευσή τους σε ψυγεία. Περιλαμβάνουν τις τοξίνες: αλτερναριόλη, αλτενουένιο, τενουαζονικό οξύ και τις αλτερτοξίνες I, II.

Τοξίνες του γένους *Claviceps*

Οι τοξίνες του γένους *Claviceps* προσβάλλουν τους καρπούς των δημητριακών, σίκαλη, σιτάρι. Τα είδη του μύκητα αυτού, αντικαθιστούν τα αναπαραγωγικά όργανα, του ξενιστή με σκληρώτιο, το οποίο περιέχει τοξικά αλκαλοειδή. Η μόλυνση γίνεται κατά την περίοδο άνθησης των φυτών προσβάλλοντας κυρίως τις ωοθήκες τους, αποτρέποντας έτσι, την αναπαραγωγή τους. Το γένος περιλαμβάνει πολλά αλκαλοειδή παράγωγα του λυσεργικού οξέος, καθώς και την εργοκριπτίνη, εργοταμίνη, εργοσίνη και εργονοβίνη (Γεωργακάς 2013).

1.1.3 Κατηγορίες μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες είναι οργανικές χημικές ουσίες, αλειφατικές ή κυκλικές, απλής σχετικά δομής με σχετικά απλό αριθμό ατόμων άνθρακα και χαμηλού μοριακού βάρους με παρόμοιες μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Είναι εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, που παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται σε συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας τροφίμων. Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριούνται συνήθως σε $\mu\text{g/Kg}$ τροφής (ppb). Οι μυκοτοξίνες, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ορισμένων μυκήτων, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά τη θραύση του μυκηλίου (Πετρωτός, 2010).

Οι μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές αφενός επιφέρουν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις γεωργοκτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις και αφετέρου προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία επειδή τα ζώα που καταναλώνουν μολυσμένες με μυκοτοξίνες τροφές αφήνουν κατάλοιπα αυτών των τοξινών στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα. Οι μύκητες προσβάλλουν το φυτικό υπόστρωμα (ζωοτροφή). Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μύκητα, φυτικού υποστρώματος και περιβαλλοντικών συνθηκών. Η παρουσία μύκητα σε μια ζωοτροφή δεν συνεπάγεται αυτομάτως και την παρουσία μυκοτοξινών, καθώς η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή μυκοτοξινών είναι δυο διαφορετικές διεργασίες που ευνοούνται από διαφορετικές συνθήκες. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αφλατοξινών (είδος μυκοτοξίνης) ανευρίσκονται σε ζωοτροφές που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά.

Στον Πίνακα 1 δίνονται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα μυκοτοξινών και των ειδών των μυκήτων που τις παράγουν (Πετρωτός, 2010).

Πίνακας 1: Παραγόμενες μυκοτοξίνες από διάφορα είδη μυκήτων.

<u>Μυκοτοξίνη</u>	<u>Μύκητες</u>
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penecillium sp.</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Στεριγματοκυστίνη	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Ωχρατοξίνες	<i>Penecillium viridicatum</i> , <i>Penecillium ochraceus</i> , <i>Penecillium verrucosum</i>
Πατουλίνη	<i>Penecillium patulum</i> , <i>Penecillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>
Κιτρινίνη	<i>Penecillium citrinum</i> , <i>Penecillium viridicatum</i>
Πενικυλλικό οξύ	<i>Penecillium martensii</i> , <i>Penecillium viridicatum</i> , <i>Penecillium cyclopium</i>
Ρουμπατοξίνη	<i>Penecillium rubrum</i>
Αλκαλοειδή του ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
T-Z τοξίνη	<i>Fusarium tricinctum</i>
Τριχοθισίνες	<i>Fusarium graminearium</i> , <i>Fusarium roseum</i>

Αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες (Aflatoxins) αποτελούν μία ομάδα από τις τοξικότερες ουσίες που βρίσκονται στη φύση. Οι ισχυρότατα τοξικές και καρκινογόνες αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες (μούχλα). Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες που συνήθως απαντώνται στα τρόφιμα και εμπερικλείουν ιδιαίτερους κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Πρόκειται για μια ομάδα ετεροκυκλικών ενώσεων με συγγενείς χημικές ιδιότητες, έξι από τις οποίες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για την ασφάλεια των τροφίμων (B1, B2, G1, G2, M1 και M2). Χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα των αφλατοξινών είναι ο έντονος φθορισμός των διαλυμάτων τους, υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Από την ιδιότητα αυτή προκύπτει το γράμμα που χαρακτηρίζει τις αφλατοξίνες B και G.

Έτσι οι αφλατοξίνες B (B1, B2, B2a) χαρακτηρίζονται από έντονο κυανό (B: blue) φθορισμό, ενώ οι αφλατοξίνες G (G1, G2, G2a) από έντονο πράσινο (G: green) φθορισμό. Οι αφλατοξίνες M1 και M2 είναι μεταβολίτες των αφλατοξινών B1 και B2 (Πετρωτός, 2010).

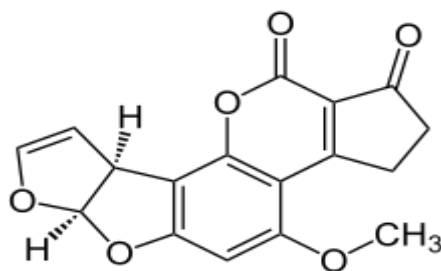
Οι αφλατοξίνες M1 και M2 απαντώνται στο γάλα γαλακτοπαραγωγών ζώων που καταναλώνουν ζωοτροφές με αφλατοξίνες B1 και B2 (καλαμπόκι κλπ.), όπου είχαν αναπτυχθεί μύκητες οι οποίες είναι και οι συνηθέστερες στα τρόφιμα. Τα ύποπτα για αφλατοξίνες τρόφιμα είναι οι ελαιούχοι καρποί, τα δημητριακά, τα φρούτα, οι χυμοί, τα αρτοσκευάσματα, το γάλα, το συκώτι, το κρέας των πουλερικών, τα αυγά και ορισμένες κατηγορίες τυριών. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξινών στα τρόφιμα είναι το στέλεχος του μύκητα, η θερμοκρασία βέλτιστη 24-25°C, η υγρασία, το PH, το υπόστρωμα, η παρουσία μυκητοστατικών και ο ανταγωνισμός μικροβίων.

Η κατανάλωση τροφίμων με αφλατοξίνες μπορεί να οδηγήσει είτε σε οξεία είτε σε χρόνια τοξίνωση. Οι αφλατοξίνες μπορούν επιπλέον να προκαλέσουν καρκίνο του ήπατος, δημιουργία οιδήματος, αιμορραγία στα έντερα και προβλήματα νευρολογικής φύσης (Πετρωτός, 2010).

Πίνακας 2: Εύρος επιτρεπτών ορίων για τις μυκοτοξίνες (Καλανταρίδης, 2005).

Μυκοτοξίνη	Επιτρεπτό όριο (µg/kg)
Αφλατοξίνη στα τρόφιμα	0-50
Αφλατοξίνη M1 στο γάλα	0-0.5
Πατουλίνη στο χυμό μήλου	20-50
Ωχρατοξίνη Α στα τρόφιμα	1-300
Ζεαραλενόνη	30-1000

Ο FAO/WHO συνιστά ως ανώτατο επιτρεπτό επίπεδο αφλατοξινών στα τρόφιμα τα 30 µg/kg τροφίμου. Ωστόσο, σε περίπτωση μόλυνσης των τροφίμων με αφλατοξίνες μπορούν να εφαρμοσθούν διαδικασίες απολύμανσης και αποτοξίνωσης που περιλαμβάνουν: 1) Φυσικές μεθόδους αδρανοποίησης, ανενεργοποίησης, απομάκρυνσης με ποικιλία μεθόδων, όπως μηχανική διαλογή, θερμική επεξεργασία, ακτινοβολία, εκχύλιση και προσρόφηση. 2) Χημικές μεθόδους αδρανοποίησης, ανενεργοποίησης, απομάκρυνσης με επεξεργασία με διθειώδες, οξέα, οξειδωτικά μέσα και αμμωνία. 3) Βιολογικές μεθόδους απομάκρυνσης με μικροβιακή ανενεργοποίηση και ζύμωση (Πετρωτός, 2010).



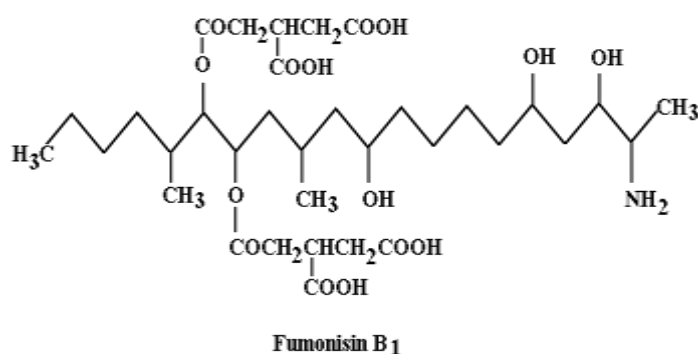
Σχήμα 1: Χημική δομή της αφλατοξίνης B₁

Η πιθανότητα ύπαρξης των υπολοίπων μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι σαφώς πιο μικρή από ότι των αφλατοξινών, χωρίς αυτό όμως να σημαίνει ότι θα πρέπει να απορρίπτεται γιατί η κατανάλωση τους μπορεί να αποβεί εξίσου επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια εφαρμογής του συστήματος HACCP το οποίο είναι υποχρεωτικό να τηρείται από τις επιχειρήσεις τροφίμων (EU 852/2004) θα πρέπει να λαμβάνει όλα τα απαιτούμενα μέτρα αποκλεισμού των μυκοτοξινών από τα τρόφιμα και να έχει πρόσβαση σε πληροφορίες για την εμφάνιση νέων μυκοτοξινών στα τρόφιμα (Πετρωτός, 2010).

Φουμονισίνες-μυκοτοξίνες *Fusarium*

Οι φουμονισίνες ανακαλύφθηκαν αρχικά και χαρακτηρίστηκαν το 1988. Παράγονται από τα *Fusarium verticillioides*, και *Fusarium proliferatum* που αναπτύσσονται κυρίως στο καλαμπόκι. Υψηλά επίπεδα εμφανίζονται σε ζεστό και ξηρό καιρό, που ακολουθείται από περιόδους υψηλής υγρασίας. Οι κύριες κατηγορίες φουμονισινών είναι B1, B2 & B3. Το μέλος της οικογένειας των φουμονισινών που απαντάται σε πληθώρα στη φύση είναι η φουμονισίνη B1, η οποία συντίθεται από τη συμπύκνωση αλανίνης με ένα άλας του οξικού οξέος (Πετρωτός, 2010).

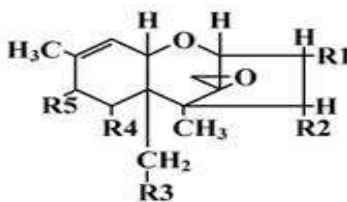
Οι Φουμονισίνες, ειδικά φουμονισίνη B1 (ΦB1), βρίσκονται στον σπόρο του καλαμποκιού που είναι ένα σημαντικό συστατικό για τις εκτροφές της υδατοκαλλιέργειας ειδικά για τα ψάρια ζεστού νερού. Είναι φυσικοί μολυσματικοί παράγοντες των σιταριών και των δημητριακών παγκοσμίως και προκαλούν σοβαρές διαταραχές στα ζώα. Οι Φουμονισίνες είναι καρκινογόνες ουσίες και μπορεί να προκαλέσουν, μείωση ρυθμού ανάπτυξης και παράλυση (Πετρωτός, 2010).



Σχήμα 2: Χημική δομή της φουμονισίνης B1

Τριχοθυκένια - Ζεαραλενόνη (ZON) / δεοξυνιβαλενόλη (DON)

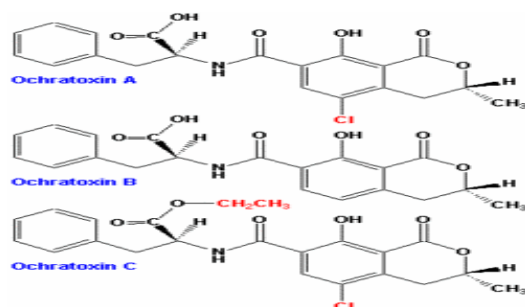
Τα Τριχοθυκένια (*Trichothecenes*) αποτελούν ένα είδος μυκοτοξινών που παράγονται από την μούχλα που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Fusarium*. Χωρίζονται σε τέσσερις τύπους όπου ο κάθε ένας χαρακτηρίζεται από ένα ιδιαίτερο γνώρισμα που σχετίζεται με την δομή. Οι τύποι Α (T2) και Β (DON, ZON, NIV) εμφανίζονται ευρύτατα σε πολλά προϊόντα σε αντίθεση με τους τύπους Γ και Δ τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη τοξικότητα αλλά εμφανίζονται πιο σπάνια στα τρόφιμα. Η Ζεαραλενόνη (ZON) όπως και η δεοξυνιβαλενόλη (DON) ανευρίσκεται συνήθως σε καρπούς δημητριακών και προκαλεί: διαταραχή της αναπαραγωγικής ικανότητας, και εμβρυική θνησιμότητα. Οι τοξίνες του γένους *Fusarium*, δεοξυνιβαλενόλη (DON) όπως και ζεαραλενόνη (ZON), που εμφανίστηκαν και οι δύο σε ιχθυοτροφές, σχεδιάστηκαν για διατροφή των κυπρίνων. Η μυκοτοξίνη δεοξυνιβαλενόλη (DON) ανήκει στη κατηγορία των Τριχοθισίνων (*Fusariums*) οι οποίες παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση και μειώνουν παραγωγή. Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα νοσήματα έχουν άμεση σύνδεση με την έκθεση του ανθρώπου σε τριχοθυκένια. Η Ζεαραλενόνη (*Zearalenone*, ZON), ανήκει στην κατηγορία των μυκοοιστρογόνων, απαντάται παγκοσμίως στους δημητριακούς καρπούς όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας κατά την αποθήκευσή τους ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Λόγω των ανησυχιών για τις επιπτώσεις στην υγεία, η παρουσία τους στα τρόφιμα έχει απαγορευθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 1985 (Πετρωτός, 2010).



Σχήμα 3: Χημική δομή των Τριχοθισίνων

Ωχρατοξίνες A, B & Γ

Υπάρχουν τρία είδη ωχρατοξινών: Η Ωχρατοξίνη A, B, και C , παράγονται από διάφορα είδη μυκητιακών στελεχών *Aspergillus* και *Pencillium* τα οποία αναπτύσσονται σε διάφορες συνθήκες και για το λόγο αυτό λέγεται ότι είναι από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες τοξίνες στις διάφορες τροφές. Οι Ωχρατοξίνες είναι σχετικά σταθερές στη θερμότητα. Τα μέλη της οικογένειας των ωχρατοξινών είναι μεταβολίτες διαφορετικών ειδών μυκήτων του γένους *Aspergillus* .Αυτοί οι μύκητες είναι πανταχού παρόντες και η πιθανότητα να μολυνθούν τα τρόφιμα και οι ζωοτροφές είναι διαδεδομένη. Η ωχρατοξίνη A (OTA) είναι μια τοξίνη που παράγεται φυσικά από διάφορα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*. Εμφανίζεται φυσιολογικά σε πολλά φυτικά προϊόντα, σε ολόκληρο τον κόσμο. Η ωχρατοξίνη A έχει επίσης ανιχνευθεί και σε προϊόντα ζωικής προέλευσης. Είναι μυκοτοξίνη που έχει καρκινογόνες, τερατογόνες, ανοσοτοξικές και ενδεχομένως νευροτοξικές ιδιότητες. Οι κίνδυνοι τοξικότητας της OTA για την ανθρώπινη υγεία έχουν αξιολογηθεί σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο από την επιστημονική Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής των τροφίμων (SCF) και τη Μικτή FAO/WHO ειδική Επιτροπή των πρόσθετων ουσιών τροφίμων (JECFA), οι οποίες έχουν καθιερώσει τα ανεκτά όρια συγκέντρωσης της OTA στα τρόφιμα(SCF, 1998 JECFA, 2001). Η ωχρατοξίνη A (OTA), είναι και η πιο συχνά απαντόμενη, αλλά και η πιο τοξική από τις τρεις.



Σχήμα 4: Χημικοί τύποι των ωχρατοξινών

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΥΝΟΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΚΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή από μέρους τους τοξινών είναι ένα αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ μύκητα, ξενιστή (φυτικό υπόστρωμα) και περιβάλλοντος. Ο κατάλληλος συνδυασμός των τριών αυτών παραγόντων καθορίζει το βαθμό προσβολής του φυτού / φυτικού προϊόντος από το μύκητα και το είδος και την ποσότητα της παραχθείσας τοξίνης. Σημειώνεται ότι η παρουσία ενός μύκητα σε ένα φυτό / φυτικό προϊόν δεν προϋποθέτει την παρουσία τοξίνης, καθότι η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή από μέρους του τοξινών ευνοούνται κάτω από διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος. Επιπρόσθετα, όταν ένα φυτικό προϊόν δεν φαίνεται να είναι προσβεβλημένο από μύκητες (απουσία μούχλας) ή όταν ο μύκητας καταστραφεί (π.χ. χρήση ψηλών θερμοκρασιών), αυτό δεν σημαίνει ότι το υλικό είναι απαλλαγμένο από μυκοτοξίνες. Οι λόγοι που οδηγούν τους μύκητες στην παραγωγή τοξινών δεν έχουν απόλυτα αποσαφηνιστεί. Σύμφωνα με τους ερευνητές οι μύκητες παράγουν τοξίνες σε συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξης τους, κάτω από συνθήκες στρες (απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία, υγρασία, αερισμό), καθώς και για να αμυνθούν έναντι άλλων μικροοργανισμών κατά τη διεκδίκηση τροφής (Μαρκόγλου, 2010).

1.2.1 Η παρουσία των διάφορων μυκοτοξινών στα διάφορα τρόφιμα και αγροτικά προϊόντα

Σε γενικές γραμμές, οι σοδειές που αποθηκεύονται για περισσότερες από μερικές μέρες γίνονται πιθανός στόχος ανάπτυξης μούχλας και σχηματισμού μυκοτοξινών. Τα βασικότερα τροφικά αγαθά που μολύνονται είναι τα δημητριακά, τα καρύδια, ο καφές, το κακάο, τα αποξηραμένα φρούτα, τα καρυκεύματα, τα αποξηραμένα μπιζέλια, τα φασόλια και φρούτα και κυρίως τα μήλα. Οι μυκοτοξίνες μπορούν επίσης να ανιχνευθούν στη μύρα και στο κρασί που αποτελούν το αποτέλεσμα της χρησιμοποίησης μολυσμένου κριθαριού, άλλων δημητριακών και σταφυλιών κατά την παραγωγή τους. Επίσης, μπορούν να εισέλθουν μέσω του κρέατος ή άλλων ζωικών προϊόντων όπως το γάλα, τα αυγά και το τυρί ως αποτέλεσμα μολυσμένων ζώων φάρμας. Συχνά είναι γενοτυπικά εξειδικευμένοι, αλλά μπορούν να παραχθούν από 1 ή περισσότερα είδη μυκήτων. Η πλειοψηφία των μυκοτοξινών, των δευτερογενών δηλαδή μεταβολιτών, συντίθενται με απλές βιοσυνθετικές αντιδράσεις μικρών μορίων. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι μεταβολίτες έχουν διαφορετικό εύρος τοξικών οξείων και χρόνιων επιδράσεων.

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εμφανιστούν στην τροφική αλυσίδα ως συνέπεια της μυκητιακής μόλυνσης, είτε με την άμεση κατανάλωση από τους ανθρώπους, είτε με τη χρησιμοποίηση ως τροφή ζωικού κεφαλαίου. Οι μυκοτοξίνες αντιστέκονται πολύ στην αποσύνθεση και στην πέψη, οπότε παραμένουν στην τροφική αλυσίδα στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ούτε οι επεξεργασίες θερμοκρασίας, όπως το μαγείρεμα και το πάγωμα, δεν καταστρέφουν τις μυκοτοξίνες (Πετρωτός, 2010).

1.2.2 Επιμόλυνση των φυτικών προϊόντων με μυκοτοξίνες

Φυτικά συστατικά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη διατροφή των ψαριών. Αυτό οφείλεται στην αύξηση των πιέσεων της οικονομικής αγοράς σύνθετων ζωοτροφών για την παραγωγή με χαμηλότερο κόστος και βιώσιμες εναλλακτικές λύσεις. Η αυξημένη εξάρτηση της διατροφής των εκτρεφόμενων ιχθύων σε τεχνητές ιχθυοτροφές που βασίζονται σε αυξημένα επίπεδα σιτηρών και δημητριακών ελοχεύει τον κίνδυνο πιθανής έκθεσης των ψαριών σε μυκοτοξίνες. Στο εμπόριο λιγότερο από το 5% των πρώτων υλών είναι ζωικής προέλευσης. Η επιμόλυνση των φυτικών προϊόντων με μυκοτοξίνες μπορεί να γίνει κατά την καλλιέργεια στο χωράφι, τη συγκομιδή, τη μεταφορά, την αποθήκευση τη διατήρηση ή την επεξεργασία τους. Οι σημαντικότεροι για την κτηνοτροφία μύκητες που παράγουν τοξίνες ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*. Τα είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* αναπτύσσονται, κυρίως όταν η υγρασία του σπόρου είναι 13-18% κάτω από θερμές 20-36 °C και υγρές (ελάχιστη σχετική υγρασία 70%) συνθήκες περιβάλλοντος. Η παραγωγή τοξινών ευνοείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 12-40 °C. Η προσβολή των σπόρων με είδη του γένους *Fusarium* και η παραγωγή τοξινών γίνεται κυρίως στο χωράφι πριν τη συγκομιδή, όταν η υγρασία του σπόρου είναι πάνω από 20-21% σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής υγρασίας. Με τη ραγδαία ανάπτυξη του διεθνούς εμπορίου, οι μυκοτοξίνες έχουν εξαπλωθεί σε παγκόσμια κλίμακα και δεν αποτελούν πλέον χαρακτηριστικό μιας μόνο γεωγραφικής περιοχής. Γενικότερα οι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη μυκοτοξικογόνων μυκήτων είναι η συγκομιδή των προϊόντων με υψηλή υγρασία. Ο κακός αερισμός σε συνδυασμό με την υψηλή σχετική υγρασία αποθήκευσης, υψηλή θερμοκρασία, σύσταση του προϊόντος και άλλες συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων (Δημητρίου, 2009).

1.2.3 Στρατηγικές ελέγχου μετά τη συγκομιδή και ελαχιστοποίηση των μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα

Οι μικροοργανισμοί είναι πανταχού παρόντες στα χερσαία οικοσυστημάτα από τα οποία διαβιβάζονται και μολύνουν τις φυτικές κοινότητες. Η ωρίμανση των σπόρων δεν αποτελεί εξαίρεση και έχει μολυνθεί από ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων, ζυμομύκητων και νηματοειδών μύκητων μέσω του αέρα, της βροχής, του εξοπλισμού και των αγρονομικών πρακτικών. Έτσι, ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες κατά τη συγκομιδή, το σιτάρι φέρει ένα ευρύ φάσμα μικροβιακών μολυντών. Η Επεξεργασία μετά τη συγκομιδή των σιτηρών αυτών και οι επικρατούσες περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι καθοριστικοί διότι η παρουσία μύκητων μπορεί να προκαλέσει επιπτώσεις στην ποιότητα των σιτηρών (Aldred, 2007).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η συγκομιδή σιτηρών και μολυσματικών μικροοργανισμών και η κακή διαχείριση μετά τη συγκομιδή μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία επιδείνωση στην διατροφική ποιότητα των σπόρων. Η μικροβιακή δράση μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες επιδράσεις στους σπόρους και απώλεια της βλάστησης και να επηρεάσει τη χρήση τους ως ζωοτροφή (Naresh & Aldred, 2007).

Πρόσφατες έρευνες των δημητριακών στην Ευρώπη, ιδιαίτερα του σιταριού και κριθαριού, έχουν δείξει ότι, η ΟΤΑ (*verrucosum*) που παράγουν οι μύκητες, κατά κύριο λόγο, απομονώνεται με μόνο την περιστασιακή παρουσία του *A. ochraceus*, ιδιαίτερα στη λεκάνη της Μεσογείου. Έτσι η μόλυνση με ωχρατοξίνη Α έχει προσδιοριστεί ως κύριο λόγο πρόβλημα της συγκομιδής στην Ευρώπη (Naresh & Aldred, 2007).

Η συγκομιδή του καλαμποκιού που πραγματοποιείται συχνά με περιεκτικότητα σε υγρασία 14-15% απαιτείται ξήρανση για να μειώσει το διαθέσιμο νερό έτσι ώστε να είναι ασφαλές για αποθήκευση, γι' αυτό οι εγκαταστάσεις ξήρανσης λειτουργούν σε πλήρη δυναμικότητα (Naresh & Aldred, 2007).

Αυτό μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα με την ευκαιρία για ανάπτυξη μυκοτοξινών και μόλυνση του αραβοσίτου, ειδικά από *Fusarium liseola* (φουμονισίνες από τον *F. verticillioides, proliferatum*), *graminearum* (τριχοθηκίνες, ζεαραλενόνη), και *Aspergillus flavus* (αφλατοξίνες). Η οικολογία και φυσιολογία της βλάστησης, της ανάπτυξης και της παραγωγής φουμονισίνης του αραβοσίτου έχει περιγραφεί λεπτομερώς πρόσφατα (Marin κ.ά., 2004. Desjardins, 2006). Ο ρόλος της παραγωγής μυκοτοξίνης, στην ανταγωνιστικότητα των μυκήτων αυτών, έχει θεωρηθεί από τον Magan και Aldred, 2007.

Για την επιλογή του αραβόσιτου, πριν από τη συγκομιδή την ώρα της φύτευσης, η πυκνότητα των φυτών και ο έλεγχος των εντόμων έχουν αντίκτυπο σχετικά με τη μόλυνση του αραβοσίτου με μυκοτοξίνες όπως και κατά την διάρκεια της ξήρανσης και αποθήκευσης. Συνολικά, οι παράγοντες πριν από τη συγκομιδή είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική πρόληψη από φουμονισίνες που εισέρχονται μέσω μολυσμένου αραβόσιτου με την μετασυλλεκτική φάση του στην διατροφική αλυσίδα (Naresh & Aldred, 2007).

Οι βασικοί παράγοντες πριν από τη συγκομιδή είναι: η ορθή επιλογή αραβοσίτου, οι κατάλληλες ημερομηνίες σποράς στην Ευρώπη που είναι κυρίως το Μάιο, η ισορροπημένη λίπανση και ο αποτελεσματικός έλεγχος των παρασίτων.

Ενώ μετά τη συγκομιδή οι βασικοί παράγοντες είναι η μείωση του χρόνου μεταξύ συγκομιδής και ξήρανσης, ο αποτελεσματικός καθαρισμός του αραβοσίτου πριν από την αποθήκευση, το αποδοτικό στέγνωμα στα 14% M.O., η αποτελεσματική υγιεινή διαχείριση και οι κατάλληλες ατμοσφαιρικές συνθήκες για την πρόληψη από μυκοτοξίνες σε αποθηκευμένα σιτηρά. Υπήρξαν μελέτες για την εξέταση της τύχης των μυκοτοξινών, ενώ εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα. Είναι σημαντικό να υπάρχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη σχετική στεγανοποίηση των διαφόρων μυκοτοξινών στα κλάσματα των δημητριακών όταν αλέθονται και χρησιμοποιούνται για διαφορετικούς σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της κατανάλωσης ανθρώπων και των ζώων κυρίως για λόγους πρόληψης. Είναι φυσικό η μόλυνση να ελαχιστοποιηθεί μόνο μετά τη συγκομιδή με την εφαρμογή των τεχνικών επεξεργασίας η οποία θα ελαχιστοποιήσει την μετέπειτα είσοδο στην αλυσίδα τροφίμων και ζωοτροφών.

Υπάρχουν ωστόσο βασικά εργαλεία διαχείρισης και ιχνηλασιμότητας που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να διευκολύνουν την αποθήκευση των εμπορευμάτων που πρέπει να διατηρούνται αποτελεσματικά με ελάχιστη απώλεια ποιότητας. Αυτά περιλαμβάνουν τακτικές μετρήσεις της υγρασίας ώστε να εξασφαλιστούν τα ασφαλή όρια. Σημαντικό κομμάτι είναι η αποτελεσματικότερη και ταχεία ξήρανση των σιτηρών και αποθήκευση χωρίς έντομα και μουνχλιασμένα υλικά. Αυτό που απαιτείται επίσης είναι, τα αποτελεσματικότερα διαγνωστικά εργαλεία τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την γρηγορότερη παρακολούθηση και την ποσοτικοποίηση μυκοτοξινών (Magan, 2006). Με συνδυασμό των δεδομένων είναι εφικτό να επιτευχθεί ο στόχος της ανάπτυξης, για αποτελεσματική διατήρηση των σιτηρών μετά τη συγκομιδή τα οποία εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα των ανθρώπων και των ζώων (Naresh & Aldred, 2007).

1.2.4 Πρόληψη προσβολής από μυκοτοξίνες

Για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων που προκύπτουν από τις μυκοτοξίνες η πρόληψη είναι η προτιμότερη μέθοδος απαλλαγής. Μερικές πρακτικές που φαίνεται να περιορίζουν την προσβολή των φυτικών προϊόντων από μύκητες στους χώρους αποθήκευσης είναι οι εξής: χρήση καλής ποιότητας σπόρου, εναλλαγή καλλιεργειών, κατάλληλη άρδευση της φυτείας σε περιόδους θερμού και ξηρού καιρού ώστε να μην καταπονούνται τα φυτά, βιολογική καταπολέμηση με συγγενείς μύκητες που δεν παράγουν τοξίνες, γρήγορη και κατάλληλη αποξήρανση των σπόρων, ώστε να μειωθεί το ποσοστό υγρασίας τους σε ασφαλή επίπεδα (12-13% για δημητριακούς), κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης όπως ο καθαρός εξοπλισμός (ταΐστρες-σιλό κλπ), καθαροί και κλειστοί χώροι αποθήκευσης ώστε να αποτρέπουν την είσοδο βροχής και εντόμων, διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας & υγρασίας, συστηματικός οπτικός έλεγχος για παρουσία μούχλας και διεξαγωγή χημικών αναλύσεων για μυκοτοξίνες.

1.2.5 Αντιμετώπιση

Πολλές από τις φυσικές, χημικές και βιολογικές μεθόδους είναι αποτελεσματικές στη μείωση, καταστροφή ή εξουδετέρωση των διαφόρων μυκοτοξινών. Οι διατροφικές προσεγγίσεις, όπως η συμπλήρωση των θρεπτικών συστατικών ή πρόσθετων με προστατευτικές ιδιότητες κατά των μυκοτοξινών και η προσθήκη μη θρεπτικών ουσιών με ιδιότητες μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας των μυκοτοξινών μπορούν πραγματικά να αποτοξικοποιήσουν τα προσβληθέντα υλικά. Η ανίχνευση των μυκοτοξινών γίνεται συνήθως με: α) Χρωματογραφικές μεθόδους, β) UV/αφλατοξίνη, γ) Χημική ανίχνευση για συγκεκριμένη μυκοτοξίνη Φασματομετρία, δ) Ανοσοδοκιμές τοξινών – Αντισώματα.

Οι πιο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούν ανιχνευτές UV ή φθορισμού, οι οποίες βασίζονται στην παρουσία μιας χρωμοφόρου ομάδας στα μόρια. Ορισμένες τοξίνες φθορίζουν (π.χ. ωχρατοξίνη Α, κιτρινίνη, αφλατοξίνη), και μπορούν να ανιχνευτούν άμεσα με ανιχνευτή φθορισμού HPLC - FD (Valenta et al., 1998), όμως υπάρχουν και άλλες που δεν μπορούν. Τέτοιες είναι οι φουμονισίνες που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*, στερούνται κατάλληλης χρωμοφόρου ομάδας και ο προσδιορισμός τους απαιτεί παραγωγοποίηση (EMAN, 2003, Shephard, 1998).

Η χρήση διατροφικών μη θρεπτικών συμπληρωμάτων, που έχουν ιδιότητες απομάκρυνσης των μυκοτοξινών είναι η πιο πρακτικά εφαρμόσιμη μέθοδος που έχει ερευνηθεί ενδελεχώς και μειώνει την επίδραση της έκθεσης σε μυκοτοξίνες. Μια αποτελεσματική απομονωτική ουσία είναι αυτή που αποτρέπει ή ελαχιστοποιεί την απορρόφηση της τοξίνης. Η ιδανική απομονωτική ουσία πρέπει να είναι αποτελεσματική σε διάφορες μυκοτοξίνες. Για να παραμείνουν πρακτικά εφαρμόσιμες οι ουσίες απομόνωσης των μυκοτοξινών πρέπει να έχουν λογικές τιμές και να μην καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος. Η χρήση των μη θρεπτικών ουσιών απομάκρυνσης πρέπει να μειώνει την τοξικολογική επίδραση της μυκοτοξίνης και τη δυνατότητα μεταφοράς της τοξίνης στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Οι κύριες κατηγορίες απομονωτικών ουσιών είναι τα πυριτικά ορυκτά, ο ενεργοποιημένος άνθρακας, οι πολυμερείς ενώσεις, προϊόντα χλωροφύλλης και προϊόντα που προέρχονται από τη ζύμη. Οι στόχοι για την σωστή αντιμετώπιση τους είναι : α)Οι μελέτες οικολογίας/επιδημιολογίας των μυκήτων. β)Η Εφαρμογή κατάλληλων προσυλλεκτικών και μετασυλλεκτικών χειρισμών. γ)Και να αποθηκευτούν σε ξηρό περιβάλλον και χαμηλή θερμοκρασία, ή σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες-μειωμένη συγκέντρωση O₂, εφαρμογή O₃.

1.3 Η ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ-ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ο απώτερος στόχος του παρασκευαστή ιχθυοτροφών και υδατοκαλλιεργητή είναι να διασφαλίσουν ότι οι ιχθυοτροφές ή τα τρόφιμα που παράγονται είναι ασφαλή και υγιεινά. Αναφέρθηκαν κίνδυνοι για την ασφάλεια των τροφίμων, οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με τη χρήση των εμπορικών ζωοτροφών, συμπεριλαμβανομένων τις τροφές υδατοκαλλιέργειας. Οι κύριες προσμείξεις ζωοτροφών που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα έχουν συμπεριλάβει *Salmonellae*, μυκοτοξίνες, τα υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων, οργανικούς ρύπους, γεωργικές και άλλες χημικές ουσίες, βαρέα μέταλλα και περίσσεια ανόργανων αλάτων. Εκτός από τις άμεσες αρνητικές επιπτώσεις αυτών των πιθανών προσμείξεων στην υγεία των καλλιεργούμενων ειδών, υπάρχει ένας κίνδυνος ότι οι μολυντές τροφοδοσίας μπορεί να περάσουν κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας, μέσω μολυσμένων προϊόντων υδατοκαλλιέργειας, στους καταναλωτές (Tacon and Metian 2008).

1.3.1 Κώδικας ορθής πρακτικής εκτροφής ζώων

Προκειμένου να καθορίσει τον τρόπο για την καλύτερη αντιμετώπιση των προβλημάτων για τα συστατικά των μολυσμένων ζωοτροφών ο FAO οργάνωσε διαβούλευση εμπειρογνομόνων για τη διατροφή των ζώων και την ασφάλεια των τροφίμων στη Ρώμη το Μάρτιο του 1997. Στη διαβούλευση αυτή παράγεται το πρώτο σχέδιο κώδικα πρακτικής για την ορθή διατροφή των Ζώων (FAO).

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε το 23ο συνέδριο της επιτροπής του Codex Alimentarius (Ιούλιος 1999) για να αντιμετωπιστούν όλα τα ζητήματα που αφορούν τη διατροφή των ζώων. Ο κύριος λόγος της ομάδας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και υιοθέτηση ενός κώδικα πρακτικής για την ασφάλεια των ζώων. Ο κώδικας θεσπίζει ένα σύστημα ασφάλειας των ζωοτροφών για παραγωγή τροφίμων που καλύπτει ολόκληρη την τροφική αλυσίδα, λαμβάνοντας υπόψη τις σχετικές πτυχές της υγείας των ζώων και του περιβάλλοντος προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι για την υγεία των καταναλωτών. Ο στόχος του κώδικα είναι να βοηθήσει και να εξασφαλίσει την ασφάλεια των τροφίμων για ανθρώπινη κατανάλωση μέσω της τήρησης καλής διατροφής των ζώων, με ορθές πρακτικές σε επίπεδο γεωργικής εκμετάλλευσης και τις πρακτικές κατά τη διάρκεια της προμήθειας, αποθήκευσης, επεξεργασίας, διανομής των ζωοτροφών και των συστατικών τους για τα ζώα. Ο Κώδικας ισχύει για τη παραγωγή και χρήση όλων των υλικών που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων και τα συστατικά των ζωοτροφών σε όλα τα επίπεδα, είτε αν παράγονται βιομηχανικώς ή για ένα αγρόκτημα. Περιλαμβάνει επίσης την διατροφή ψαριών σε υδατοκαλλιέργεια. Στη συγκεκριμένη περίπτωση της υδατοκαλλιέργειας, ο κώδικας πρακτικής για καλή εκτροφή των ψαριών σημειώνει ένα ευρύ φάσμα καλλιεργούμενων υδρόβιων ειδών με στρατηγικές διατροφής εντός της υδατοκαλλιέργειας. Προκύπτει, συνεπώς, ότι για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων, οι απαραίτητες προφυλάξεις πρέπει να ληφθούν όσον αφορά τις μεθόδους καλλιέργειας, τις τοποθεσίες καλλιέργειας, τα υλικά και συστατικά των ιχθυοτροφών που χρησιμοποιούνται για να ελαχιστοποιηθεί η μόλυνση προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος για τα τρόφιμα. Η Codex ξεκίνησε διαδικασία ανάπτυξης ενός ξεχωριστού κώδικα πρακτικής για τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα που ήταν αναγκαίος για τους παραγωγούς της υδατοκαλλιέργειας.

Ο Κώδικας Πρακτικής για την ορθή εκτροφή των ζώων, παρέχει τις ακόλουθες πρόσθετες τεχνικές: Τα αποθέματα ζωοτροφών πρέπει να αγοραστούν φρέσκα και να χρησιμοποιηθούν πριν από τη λήξη της διάρκειας ζωής τους. Οι ξηρές τροφές των ψαριών πρέπει να αποθηκεύονται σε δροσερές και ξηρές περιοχές για να αποτραπεί η αλλοίωση, η ανάπτυξη μούχλας και μόλυνσης. Η υγρή τροφή θα πρέπει να ψυχθεί σωστά σύμφωνα με τις κατασκευαστικές οδηγίες. Οι ζωοτροφές δεν πρέπει να περιέχουν μη ασφαλή επίπεδα μικροβιακών τοξινών κ.α. Τα συστατικά των ζωοτροφών θα πρέπει να φέρουν την κατάλληλη σήμανση και θα πρέπει να είναι πλήρη αποδεκτά, και κατά περίπτωση, υποχρεωτικά απαλλαγμένα από μυκοτοξίνες, και άλλες ρυπαντικές ουσίες που μπορεί να οδηγήσουν σε κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου.

Τα φρέσκα ή κατεψυγμένα ψάρια θα πρέπει να είναι σε μια ικανοποιητική κατάσταση αν χρησιμοποιηθούν, πρέπει να είναι κατάλληλα μαγειρεμένα ή επεξεργασμένα για την εξάλειψη των πιθανών κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία. Οι ιχθυοτροφές, θα πρέπει να περιέχουν μόνο πρόσθετες ουσίες που επιτρέπονται για τα ψάρια από τον επίσημο οργανισμό (Tacon and Metian, 2008).

1.3.2 Έλεγχος της ποιότητας των ιχθυοτροφών και των συστατικών τους

Σχετικά με την επιλογή και τη χρήση των ιχθυοτροφών και των συστατικών τους οι κατευθυντήριες γραμμές καλύπτουν ένα φάσμα θεμάτων, που εκτείνεται από το συστατικό στην αγορά, την επεξεργασία, την αποθήκευση, το χειρισμό, παρακολούθηση και τεκμηρίωση θεμάτων όπως η κατάρτιση των εργαζομένων και η ασφαλή παράδοση των τελικών προϊόντων. Λόγω της σημασίας του θέματος επισημάνουμε εδώ τις σχετικές αρμοδιότητες όπως η επιλογή και αγορά των κατάλληλων πρώτων υλών και συμπεριλαμβανομένων του ελέγχου της ποιότητας των συστατικών.

Η ποιότητα των ιχθυοτροφών ξεκινά με την ποιότητα των συστατικών και είναι ευθύνη του κατασκευαστή να επιβεβαιώσει ότι τα συστατικά που χρησιμοποιούνται στο εσωτερικό των τροφών είναι υγιεινά και ασφαλή. Οι έμποροι των βασικών προϊόντων, και οι εταιρείες από τις οποίες προμηθεύονται τα συστατικά των ιχθυοτροφών, θα πρέπει να γνωρίζουν με τις προδιαγραφές τους τι ακριβώς είναι κατάλληλο για αγορά. Επίσης, είναι καθολικά αντιληπτό ότι η ποιότητα των συστατικών ποικίλει, ακόμα και από τον ίδιο το προμηθευτή από παρτίδα σε παρτίδα ή και από μήνα σε μήνα, και γι' αυτό είναι σημαντικό ότι πρέπει να παρακολουθείται αυτή η μεταβλητότητα. Εκτός από τα θρεπτικά και άλλα χαρακτηριστικά των τροφών, οι προδιαγραφές θα έπρεπε να περιλαμβάνουν την προέλευση και τις πηγές, οποιεσδήποτε λεπτομέρειες όπως προεπεξεργασία, κινδύνους ή περιορισμούς συμπεριλαμβανομένων και τη περιεκτικότητα σε υγρασία αλλά και τους πιθανούς ρυπαντές. Τα συστατικά θα πρέπει να επανεξετάζονται ετησίως ή όπως απαιτείται για να εξασφαλιστεί η χρήση. Η εταιρεία παρασκευής ιχθυοτροφών θα πρέπει να είναι σύμφωνη με όλους τους ισχύοντες εθνικούς και κοινοτικούς κανονισμούς. Τα πιστοποιητικά αναλύσεων των ιχθυοτροφών θα πρέπει να ζητούνται περιοδικά. Επίσης, όταν αγοράζονται υλικά από ένα νέο προμηθευτή θα πρέπει να τηρούνται τα παρακάτω βήματα όπως να εκτελούν επί τόπου επιθεώρηση στις εγκαταστάσεις του προμηθευτή, να επανεξετάζουν τα πρότυπα των προσδοκιών (καθαρές πρώτες ύλες), πιστοποιητικά προμηθευτή, εργαστηριακά δεδομένα για τα συστατικά που πρέπει να αγοραστούν, αλλά και αίτηση επανεξέτασης ποιότητας. Ο ποιοτικός έλεγχος πρέπει να εξασφαλίζει ότι η ιχθυοτροφή που παράγεται θα είναι σταθερά ποιοτική ανάλογα με τα είδη που τρέφονται. Η διαδικασία θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα ολοκληρωμένο σύστημα τήρησης αρχείων ότι τα κατάλληλα πρότυπα τηρούνται καθ' όλη τη περίοδο κατασκευής.

1.4 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΕ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΙ ΨΑΡΙΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ

Η ασφάλεια των τροφίμων, ως παγκόσμιο αίτημα, φαίνεται να παίρνει ιδιαίτερα μεγάλη δημοσιότητα και να απασχολεί την κοινή γνώμη κυρίως κατά το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Κάποια προβλήματα που προκύπτουν από την κατανάλωση μυκοτοξινών είναι οξεία (άμεσα), ενώ άλλα είναι χρόνια (μακροπρόθεσμα).

Συγκεκριμένα αν τα ψάρια καταναλώσουν ιχθυοτροφές μολυσμένες με μυκοτοξίνες μπορεί να υποφέρουν από μια ποικιλία προβλημάτων. Οι τοξικολογικές επιδράσεις των μυκοτοξινών σε ψάρια εξαρτώνται από τον τύπο της μυκοτοξίνης και τη σχέση μεταξύ της δόσης και της έκθεσης στην οποία τα ψάρια υποβάλλονται (Peron *et al.*, 2010). Για τις μυκοτοξίνες σε ψάρια εκτροφής πρέπει να ληφθούν αναγκαίες δράσεις προκειμένου να μειωθούν οι επιπτώσεις τους.

1.4.1 Σύσταση των ιχθυαλεύρων

Στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, τα ιχθυάλευρα χρησιμοποιούνται κατά ευρέως στη διατροφή όλως των σαρκοφάγων εκτρεφόμενων ψαριών (Tacon, 2005), ενώ χρησιμοποιούνται και στη διατροφή φυτοφάγων ψαριών όπως είναι τα κυπρινοειδή, τα οποία αντιπροσωπεύουν μεγάλο μέρος της παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών (Peron *et al.*, 2010).

Η σύσταση των ιχθυαλεύρων ποικίλει ανάλογα με το είδος των ιχθύων και το είδος των υπολειμμάτων του, τα οποία χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Τα κυριότερα ιχθυάλευρα που κυκλοφορούν στην αγορά είναι τα ακόλουθα:

- Ρεγγάλευρο από το είδος *Clupea harengus*, που αλιεύεται στο Β. Ατλαντικό,
- Αντσουγιάλευρο από το είδος *Engraulis ringens*, που αλιεύεται κυρίως στο Περού και την Χιλή,
- Σαρδελλάλευρο από είδη του γένους *Clupea sp.* καθώς και του γένους *Sardinops sp.* τα οποία αλιεύονται κυρίως στις τροπικές και υποτροπικές θάλασσες,
- Σκουμπράλευρο από τα είδη του γένους *Scomber* και του γένους *Trachurus* τα οποία αλιεύονται στην Αγκόλα και τη Ν. Αφρική.

Τα περισσότερα είδη ιχθύων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ιχθυαλεύρων ανήκουν στην κατηγορία των μικρών πελαγικών. Τα τελευταία χρόνια όμως σύμφωνα με τα στοιχεία του Διεθνούς Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων (FAO), από τα οποία προκύπτει ότι οι εκφορτώσεις μικρών πελαγικών ιχθύων σε μερικές χώρες δεν δικαιολογούν τη μεγάλη παραγωγή τους σε ιχθυάλευρα, προκύπτει ότι για την παρασκευή ιχθυαλεύρων, χρησιμοποιούνται εκτός από τα μικρά πελαγικά, και άλλα είδη ιχθύων και μάλιστα εμπορικά ή και μη εμπορικά, δηλαδή απορριπτόμενα (Peron *et al.*, 2010). Όμως εκτός από τα αυτούσια αλιεύματα, στην παραγωγή ιχθυαλεύρων χρησιμοποιούνται και υποπροϊόντα της μεταποίησης διαφόρων ειδών ψαριών, που προορίζονται για κατανάλωση.

1.4.2 Ιχνηλασιμότητα των τροφίμων

Ο βασικός ορισμός της ιχνηλασιμότητας, ορίστηκε την 28η Ιανουαρίου το 2002 στον Κανονισμό 178/2002 της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.). Όπως αναφέρεται στο άρθρο 3 του Κανονισμού, ιχνηλασιμότητα είναι η ικανότητα ανάχνευσης και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών, παραγωγικών ζώων και ουσιών που προορίζονται να αποτελούν τρόφιμα ή να εισάγονται στα τρόφιμα σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής. Για λόγους δημόσιας υγείας, θα πρέπει τα προϊόντα, τόσο στο εγχώριο όσο και στο διεθνές εμπόριο, να είναι ασφαλή, υγιεινά και να φέρουν την κατάλληλη σήμανση. Με την σύμπραξη της ομοσπονδίας τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών (FD&C), έκθεσης περί συσκευασίας και τυποποίησης (FPLA) και της Δημόσιας υπηρεσίας υγείας (PHS), δημιουργήθηκε η υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) η οποία πραγματοποιεί προγράμματα επιθεώρησης, δειγματοληψίας, ανάλυσης και έρευνας. Τα προγράμματα αυτά βοηθούν τον οργανισμό στην επίβλεψη της ασφάλειας των τροφίμων και της οικονομικής απάτης. Η ανάχνευση λοιπόν ενός προϊόντος το οποίο έχει αντικαταστήσει το αυθεντικό αναγραφόμενο, είναι σημαντική για την υγεία του καταναλωτή, αλλά και για οικονομικούς λόγους. Μια μορφή νοθείας που έχουν να αντιμετωπίσουν τόσο οι καταναλωτές όσο και οι αρμόδιες αρχές, είναι η αντικατάσταση ενός ακριβού είδους ή ενός είδους που έχει ελεγχθεί και δεν φέρει δυνητικό κίνδυνο για τους καταναλωτές, με ένα είδος χαμηλότερου κόστους ή με ένα είδος επικίνδυνο, αντίστοιχα. Τέτοιου είδους νοθεία αντικατάστασης με λανθασμένη σήμανση ή χωρίς σήμανση, αποτελεί παραβίαση της νομοθεσίας περί ασφάλειας τροφίμων (*Fda.Gov*).

Οι μυκοτοξίνες αναγνωρίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας των μελετών HACCP ως πιθανός κίνδυνος. Αποτελούν πιθανό κίνδυνο που σχετίζεται με τρόφιμα φυτικής προέλευσης, κυρίως στους ξηρούς καρπούς και φρούτα (καλαμπόκι, σιτηρά, φυστίκια, μπανάνα, μήλο, σταφίδες, κτλ). Οι μυκοτοξίνες απαντώνται όμως και σε ζωικής προέλευσης τρόφιμα όπως το γάλα, τα αυγά, το συκώτι και άλλα, γεγονός που οφείλεται στην κατανάλωση μολυσμένων ζωοτροφών από τα ζώα. Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών από τους μύκητες είναι: θερμοκρασία (7,5 - 40°C), υγρασία (>80% σχετική υγρασία), φως (μεγαλύτερη παραγωγή σε απουσία φωτός), pH (ιδανικό 4–4,6), υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα φυτικής προέλευσης), παρουσία μυκοστατικών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, θεοφυλλίνη, κ.ά.). Τα ασφαλή όρια πρόσληψης μυκοτοξινών από τον άνθρωπο δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη πλήρως, παρ' όλα αυτά υπάρχουν όρια στις σχετικές νομοθεσίες για κάποιες μυκοτοξίνες σε κάποια τρόφιμα. (αφλατοξίνες στο γάλα, ζεαραλεόνη στα σιτηρά, κ.ά.). Στον παγκόσμιο επιδημιολογικό χάρτη έχουν καταγραφεί νοσήματα που αποδίδονται στην κατανάλωση τροφίμων με παρουσία μυκοτοξινών. Μια τέτοια περίπτωση είναι η ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων, για την οποία ενοχοποιείται η λήψη ωχρατοξίνης Α. Όσον αφορά στις ζωοτροφές, όπως προαναφέρθηκε, μετά την εξάπλωση της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας, απαγορεύτηκε η χρήση υποπροϊόντων επεξεργασίας ζωικών προϊόντων στα σιτηρέσια όλων των παραγωγικών ζώων (EC, 2000 EC, 2001), με εξαίρεση των εκτρεφόμενων ψαριών, όπου η χρήση τους επανεπιτράπηκε πρόσφατα.

Η μόνη μορφή πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης που επιτρέπεται, στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων χήρων και πουλερικών, εξαιρουμένων των ψαριών, είναι αυτής των ιχθυαλεύρων, ενώ απαγορεύεται η χρήση ιχθυάλευρου στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών. Υπάρχει λοιπόν άμεση ανάγκη για τον έλεγχο της νοθείας στις ζωοτροφές. Το 2003, η Ευρωπαϊκή Ένωση, θέσπισε την κλασική **οπτική μικροσκοπία** (126/2003/EU) ως την επίσημη μέθοδο ελέγχου της σύστασης των ζωοτροφών. Με την μέθοδο αυτή, ανιχνεύονται τεμάχια οστών, φτερά, φυτά και άλλα υλικά. Ο πιο ανθεκτικός ιστός που εντοπίζεται στις ζωοτροφές είναι τα οστά τα οποία σε σχέση με τους μαλακούς ιστούς, αντέχουν στις συνθήκες αποστείρωσης που έχει θεσπίσει η Ε.Ε. και που εφαρμόζονται σε όλες τις βιομηχανίες παρασκευής ζωοτροφών. Οι συνθήκες αυτές είναι 133°C και 3bars για 20 λεπτά (EC 2002). Μεταξύ των μειονεκτημάτων της μεθόδου είναι υποκειμενικότητα του ελεγκτή και η αδυναμία ταυτοποίησης των ειδών που συμμετέχουν στη σύσταση. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου οι οποίες έδειξαν ότι τα ποσοστά λανθασμένων αποτελεσμάτων, διέφεραν σημαντικά μεταξύ εργαστηρίων αλλά ακόμη και για το ίδιο εργαστήριο σε βάθος χρόνου (Veys *et al.*, 2007, Van Raamsdonk *et al.*, 2008). Εκτός από την επίσημη μέθοδο της μικροσκοπίας, έχουν προταθεί και εναλλακτικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών στις ζωοτροφές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) η υγρή χρωματογραφία (HPLC), η υπέρυθρη φασματοσκοπία (NIRS) και το υπέρυθρο μικροσκόπιο (NIRM), οι οποίες εξετάστηκαν ερευνητικά για την αξιοπιστία χρήσης τους (Murray *et al.*, 2001, Piraux & Dardenne, 2000). Από την Ευρωπαϊκή Ένωση, δεν πέρασε καμία πρόταση για την εφαρμογή αυτών των μεθόδων σε επίσημες εξετάσεις, ενώ μέχρι και σήμερα εξακολουθεί η επίσημη μέθοδος να είναι η απλή μικροσκοπία.

1.4.3 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα άλευρα

Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι είναι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, βακτήρια ή τοξίνες και μύκητες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στη δημόσια υγεία. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να υπάρχουν στις πρώτες ύλες και να περάσουν ή να αναπτυχθούν στο προϊόν.

Οι μύκητες δημιουργούν τα κυριότερα προβλήματα στα άλευρα. Μπορούν να χωρισθούν στους μύκητες που αναπτύσσονται κατά την καλλιέργεια και στους μύκητες που αναπτύσσονται κατά την αποθήκευσή τους. Προκαλούν αλλαγή χρώματος, παραγωγή μυκοτοξινών και ειδικών λιπασών που υδρολύουν τα λιπίδια των αλεύρων. Επιπλέον, λόγω της μεταβολικής τους δραστηριότητας προκαλούν και αύξηση της θερμοκρασίας της μάζας των αλεύρων. Σε γενικές γραμμές τα άλευρα είναι ασφαλή όταν αποθηκεύονται με ποσοστό υγρασίας 12-14%. Μια ποικιλία μυκήτων, οι οποίοι απαντούν συχνά στο έδαφος, μπορεί να παράγει διάφορες μυκοτοξίνες όπως αφλατοξίνες, οι τοξίνες δεσοξυνιβαλενόλη, ζεαραλενόνη στα άλευρα κατά την αποθήκευσή τους. Παρότι δεν είναι προς το παρόν εφικτή η πλήρης εξάλειψη των προϊόντων που έχουν επιμολυνθεί με μυκοτοξίνες, επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση της παρουσίας των εν λόγω τοξινών με την εφαρμογή ορθών πρακτικών αποθήκευσης. Για τα άλευρα που συσκευάζονται σε σάκους, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι τελευταίοι είναι καθαροί, στεγνοί και ότι στοιβάζονται σε παλέτες ή ότι μεταξύ των σάκων και του δαπέδου μεσολαβεί ένα αδιάβροχο επίπεδο. Όπου αυτό είναι δυνατόν, τα άλευρα πρέπει να αερίζονται με την κυκλοφορία του αέρα στο χώρο αποθήκευσης, έτσι ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σε κατάλληλα και ομοιόμορφα επίπεδα στο σύνολο του χώρου αποθήκευσης.

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, πρέπει να ελέγχονται σε τακτά διαστήματα η περιεκτικότητα σε υγρασία και η θερμοκρασία στα αποθηκευμένα αλεύρα. Η ύπαρξη οσμής μπορεί να συνεπάγεται θέρμανση του αλεύρου, ιδίως εάν η αποθήκη είναι κλειστή. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης πρέπει να μετράται η θερμοκρασία του αποθηκευμένου καρπού σε διάφορα προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να συνεπάγεται ανάπτυξη μικροβίων ή / και προσβολή εντόμων. Τα εμφανώς μολυσμένα τμήματα των αλεύρων πρέπει να ξεχωρίζονται και να αποστέλλονται δείγματα προς ανάλυση. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ορθές διαδικασίες διαχείρισης για να ελαχιστοποιείται η παρουσία εντόμων και μυκήτων στις εγκαταστάσεις αποθήκευσης. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν τη χρήση κατάλληλων καταχωρισμένων εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων ή κατάλληλων εναλλακτικών μεθόδων.

1.4.4 Οι μύκητες στα συστατικά των ιχθυοτροφών και οι συνέπειές τους

Η εισαγωγή των μυκοτοξινών από μύκητες του γένους *Fusarium* λαμβάνει χώρα από τα μολυσμένα μέρη των δημητριακών, και στη συνέχεια οι ουσίες αυτές μπορούν να μεταφερθούν στο υδάτινο περιβάλλον.

Εμπορικές ζωοτροφές για την υδατοκαλλιέργεια συχνά περιέχουν υψηλές ποσότητες ιχθυάλευρων, αν και στην υδατοκαλλιέργεια μειώθηκε το ποσοστό χορήγησης των ιχθυάλευρων στο σιτηρέσιο σε παγκόσμιο επίπεδο και επίσης η μείωση των φυσικών ιχθυοαποθεμάτων, από τα οποία παράγονται ιχθυάλευρα, οδήγησε στην ανάγκη για εναλλακτικές πρωτεΐνες για να αντικαταστήσουν τα ιχθυάλευρα σε αυτές τις ζωοτροφές.

Έτσι, σιτηρά που χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την παραγωγή ιχθυοτροφών ρυπαίνουν με DON τα συστατικά των τελικών ζωοτροφών (πολύ διαδεδομένη στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική). Ωστόσο, δεν έχει μέχρι τώρα αποδειχθεί αν DON και ZEN βρίσκονται σε προσμείξεις στα συστατικά ιχθυοτροφών όπως στο σιτάρι και λιγότερο συχνά στο καλαμπόκι και κριθάρι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ιχθυοτροφών που μπορεί να περιέχουν μυκοτοξίνες σε σχετικές συγκεντρώσεις.

Ειδικά το σιτάρι, ως συστατικό με οφέλη, χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή ιχθυοτροφών. Επιπλέον, τα δημητριακά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματική τροφή σε καλλιέργεια των ψαριών όπως ο κυπρίνος. Η ανεπιθύμητη εισαγωγή των μυκοτοξινών στα δημητριακά που μεταδίδονται σε ιχθυοτροφές οδηγεί μέχρι στιγμής σε αρνητικές συνέπειες. Ακόμα η εμφάνιση των τοξινών *Fusarium* στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας παραμένει εν πολλοίς άγνωστη και απαιτεί έρευνα (Desjardins 2006).

Η παρουσία της μυκοτοξίνης (*Fusarium*), οι τριχοθισίνες (δεσοξυνιβαλενόλη (DON) και τοξίνες T-2), φουμονισίνες (FUM) και η ζεαραλενόνη (ZEA) σε μολυσμένες ιχθυοτροφές μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι τριχοθισίνες προκαλούν μειωμένη πρόσληψη τροφής και ρυθμούς ανάπτυξης, μείωση της απόδοσης και δυσλειτουργία των οργάνων. Οι φουμονισίνες μπορεί να προκαλέσουν μείωση της ανάπτυξης και αύξηση γλυκογόνου στο ήπαρ (Desjardins 2006).

Η ιριδιζουσα πέστροφα είναι επίσης πολύ ευαίσθητη σε DON και φυσικά σε μολυσμένους σπόρους. Οι φουμονισίνες βρέθηκαν σε σιτάρι καλαμποκιού, το οποίο είναι ένα σημαντικό συστατικό σε ιχθυοτροφές της υδατοκαλλιέργειας. Η τοξικότητα της φουμονισίνης διαταράσσει το μεταβολισμό (Desjardins 2006).

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες και ανασκοπήσεις βιβλιογραφίας έχουν δείξει ότι διάφορα είδη ζωοτροφών είναι μολυσμένα με διαφορετικές τοξίνες, όσο για τα στελέχη *Aspergillus flavus* και *Penicillium citrinum* βρίσκονται σε διάφορους κόκκους, όπως συζητείται σε αρκετές μελέτες (Berghofer et al 2003, Riba et al 2008, 2010 Roige et al. 2009). Οι *A. flavus* καθώς και *A. nomius* (Brasel 2001) είναι αφλατοξίνες (AFLS) παραγωγοί που παρατηρούνται συχνά σε τροπικό και υποτροπικό κλίμα.

Με τη σειρά της, η *citrinin* (CTR), η οποία επίσης παράγεται από άλλους νηματοειδείς μύκητες του *Aspergillus*, *Penicillium* και *Monascus*. Η παρουσία και των δύο προαναφερθέντων μυκοτοξινών μπορεί να είναι σε ευρεία ποικιλία σημαντικών βασικών γεωργικών προϊόντων (Cole 1986 Blancet al. 1995).

1.4.5 Αφλατοξίνες ως πηγή μόλυνσης των ιχθυοτροφών

Τα προϊόντα ψαριών αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για κατανάλωση από τον άνθρωπο, όπου η αυξανόμενη ζήτηση έχει οδηγήσει σε ταχεία ανάπτυξη της παγκόσμιας και ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας. Παρ' όλα αυτά, η ποιότητα των αλιευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για εκτροφή ιχθύων έχει γίνει ένας περιοριστικός παράγοντας: τα συστήματα παραγωγής εντείνουν τη ζήτηση για ιχθυοτροφές, έτσι η διατροφή ιχθυοκαλλιέργειας έχει γίνει όλο και πιο απαραίτητη.

Επί του παρόντος, οι εμπορικές ιχθυοτροφές περιλαμβάνουν το καλαμπόκι ως κύριο συστατικό, ενώ τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια αποτελούν τη κύρια πηγή των διατροφικών πρωτεϊνών και των λιπιδίων για την εντατική παραγωγή των σαρκοφάγων ειδών και τη καλλιέργεια γαρίδας. Τα ιχθυάλευρα είναι παρασκευασμένα από ολόκληρα ψάρια, όπως ο γαύρος (*Engraulis encrasicolus*) και ο καπελάνος (*Mallotus villosus*), ρέγγα (*Clupea harengus*) και η μεταποίηση σολομού. Τα ιχθυάλευρα είναι το ακατέργαστο αλεύρι που λαμβάνεται μετά την άλεση και ξήρανση της σάρκας των ψαριών, και τυπικά παρασκευάζονται από διάφορες πρώτες ύλες όπως υδατάνθρακες, καλαμπόκι, σόγια σιτάρι και είναι πλούσια σε βιταμίνες.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, το ψάρι αποτελεί οικονομική μέθοδος για την παραγωγή ζωοτροφών αν και υπάρχουν πιθανοί κίνδυνοι, όπως η αφλατοξίνη στο καλαμπόκι ως προϊόν μόλυνσης που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας άλεσης, απευθείας στο αγρόκτημα κάτω από συνθήκες ακατάλληλης αποθήκευσης. Λόγω του υψηλού κόστους, η πιθανή αντικατάσταση των ιχθυάλευρων με φυτικές τροφές μπορεί να επιτρέψει τη μείωση ενός σημαντικού κόστους της υδατοκαλλιέργειας και θα μπορούσε να αποτελέσει μια βιώσιμη εναλλακτική πηγή των ιχθυοτροφών (Santacroce, Conversano 2008).

Ωστόσο, υπάρχουν άλλα προβλήματα που σχετίζονται με τις φυτικές πηγές που χρησιμοποιούνται σε ιχθυοτροφές, δεδομένου ότι τα συστατικά των ζωοτροφών φυτικής προέλευσης τείνουν να έχουν υψηλότερα περιστατικά μόλυνσης από αφλατοξίνες και θα μπορούσε να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην καλή διαβίωση των ψαριών. Έτσι, η επιλογή των ζωοτροφών της καλύτερης δυνατής ποιότητας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα εκτρεφόμενα ψάρια .

Η σίτιση των ψαριών με μολυσμένη τροφή μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ιδιαίτερα σε συστήματα εντατικής εκτροφής. Σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου το 25% από καλλιέργειες επηρεάζονται από μυκοτοξίνες ετησίως (Conversano 2008). Κατά συνέπεια, η μόλυνση από μυκοτοξίνες στις τροφές για ψάρια εκτροφής είναι ένα πολύ διαδεδομένο πρόβλημα σε τροπικές περιοχές και στις αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω χρήσης των συχνά μολυσμένων υλικών με αφλατοξίνες, καθώς και σε κακή άλεση ζωοτροφών και διαδικασίες αποθήκευσης.

Σε αυτές τις χώρες που παρασκευάζονται οι ιχθυοτροφές κυρίως από αγρότες, γίνεται συχνά ακατάλληλος και ανθυγιεινός χειρισμός. Έτσι, εκτός από υψηλής συχνότητας εμφάνισης AFB1 κάποια προβλήματα οφείλονται στην έλλειψη της κοινωνικής - οικονομικής ανάπτυξης και ανθυγιεινές και ξεπερασμένες πρακτικές, καθώς και απαράδεκτες ρυθμίσεις αποθήκευσης σε ανοιχτό χώρο όπου υπάρχει συχνή εμφάνιση εντόμων και αρουραίων (Conversano 2008).

Προφανώς, η αυξανόμενη χρήση των συστατικών φυτικής προέλευσης σε τροφές για αναπαραγωγή ψαριών εντείνει τη δυνητική εμφάνιση της αφλατοξίκωσης στις υδατοκαλλιέργειες. Στο σύνολό τους, οι έρευνες έχουν επισημάνει ότι η μόλυνση από αφλατοξίνες ζωοτροφών είναι ένα σημαντικό και διαδεδομένο πρόβλημα στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας, που θέτει προβληματισμούς σε θέματα υγείας, οικονομίας και αλυσίδας στη παραγωγή πολλών χωρών (Conversano 2008).

1.5 ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ - ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Στα πρόσφατα χρόνια οι υδατοκαλλιέργειες αγωνίζονται διεθνώς να παραμείνουν σε επαφή με τις εξελίξεις και τις συχνές αλλαγές στη Νομοθεσία για την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων. Μία διεθνής αύξηση στην εμφάνιση τροφικών δηλητηριάσεων και η δημοσιότητα που έχουν πάρει μία σειρά σκανδάλων με απάτες σε τρόφιμα, έχουν αυξήσει την πίεση των καταναλωτών στις κυβερνήσεις ώστε να διασφαλίσουν την προστασία του καταναλωτή μέσα από βελτιωμένη Νομοθεσία.

Όλες οι βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων πρέπει σήμερα να προσαρμοστούν και να δεχτούν την ευθύνη για την παραγωγή ασφαλών τροφίμων, κυρίως μετά από την εισαγωγή συστημάτων προληπτικού ελέγχου βασισμένων στην θεωρία της Ανάλυσης Επικινδυνότητας των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis of Critical Control Points – HACCP), τα οποία αντικαθιστούν την επιθεώρηση του τελικού προϊόντος.

Αναμφισβήτητα έχει υπάρξει αντίσταση στην εισαγωγή τους και παρεξηγήσεις στον τρόπο εφαρμογής και λειτουργίας τους, αλλά η κατάσταση βελτιώνεται σημαντικά. Προκειμένου να εισέλθουν στις κερδοφόρες Ευρωπαϊκές αγορές, τόσο η εγχώρια παραγωγή, όσο και οι εισαγωγές από τρίτες χώρες πρέπει να παράγονται κάτω από έλεγχο και να συνοδεύονται από αρχεία καταγραφής της παραγωγής. Είναι εμφανές ότι οι μικροί ανεξάρτητοι παραγωγοί έχουν δυσκολία στην κατανόηση και εναρμόνιση με τις αλλαγές της νομοθεσίας σε θέματα όπως η Υγεία και η Ασφάλεια του Καταναλωτή, καθώς και η περιβαλλοντική προστασία. Σημαντική βοήθεια πρέπει να παρασχεθεί σε αυτό το σημείο, κάτι που μπορεί να γίνει με παροχή πληροφοριών και με την εκπαίδευση τους σε συνεργασία με την βιομηχανία.

Όπως και άλλοι τομείς της αλιευτικής βιομηχανίας, οι υδατοκαλλιέργειες κατά τα τελευταία χρόνια έχουν υποχρεωθεί να αρχίσουν την ανάπτυξη συστημάτων διαχείρισης προληπτικού χαρακτήρα, προκειμένου να παρέχουν στον καταναλωτή διασφάλιση της ασφάλειας του προϊόντος και, λιγότερο αλλά με αυξητικές τάσεις, ότι η παραγωγή είναι από ανανεώσιμους βιολογικούς πόρους. Σαν αποτέλεσμα έχουν ήδη αναπτυχθεί και αναπτύσσεται συνεχώς ένας αυξανόμενος αριθμός από Κώδικες Ορθής Πρακτικής για τις υδατοκαλλιέργειες και την αλιεία, καθώς και προγράμματα πιστοποίησης. Αυτά έχουν πολλές μορφές, από συμβουλευτικά έως υποχρεωτικά και καθοδηγούνται από την Κυβέρνηση, από τον ιδιωτικό τομέα ή από κοινές πρωτοβουλίες.

1.5.1 Αποθήκευση των ιχθυοτροφών

Προφανώς, οι μυκοτοξίνες είναι ένα πρόβλημα για τους παραγωγούς γεωργικών προϊόντων που καλλιεργούν σπόρους δημητριακών και ελαιούχους σπόρους. Επίσης προκαλούν ανησυχία στους παραγωγούς οι οποίοι τροφοδοτούν με αυτές της φυτικής προέλευσης τροφές τα ζώα που παράγονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Η σημασία της αποθήκευσης των ιχθυοτροφών σωστά είναι ένα σημαντικό κομμάτι για την διασφάλιση ποιότητας. Οι ιχθυοτροφές που έχουν μολυνθεί με τοξινογόνα σπόρια μούχλας μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες όταν εκτίθενται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Μπορεί να σχηματιστεί συμπύκνωση στο εσωτερικό των μεταλλικών δοχείων αποθήκευσης κατά τη διάρκεια εποχιακών αλλαγών το φθινόπωρο και χειμώνα. Αυτός είναι ένας καλός λόγος για να αδειάσουν και να καθαριστούν όλα τα δοχεία αποθήκευσης των ιχθυοτροφών, εκτός αν είναι σε συνεχή χρήση κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ως προληπτικό μέτρο της ανάπτυξης μούχλας.

Όταν το επίπεδο υγρασίας είναι μεγαλύτερο από 12%, η μούχλα μπορεί να αναπτυχθεί και, ενδεχομένως, να παράγει μυκοτοξίνες. Οι ιχθυοτροφές αποθηκεύονται σε σάκους και πρέπει να προστατεύονται από την υγρασία. Οι σάκοι πρέπει να αποθηκεύονται σε σημείο που αποτρέπει την έκθεσή τους στη βροχή. Οι αποθηκευμένες ζωοτροφές που κατ' επέκταση είναι μούχλιασμένες θα πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία μυκοτοξινών πριν γίνει η εκτροφή των ψαριών. Υπάρχουν πολλές απλές δοκιμές για τον εντοπισμό συνήθως των μυκοτοξινών. Τα τεστ κιτ περιέχουν όλες τις χημικές ουσίες και τα δοχεία που απαιτούνται για την ολοκλήρωση της δοκιμής. Οι δοκιμές συνήθως γίνονται ως προς την παρουσία της μυκοτοξίνης, και όχι τη συγκέντρωσή της στην τροφή. Ως εκ τούτου, αυτό το είδος των δοκιμών θα πρέπει να θεωρηθεί διαλογής για την παρουσία των μυκοτοξινών. Εάν έχει εντοπιστεί μυκοτοξίνη, περαιτέρω δοκιμές πρέπει να διεξάγονται για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της στην τροφή. Συνήθως υπάρχουν προειδοποιήσεις και δημοσιεύματα στα ηλεκτρονικά μέσα, όταν οι τρέχουσες συνθήκες είναι ευνοϊκές για την παραγωγή ορισμένων μυκοτοξινών στα συστατικά των ζωοτροφών. Αυτή η πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του αριθμού των μυκοτοξινών και να αξιολογηθεί. Εμπορικά ή κρατικά εργαστήρια δοκιμών μπορούν να ελέγχουν συχνά την παρουσία των μυκοτοξινών στις τροφές υδατοκαλλιέργειας. Οι υπηρεσίες αυτές συνήθως παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις μυκοτοξίνες και τις συγκεντρώσεις τους. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε την συγκέντρωση στην οποία η μυκοτοξίνη είναι τοξική, με βάση την επιστημονική εκτίμηση της εν λόγω μυκοτοξίνης για κάποιο προβλεπόμενο είδος.

1.6 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) στο 25% των δημητριακών καρπών που παράγονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, καταγράφεται μόλυνση από μυκοτοξίνες (CAST 1989). Οι δημητριακοί καρποί αποτελούν σημαντικό μέρος τόσο του ανθρώπινου διατροφολογίου, όσο και εκείνου των αγροτικών ζώων και χρησιμοποιούνται συστηματικά από τη βιομηχανία ζωοτροφών. Ο άνθρωπος μολύνεται άμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων φυτικής προέλευσης ή έμμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων ζωικής προέλευσης. Η παγκόσμια εξάπλωση του προβλήματος των μυκοτοξικών σεωσεων, η επικινδυνότητα για τη υγεία του ανθρώπου και των ζώων και οι οικονομικές απώλειες της κτηνοτροφικής παραγωγής καθιστούν την έρευνα για τις μυκοτοξίνες επίκαιρη και αναγκαία. Ο όρος μυκοτοξίνη επινοήθηκε το 1962 μετά από μια επιδημία που εκδηλώθηκε κοντά στο Λονδίνο και οδήγησε στο θάνατο 100.000 γαλοπούλες, περίπου. Η επιδημία αποδόθηκε σε δευτερογενείς μεταβολίτες του μύκητα *Aspergillus flavus* (αφλατοξίνες) και ευαισθητοποίησε την επιστημονική κοινότητα να στραφεί στη διερεύνηση των μυκοτοξινών. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 300 έως 400 μυκοτοξίνες, ενώ τουλάχιστον 300 έχουν ήδη παραχθεί εργαστηριακά από καλλιέργειες μυκήτων.

Σημαντικότερη θεωρείται η αφλατοξίνη B1 με ηπατοτοξικές και καρκινογόνες ιδιότητες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Μετά την κατανάλωσή της μεταβολίζεται και ανιχνεύεται στο γάλα ως αφλατοξίνη M1. Ο μύκητας *Penicillium citrinum* και μερικά είδη *Aspergillus* (*A. terreus* και *A. niveus*) παράγουν τη μυκοτοξίνη κιτρινίνη (*Citrinin*) η οποία είναι νεφροτοξική.

Η ωχρατοξίνη Α (OTA) ανακαλύφθηκε το 1965 ως μεταβολίτης του μύκητα *Aspergillus ochraceus*. Παράγεται κυρίως από είδη *Aspergillus* (*A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. niger*) αλλά εμπλέκονται στην παραγωγή της και είδη *Penicillium* (*P. verrucosum*). Η ωχρατοξίνη Α θεωρείται ηπατοτοξική, τερατογόνος και καρκινογόνος, αλλά τα κύρια όργανα που προσβάλλει είναι οι νεφροί. Η ευρεία χρήση του *Aspergillus niger* για την παρασκευή κιτρικού οξέος και ενζύμων για ανθρώπινη κατανάλωση καθιστά πολύ σημαντικό τον έλεγχο για πιθανή παραγωγή ωχρατοξίνης Α. Από είδη του μύκητα *Claviceps* παράγεται η μυκοτοξίνη εργοτίνη που έχει συσχετιστεί με γάγγραινα και προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος στον άνθρωπο και στα ζώα. Οι φουμονισίνες αποτελούν μια οικογένεια μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες των γενών *Fusarium* και *Alternaria*, με κυριότερο μέλος τη φουμονισίνη B1. Η τοξικότητα των φουμονισινών οφείλεται στο ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων. Έχουν ηπατοτοξική και καρκινογόνο δράση και στον άνθρωπο σχετίζονται με την εκδήλωση καρκίνου του οισοφάγου.

Μύκητες των γενών *Fusarium*, *Mycothecium*, *Phomopsis*, *Trichoderma*, *Trichothecium* και άλλων, παράγουν μια ομάδα μυκοτοξινών που αριθμεί περισσότερα από 60 είδη και καλούνται τριχοθεσίνες. Από αυτά η δεοξυνιβαλενόλη (DON), η διακετοξυσκιρπενόλη (DAS) και η T-2, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο, παράγονται από το γένος *Fusarium* και προκαλούν αιμορραγία, διάρροια, εμετό, ανορεξία, καθυστέρηση της ανάπτυξης, νευρομυϊκή διεγερσιμότητα και δερματίτιδες μετά τη μόλυνση.

1.6.1 Μόλυνση από μυκοτοξίνες και τα συμπτώματα αφλατοξίκωσης στα ψάρια

Φυτικά συστατικά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη διατροφή των ψαριών αυτό οφείλεται στην αύξηση των πιέσεων της οικονομικής αγοράς σύνθετων ζωοτροφών. Η αυξημένη εξάρτηση από εμπορικά παρασκευασμένα τρόφιμα, σημαίνει ότι τα ψάρια έχουν τον ίδιο κίνδυνο πιθανής έκθεσης σε μυκοτοξίνες.

Οι Αφλατοξίνες ουσιαστικά ασκούν επίδραση στην εκτροφή ψαριών και γαρίδων παραγωγής, που προκαλούν νόσο με υψηλή θνησιμότητα και σταδιακή μείωση των ποιοτικών εκτρεφόμενων αλιευτικών αποθεμάτων, αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα σημαντικό πρόβλημα στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας. Ορισμένα είδη είναι γνωστό ότι είναι πιο επιρρεπείς σε μυκοτοξικές από τους άλλους, οι πέστροφες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις καρκινογόνες επιδράσεις της αφλατοξίνης, για παράδειγμα αν και αρκετές εκατοντάδες μυκοτοξίνες είναι γνωστές, αποτελούν τη μεγαλύτερη ανησυχία στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας βάσει της τοξικότητας και της εμφάνισής τους όπως η αφλατοξίνη και ωχρατοξίνη Α. Η πολυπλοκότητα του έργου κατέστησε αδύνατο να καθοριστεί ένα ασφαλές επίπεδο για τις μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες εξαρτώνται όχι μόνο από τη συγκέντρωση στην τροφή, αλλά και από τη διάρκεια της έκθεσης, τα είδη ψαριών, από την ηλικία των ψαριών, τη διατροφική κατάσταση τους και την κατάσταση της υγείας.

Τα συμπτώματα αφλατοξίκωσης στα ψάρια είναι: η κακή ανάπτυξη και αποτελεσματικότητα των ζωοτροφών, οι καρκινικοί όγκοι, μειωμένη κατανάλωση τροφής, χλωμά βράγχια, βλάβη του γαστρικού, καθιστώντας τα ψάρια πιο επιρρεπή σε βακτηριακή, ή παρασιτική λοίμωξη και υψηλή θνησιμότητα.

1.6.2 Οι κίνδυνοι των μυκοτοξινών στα ψάρια και τη δημόσια υγεία

Παγκοσμίως έχει καθιερωθεί μια ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (TDI) μυκοτοξινών, που υπολογίζει την ποσότητα που μπορεί κάποιος να εκτεθεί ημερησίως σε όλη τη διάρκεια της ζωής του χωρίς σημαντικό κίνδυνο για την υγεία (FSA – Τρόφιμα Υπηρεσία για τα Πρότυπα, 2012). Οι διάφορες μυκοτοξίνες στο μεταβολισμό των ψαριών δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, αλλά υπάρχουν κάποια έγγραφα σχετικά με την αφλατοξίνη AFB. Έτσι, μετά από κατάποση των ψαριών από AFB μέσω της διατροφικής έκθεσης, απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό στο κυκλοφορικό σύστημα. Τα υδρόβια είδη έχουν δείξει ευαισθησία στις ηπατοτοξικές και καρκινογόνες επιδράσεις της AFB1 που εξαρτάται από το κάθε είδος. (Deng et al. ,2010)

Μερικοί συγγραφείς ανέφεραν την παρουσία κατάλοιπων στους ιστούς ή τα όργανα του ψαριού που είχαν δηλητηριαστεί με μυκοτοξίνες, αλλά ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί ποιο είναι το ανεκτό όριο για τα διάφορα είδη ψαριών. Η ισχύουσα νομοθεσία δεν περιλαμβάνει τα όρια για ZEN στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, δεδομένου ότι έχει αναφερθεί ότι οι μυκοτοξίνες (*Fusarium*) μεταφέρονται από τις ζωοτροφές στο κρέας, το γάλα και τα αυγά, μόνο σε ένα πολύ περιορισμένο βαθμό (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, ΕΚ, 2006). Ωστόσο, το υπόλειμμα AFB1 έχει συχνά αναφερθεί σε βιολογικούς ιστούς ψαριών (El-Sayed και Χαλίλ, 2009). Στην πλειοψηφία από μελέτες που έγιναν, το απομένον επίπεδο AFB1 στο ήπαρ είναι πολύ υψηλότερο από ότι στους μύες.

Αναφέρθηκε επίσης ότι η σίτιση για μεγάλο χρονικό διάστημα του λαβρακιού σε χαμηλά επίπεδα AFB1 προκαλεί όχι μόνο σοβαρά προβλήματα υγείας που εκτίθεται σε ψάρια, αλλά και που εκπροσωπούν υψηλό κίνδυνο για τους καταναλωτές μέσω των υπολειμμάτων τους στο μυϊκό σύστημα. Στην παρούσα μελέτη, περιγράφουν ότι η αφλατοξίνη B1 έχει συσσωρευτεί σε ένα επίπεδο του $4,25 \pm 0,85$ ppb στον μυ του λαβρακιού που τροφοδοτείται από AFB1, γεγονός που υποδηλώνει ένα σημαντικό κίνδυνο για τη μετάδοση στο καταναλωτή.

Η αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων έχει θέσει ένα όριο 20 ppb AFB1 σε ανθρώπινα τρόφιμα, βάση του οποίου με μελέτες αναγνώρισαν τα επίπεδα μυκοτοξινών που παρουσιάζονται σε όργανα και ιστούς των ψαριών, ώστε να είναι αναγκαία για την τυποποίηση των μεθόδων ανάλυσης. (Bintvihok et al, 2003. Deng et al, 2010. El-Sayed , 2009 Nomura et al., 2011).

Είναι απαραίτητη η ανίχνευση των διαφορετικών μυκοτοξινών στους ιστούς των ψαριών και τα όργανα, για την εκτίμηση του κινδύνου στη δημόσια υγεία και τον καθορισμό ασφαλούς επιπέδου κάθε τύπου μυκοτοξίνης στους ιστούς για αρκετά είδη ψαριών.

1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φάνηκε πώς θα μπορούσαν οι μυκοτοξίνες να αποτελέσουν κίνδυνο στις ιχθυοτροφές , στα συστατικά τους και στη δημόσια υγεία, μελετώντας έτσι την αποφυγή και αντιμετώπιση τους. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δείγματα συστατικών ιχθυοτροφών, ο στόχος της ήταν με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν να ελεγχθούν ως προς την μόλυνση τους με μύκητες και κατ' επέκταση την εξέταση για ύπαρξη τοξινών στα συστατικά, συνεπώς αυτό μπορεί να επιφέρει πρόληψη και ασφάλεια που είναι η προτιμότερη μέθοδος απαλλαγής.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα που ελήφθησαν συμφωνούσαν με 2 σημαντικά κριτήρια : ήταν όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερα στην ανάπτυξη της ζωικής παραγωγής και είχαν ευρεία χρήση και κατανάλωση. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και εξετάστηκαν ήταν φυτικής και ζωικής προέλευσης, κρεατάλευρο/ άλευρο χοίρων (Greaves meal), ηλιάλευρο, πτεράλευρο (feather meal), γλουτένη καλαμποκιού, καλαμποκάλευρο, άλευρα πουλερικών (poultry meal) και ιχθυάλευρο. Τα συστατικά των ιχθυοτροφών προμηθεύτηκαν από επώνυμες εταιρίες.

2.2 Παρασκευή υποστρωμάτων

2.2.1 Παρασκευή (Plate Count Agar) PCA

Το υλικό παρασκευάστηκε με τη διάλυση 11,75 g σκόνης υποστρώματος σε γυάλινη Duran σε 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μείγμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε μέχρι βρασμού και κατόπιν αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 λεπτά.

2.2.2 Παρασκευή DG18

Αρχικά αφού πραγματοποιήθηκε ζύγιση των υλικών RBC 16g, 0.001g Dichloran και 110 g γλυκερόλη, παρασκευάστηκε το DG18 κατά τη διάλυση τους σε γυάλινη κωνική φιάλη με 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μείγμα αναδεύτηκε και διαλύθηκε μέχρι που έγινε διαυγές και κατόπιν αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 λεπτά.

2.2.3 Πεπτονούχο νερό (Peptone Water)

Παρασκευάστηκε πεπτονούχο νερό κατά τη διάλυση πεπτόνης σε απιονισμένο νερό συγκέντρωσης 0.1% β.ο. Το μείγμα αναδεύτηκε και διαλύθηκε μέχρις ότου έγινε διαυγές. Έπειτα ακολούθησε η τοποθέτηση του πεπτονούχου νερού 9 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες, και 90ml πεπτονούχου νερού στα Duran. Τέλος αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 λεπτά.

2.2.4 Παρασκευή θρεπτικού υλικού P.D.A.

Για τη παρασκευή του θρεπτικού υλικού P.D.A. 200 gr πατάτας, καθαρισμένης και τεμαχισμένης σε μικρά κομμάτια μεταφέρθηκε σε κωνική του 1 lt που περιείχε 500 ml απιονισμένο νερό και έβρασε για 45 min. Παράλληλα, προστέθηκαν 15 gr agar σε μία άλλη φιάλη που περιείχε 500 ml απιονισμένο νερό και αναδεύτηκαν ώσπου να λιώσει. Στη συνέχεια το εκχύλισμα με τη πατάτα μεταφέρθηκε στη φιάλη με το νερό και το άγαρ. Προστέθηκε 15 gr δεξτρόζη και συνεχίστηκε ο βρασμός μέχρις ότου έγινε η ομογενοποίηση του μίγματος. Ακολούθησε αποστείρωση στους 115°C για 20 λεπτά σε κλίβανο και έπειτα πραγματοποιήθηκε η μεταφορά του θρεπτικού σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες.

2.2.5 Παρασκευή coconut cream

Η ακόλουθη διεργασία που λαμβάνει μέρος είναι η διαδικασία παρασκευής του υποστρώματος Coconut cream. Παρασκευάστηκαν τρία όμοια φιαλίδια για επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Σε κωνική φιάλη εισήχθησαν 12 g agar και στην συνέχεια προστέθηκαν 400 mL coconut cream σε 400 ml νερού. Ακολούθησε ανάδευση των υλικών και έγινε η αποστείρωση.

2.3 Πειραματική διαδικασία

Στο 1^ο πείραμα σε 6 Duran με 90 ml πεπτονόχο νερό τοποθετήθηκαν στο καθένα 10 g από το κάθε άλευρο (πουλερικών, ιχθυάλευρο, γλουτένη καλαμποκιού, πτεράλευρο, κρεατάλευρο, ηλιάλευρο) αφού ζυγίστηκαν δίπλα στη φωτιά. Έπειτα έγινε η προετοιμασία και τοποθέτηση των τρυβλίων με επίστρωση των υλικών παρασκευής PCA και DG18 (500ml υλικού).

Ακολούθησε η υλοποίηση του 2^ο πειράματος με την ίδια διαδικασία. Οι ιχθυοτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για το 2^ο πείραμα ήταν από 2 διαφορετικές παρτίδες η καθεμία παλιότερης και νεότερης συγκομιδής αλεύρου. Η διαδικασία του πειράματος επαναλαμβάνεται και για την 3^η παρτίδα που προκύπτει από την μείξη των δύο παρτίδων. Ακολούθησε αραιώση του πυκνού διαλύματος για κάθε τροφή ομοίως και για τα δύο πειράματα.

2.4 Παρασκευή κατάλληλων αραιώσεων για κάθε τροφή

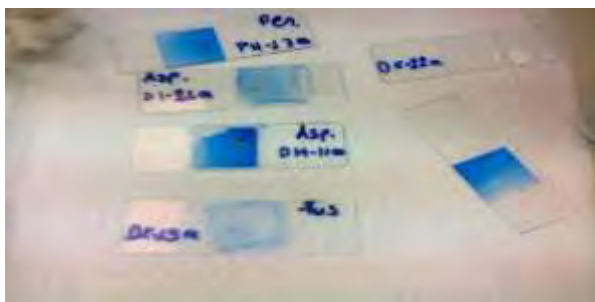
Για κάθε τροφή που τοποθετήθηκε στο πεπτονόχο νερό και αφού έγινε πολύ καλή και ήπια ανακίνηση ακολουθούν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (-1,-2,-3,-4) σε πεπτονόχο νερό και έπειτα έγινε η χρήση για την τοποθέτηση της καθεμιάς σε τρυβλία PCA και DG18 αντίστοιχα. Ακολούθως η διαδικασία του πειράματος συνεχίζεται για κάθε τροφή ξεχωριστά, έγινε η λήψη των δόσεων από το καθένα (Duran με τροφή +1αρ.+2αρ.+3αρ..) και η τοποθέτηση στο ανάλογο τρυβλίο για κάθε τροφή αντίστοιχα. Κατόπιν τα τρυβλία όλα αποθηκεύτηκαν σε θάλαμο επώασης 25°C γυρισμένα ανάποδα. Στο διάστημα αυτό ακολούθησε συχνός έλεγχος και παρακολούθηση. Μετά από 4 ημέρες εμφανίστηκαν οι πρώτες αποικίες και έγινε η καταμέτρηση των μικροοργανισμών.

2.5 Απομόνωση -Προσδιορισμός μυκήτων σε γθυοτροφές

Μετά το διάστημα 4 ημερών έπειτα από συχνή παρακολούθηση και παρατήρηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ξεκίνησε η καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίστηκαν στα τρυβλία σε κάθε διαδοχική αραιώση. Κατόπιν έγινε μεταφορά των αποικιών σε θρεπτικό υλικό P.D.A. Επώαστηκαν στους 25°C για 3 μέρες ώστε να ακολουθήσει η μικροσκοπική παρατήρηση και αναγνώριση για τον προσδιορισμό γένους ή/και είδους.

2.6 Μικροσκοπική Παρατήρηση

Μετά το διάστημα 3 ημερών, είχα ανάπτυξη των μυκήτων σε κάποιους από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα συλλέχθηκε δείγμα για την μικροσκοπική παρατήρηση και αναγνώριση των μυκήτων. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκε το παρασκεύασμα, της μικροσκοπικής παρατήρησης, με μικροβιολογικό κρίκο. Όλη η διαδικασία του πειράματος πραγματοποιήθηκε με τήρηση των ασηπτικών συνθηκών για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση. Έπειτα από παρατήρηση των οργανισμών έγινε η ταυτοποίηση για κάθε παρασκεύασμα και η αναγνώριση των μυκήτων σε μικροσκόπιο (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Παρατήρηση των λεπτομερειών κάθε παρασκευάσματος και προσδιορισμός μυκήτων

2.7 Έλεγχος παραγωγής μυκοτοξινών σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα

Βασικός σκοπός ήταν ο έλεγχος και προσδιορισμός για ύπαρξη μυκοτοξινών με την μέθοδο Υπεριώδης Ακτινοβολίας. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με απομόνωση των μυκήτων που χαρακτηρίζονται από έντονο φθορισμό (*Aspergillus*, *Penicillium*) σε υπόστρωμα coconut cream για παρατήρηση παραγωγής τοξινών κάτω από ακτίνες UV. Αρχικά έγινε επίστρωση με coconut cream έξι τρυβλίων για τον μύκητα *Penicillium sp.* και έξι για τον μύκητα *Aspergillus sp.* (Εικόνα 2-3). Έτσι δημιουργήθηκαν τα τρυβλία (A_1 , A_2 , A_3 , P_1 , P_2 , P_3) στα οποία ακολούθησαν δυο επαναλήψεις για το καθένα (α, β). Μια μέρα μετά την επίστρωση δώδεκα τρυβλίων με coconut cream ακολούθησε ο εμβολιασμός. Η μεταφορά έγινε με την τοποθέτηση των μυκήτων στο κέντρο του τρυβλίου με κρυκοφόρο στυλεό από το δοκιμαστικό σωλήνα με το θρεπτικό. Τα τρυβλία παρέμειναν για τρεις μέρες σε κλίβανο 30°C. Στο τέλος του πειράματος για την αποθήκευση και διατήρηση όλων των μυκήτων σε επωαστικό θάλαμο έγινε η μεταφορά τους σε τρυβλία με υπόστρωμα DG18.



Εικόνα 2: Ανάπτυξη αποικίας μύκητα *Penicillium sp.* σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα coconut cream.



Εικόνα 3: Ανάπτυξη αποικίας μύκητα *Aspergillus sp.* σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα coconut cream.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Πειραματική διαδικασία 1^η

3.1.1 Απομόνωση και απαρίθμηση μυκήτων

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος έπειτα από διάστημα τεσσάρων ημερών εμφανίστηκαν οι πρώτες αποικίες. Ακολούθως ξεκίνησε η καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίστηκαν στα τρυβλία και τέλος καταγράφηκαν τα ποσοστά της κάθε διαδοχικής αραίωσης (-1,-2,-3,-4) στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 3: Αριθμός μολυσματικών μονάδων μυκήτων σε ιχθυοτροφές (cfu/g)

Τροφή	PCA				DG18			
	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4
Ιχθυάλευρο	$5 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^3$	10^4	$<10^5$	$3 \cdot 10^2$	10^3	10^4	$<10^5$
Πτεράλευρο	$<10^2$	$<10^3$	$<10^4$	$<10^5$	$<10^2$	10^3	10^4	$<10^5$
Γλουτένη καλαμποκιού	$1.1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	$<10^4$	$4 \cdot 10^5$	10^2	$<10^3$	10^4	$<10^5$
Κρεατάλευρο	$4 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	$<10^4$	10^5	$4 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^4$	10^5
Ηλιάλευρο	$1.25 \cdot 10^4$	$3.6 \cdot 10^4$	10^4	$<10^5$	$<10^2$	10^3	$<10^4$	$<10^5$
Άλευρα πουλερικών	10^2	$<10^3$	$2.1 \cdot 10^5$	$<10^5$	$6 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$	10^4	$<10^5$

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο αριθμός των αποικιών της δεύτερης επαναληπτικής καταμέτρησης έπειτα από παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης .

Πίνακας 4: Αριθμός μολυσματικών μονάδων μυκήτων σε ιχθυοτροφές (cfu/g)

Τροφή	PCA				DG18			
	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4
Ιχθυάλευρο	$3.1 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	10^4	$<10^4$	$4 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$	10^4	$<10^5$
Πτεράλευρο	10^2	$<10^3$	$<10^4$	$<10^5$	$<10^2$	10^3	10^4	$<10^5$
Γλουτένη καλαμποκιού	$1.3 \cdot 10^3$	$5.2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$<10^5$	10^2	$<10^3$	10^4	$<10^5$
Κρεατάλευρο	$5 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$<10^4$	10^5	$4 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^4$	10^5
Ηλιάλευρο	$1.7 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$<10^5$	$2 \cdot 10^2$	$<10^3$	$<10^4$	$<10^5$
Άλευρα πουλερικών	$2.1 \cdot 10^3$	10^3	$<10^4$	$<10^5$	$8 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$	10^4	$<10^5$

Σε αυτή τη φάση ξεκίνησε η διαδικασία της απομόνωσης του δείγματος από το τρυβλίο στο θρεπτικό υλικό P.D.A. που ήταν έτοιμο στους δοκιμαστικούς σωλήνες και σε διάστημα τριών ημερών παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των μυκήτων και έγινε η ταυτοποίηση και η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

3.1.2 Ταυτοποίηση

Από την ταυτοποίηση σύμφωνα με μικροσκοπική παρατήρηση έγινε αντιληπτή η εμφάνιση *Cladosporium sp.* σε πτεράλευρο και ηλιάλευρο. Το *Cladosporium sp.* είναι γένος δευτερομυκήτων της κλάσης των υφομυκήτων. Η αναγνώριση βασίστηκε τόσο στη μικροσκοπική περιγραφή με διάκριση υφών και κονιδίων που ξεκινούν από τις υφές και διακλαδίζονται δενδροειδώς σε διάφορες κατευθύνσεις όσο και στη μακροσκοπική περιγραφή (χρώμα και εμφάνιση αποικίας).

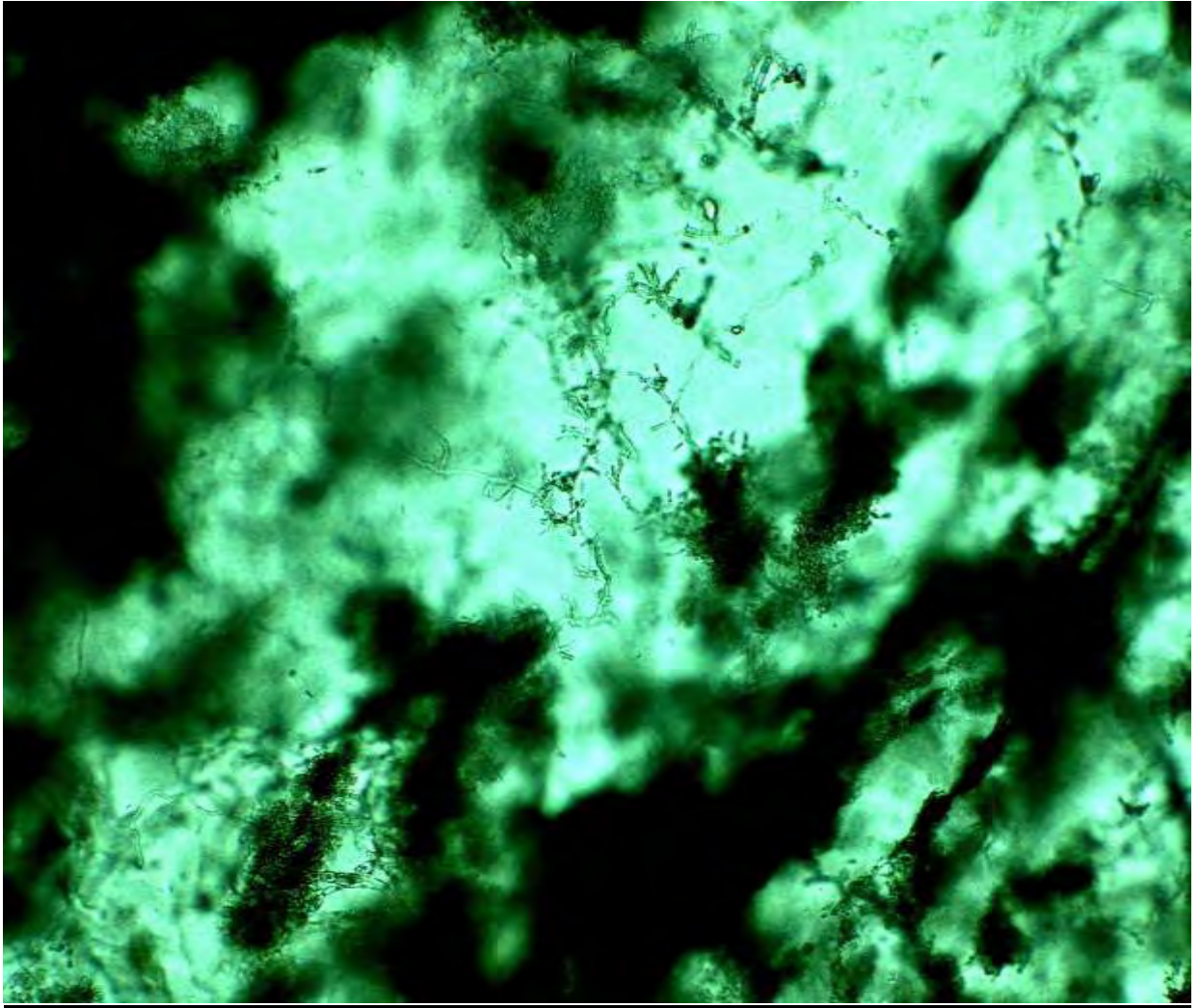
Στην συνέχεια έγινε λήψη εκ νέου δείγματος από τα τρυβλία με το **ιχθυάλευρο, ηλιάλευρο και πτεράλευρο**. Τα δείγματα έμειναν 3 μέρες για επώαση και μετά ακολούθησε η τοποθέτηση σε UV. Επίσης το ηλιάλευρο μπήκε εκ νέου σε αντικειμενοφόρο πλάκα όπως και το κρεατάλευρο όπου έγινε ο επανέλεγχος για αναγνώριση και ταυτοποίηση (πίνακας 5). Για τον επανέλεγχο έγινε επίστρωση των τρυβλίων, μεταφορά σε θρεπτικό και μικροσκοπική παρατήρηση.

Τέλος έγινε η Παρατήρηση των παρακάτω δειγμάτων, αφού συλλέχθηκαν δείγματα από τα τρυβλία για επώαση. Μετά από 10 παρασκευάσματα απ' το καθένα και έπειτα από παρατήρηση, για τα υποσχόμενα ταυτοποιήθηκαν μύκητες του γένους *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Η ταυτοποίηση έγινε με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 4-7).

Πίνακας 5: Ταυτοποίηση

Υπόστρωμα	Απομονωμένοι μύκητες	Τροφή/αραίωση	Ταυτοποίηση
DG18	1	Κρεατάλευρο, -2	<i>Penicillium sp.</i>
DG18	1	Πτεράλευρο, -1	<i>Cladosporium sp.</i>
PCA	1	Ηλιάλευρο, -3	<i>Cladosporium sp.</i>
DG18	1	Ιχθυάλευρο, -2	<i>Fusarium sp.</i>
DG18	1	Ηλιάλευρο, -2	<i>Aspergillus sp.</i>
DG18	4	Κρεατάλευρο, -1	<i>Penicillium sp.</i>

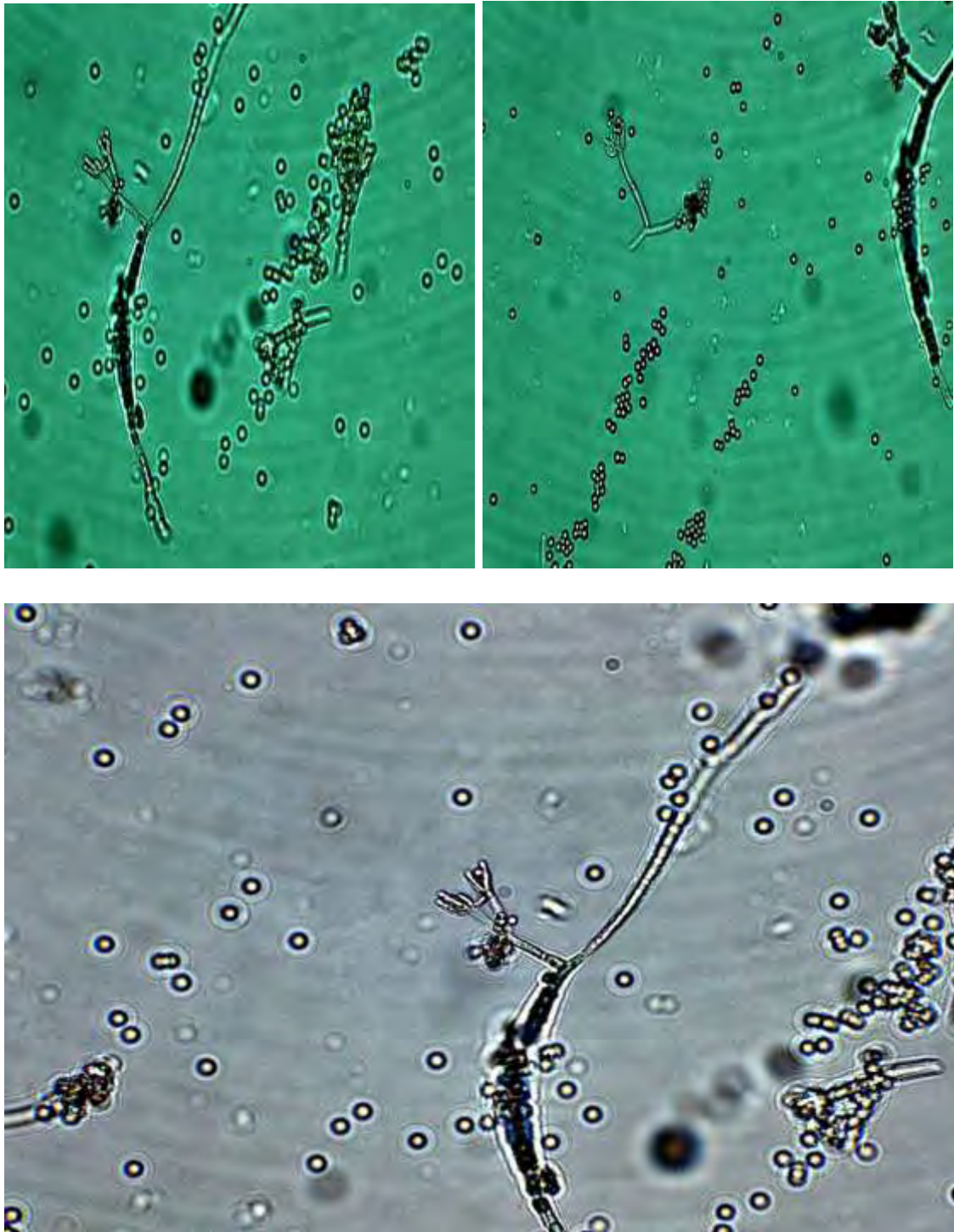
ΜΥΚΗΤΕΣ (Πείραμα 1^ο)



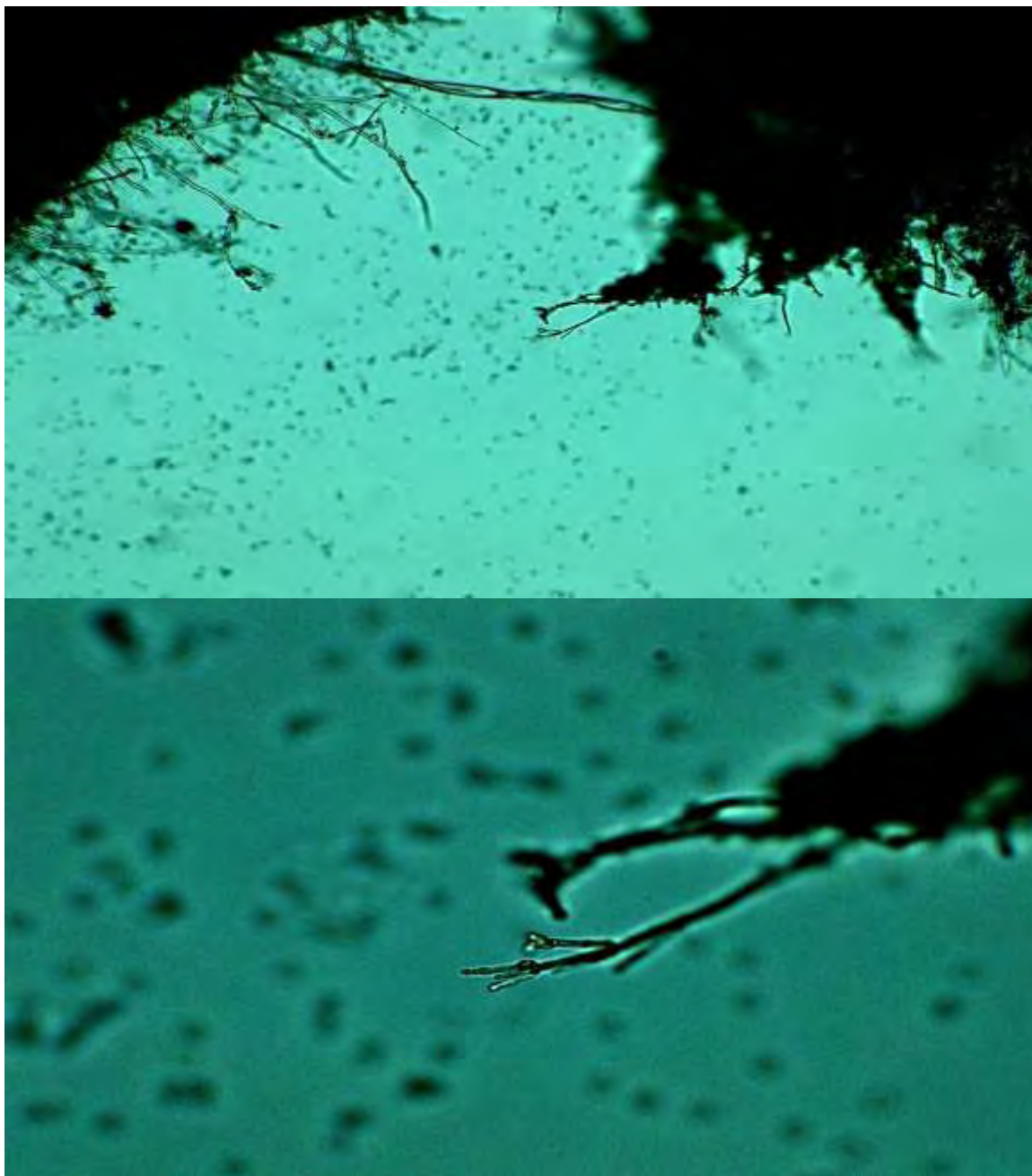
Εικόνα 4: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Fusarium* ο οποίος διακρίνεται κυρίως από καρποφορίες με χαρακτηριστικά μακροκονίδια (D.I.2.1).



Εικόνα 5: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Aspergillus* ο οποίος διακρίνεται από τα χαρακτηριστικά του κονιδιοφόρου του με μονόσειρη και δίσειρη κεφαλή (Η.1.2.α).



Εικόνα 6: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Penicillium* ο οποίος διακρίνεται από μονοσπονδυλωτό και τετρασπονδυλωτό κονιδιοφόρο με σπόρια (G.1.1.4).



Εικόνα 7: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Penicillium* ο οποίος διακρίνεται από μονοσπονδυλωτό και τετρασπονδυλωτό κονιδιοφόρο (D.G.2.1).

3.2 Πειραματική διαδικασία 2^η

3.2.1 Μελέτη ανάπτυξης μυκήτων

Μετά την ολοκλήρωση του δεύτερου πειράματος έπειτα από διάστημα 3-4 ημερών με συχνή παρακολούθηση και παρατήρηση του ρυθμού ανάπτυξης, ξεκίνησε η καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίστηκαν στα τρυβλία και καταγράφηκαν τα ποσοστά της κάθε διαδοχικής αραίωσης (-1,-2) για την 1^η, 2^η και 3^η παρτίδα.

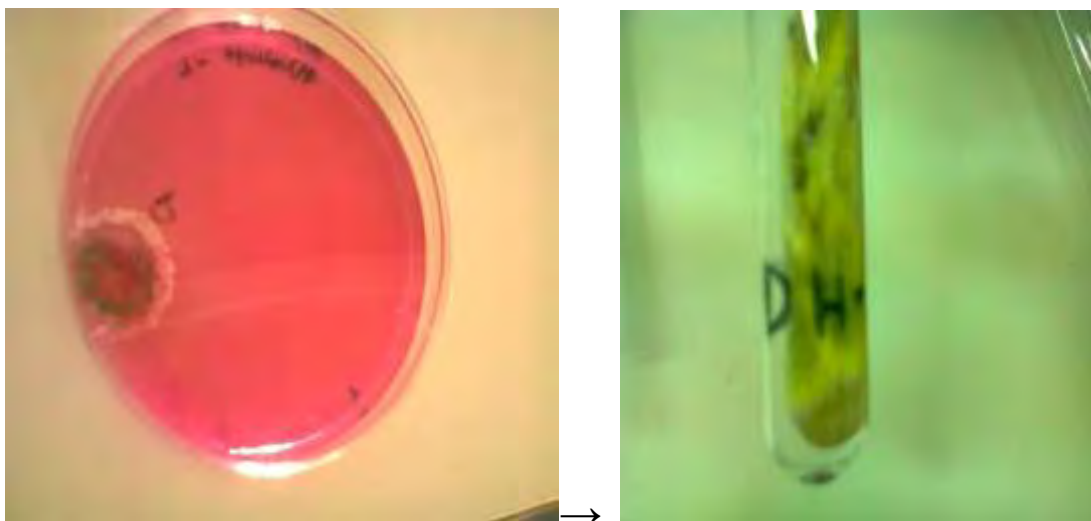
Πίνακας 6: Αριθμός μολυσματικών μονάδων μυκήτων σε ιχθυοτροφές A1(cfu/g)

(Αραίωση -1)	Παρτίδα 1 ^η		Παρτίδα 2 ^η		Παρτίδα 3 ^η	
<u>Τροφή</u>	PCA	DG18	PCA	DG18	PCA	DG18
Άλευρα πουλερικών	0	0	0	0	0	0
Ιχθυάλευρο	0	0	0	0	10 ¹	0
Γλουτένη καλαμποκιού	10 ¹	2·10 ²	0	10 ²	0	0
Καλαμποκάλευρο	18·10 ¹	21·10 ²	28·10 ¹	15·10 ²	8·10 ¹	10 ³
Κρεατάλευρο	4·10 ¹	0	2·10 ¹	4·10 ²	3·10 ¹	10 ²
Ηλιάλευρο	172·10 ¹	10 ²	31·10 ¹	10 ²	83·10 ¹	3·10 ²

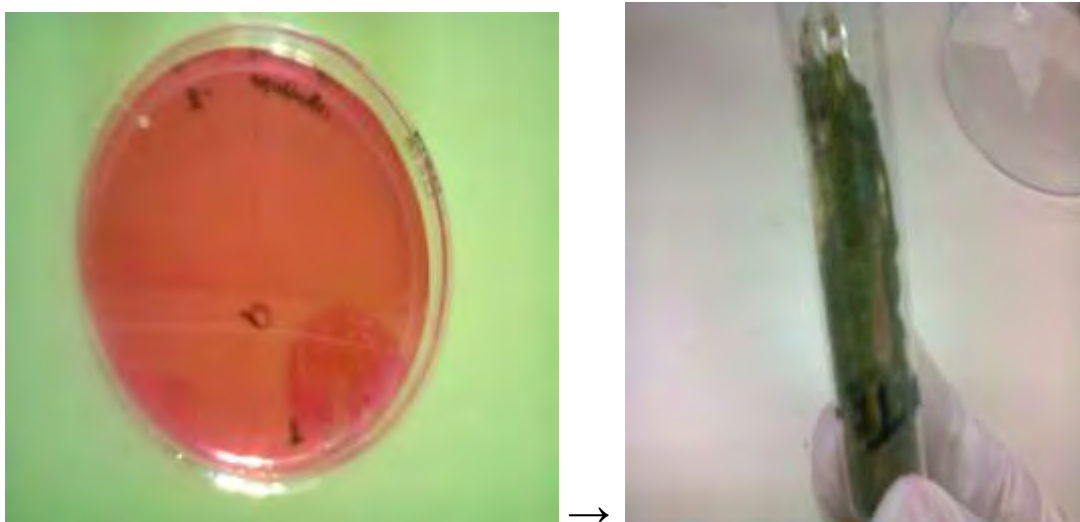
Πίνακας 7: Αριθμός μολυσματικών μονάδων μυκήτων σε ιχθυοτροφές A2(cfu/g)

(Αραίωση -2)	Παρτίδα 1^η		Παρτίδα 2^η		Παρτίδα 3^η	
	PCA	DG18	PCA	DG18	PCA	DG18
Τροφή						
Άλευρα πουλερικών	0	0	0	0	0	0
Ιχθυάλευρο	10^2	10^3	0	0	0	0
Γλουτένη καλαμποκιού	0	0	0	0	10^2	0
Καλαμποκάλευρο	$2 \cdot 10^2$	0	$11 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$	10^3
Κρεατάλευρο	0	0	0	0	0	0
Ηλιάλευρο	$25 \cdot 10^2$	10^3	10^3	0	$7 \cdot 10^2$	0

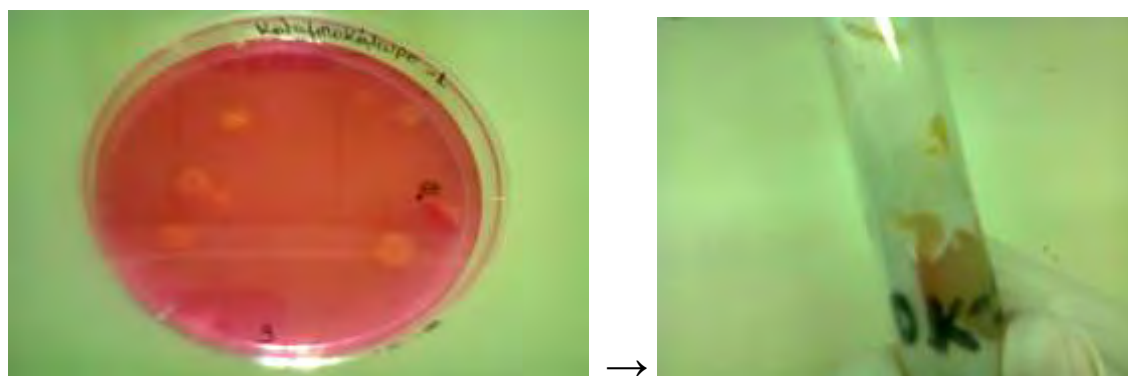
Την επόμενη μέρα έγινε η διαδικασία της απομόνωσης μυκήτων από τα τρυβλία σε θρεπτικό και για τις 3 παρτίδες τροφών. Έπειτα αφού τελείωσε η απομόνωση στο θρεπτικό PDA, οι βάσεις με τους δοκιμαστικούς σωλήνες παρέμειναν 3 μέρες έξω για επώαση. Στις εικόνες που ακολουθούν παρατηρείται η διαδικασία της απομόνωσης και η ανάπτυξη του κάθε μύκητα ξεχωριστά:



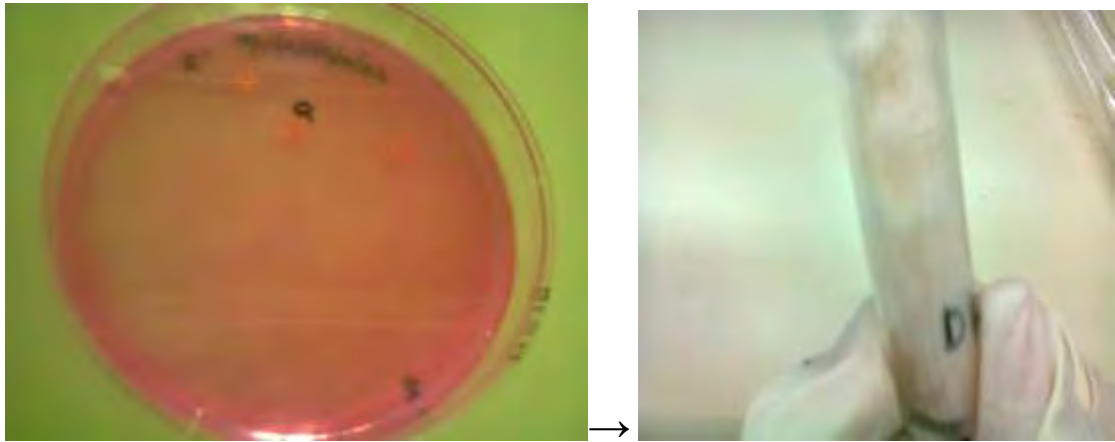
Εικόνα 8: Ανάπτυξη αποικίας *Aspergillus* σε τρυβλίο με υπόστρωμα DG18 (D.H.1.1.α)



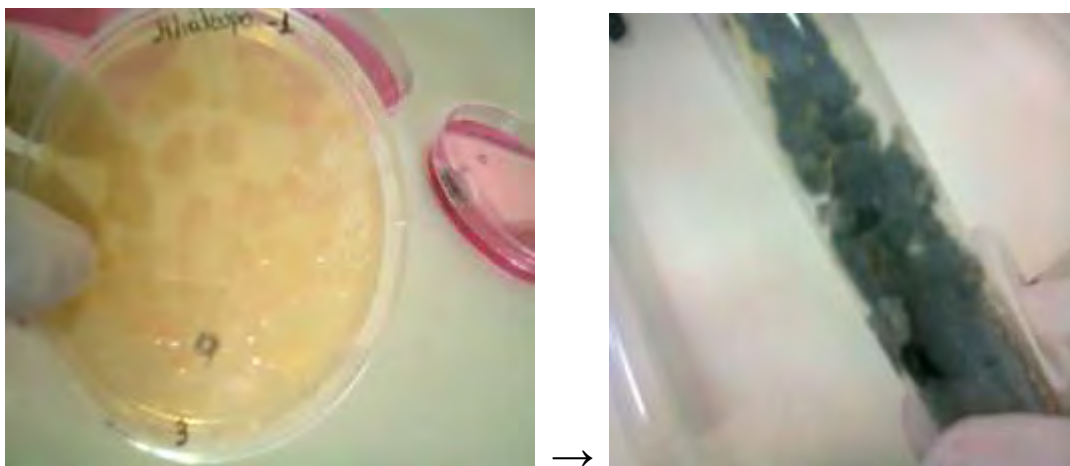
Εικόνα 9: Ανάπτυξη αποικίας *Aspergillus* σε τρυβλίο με υπόστρωμα DG18 (D.I.2.1.α)



Εικόνα 10: Ανάπτυξη αποικίας *Fusarium* σε τρυβλίο με υπόστρωμα DG18 (D.K.1.3.α)



Εικόνα 11: Ανάπτυξη αποικίας *Fusarium* σε τρυβλίο με υπόστρωμα DG18 (D.K.2.2.α)



Εικόνα 12: Ανάπτυξη αποικίας *Penicillium* σε τρυβλίο με υπόστρωμα PCA (P.H.1.3.α)

3.2.2 Παρατήρηση σε μικροσκόπιο 2^η

Μετά το διάστημα τριών ημερών, παρατηρήθηκε ανάπτυξη των μυκήτων σε κάποιους από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Από κάθε σωλήνα που αναπτύχθηκε συλλέχθηκε δείγμα για την παρατήρηση αλλά και ταυτοποίηση των μυκήτων στο μικροσκόπιο.

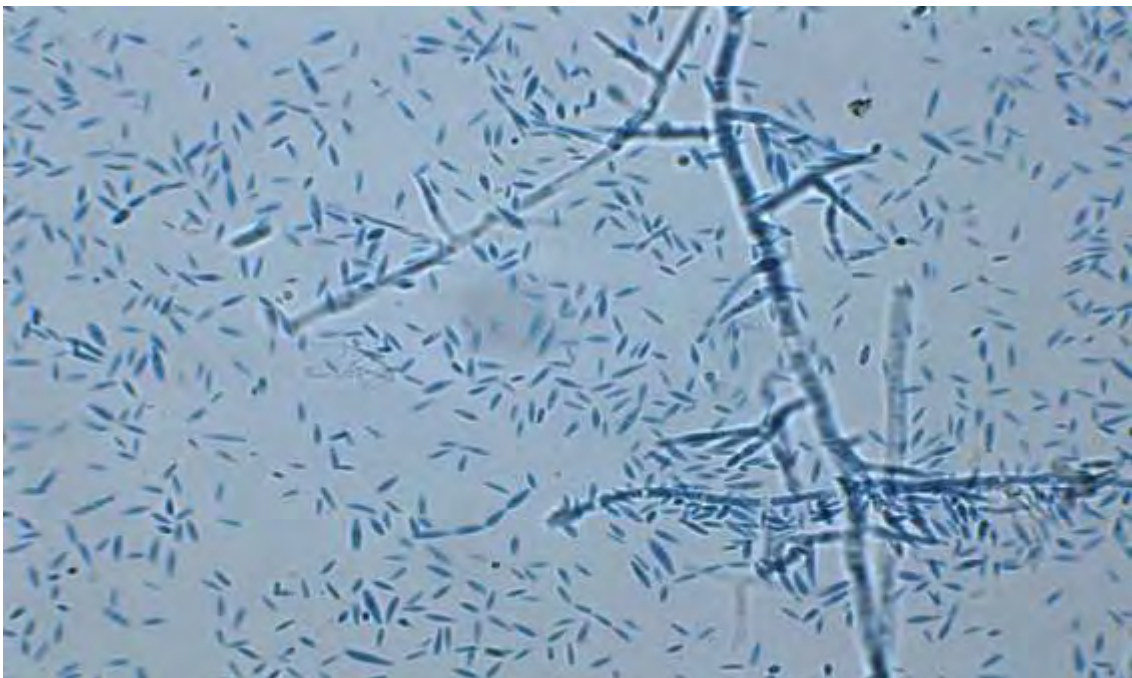
Πίνακας 8: Ταυτοποίηση 2

Υπόστρωμα	Απομονωμένοι μύκητες	Κωδικός σωλήνα	Τροφή/ αραίωση/παρτίδα	Ταυτότητα
DG18	A	D.H.1.1.α	Ηλιάλευρο, -1,1	<i>Aspergillus sp.</i>
DG18	A	D.I.2.1.α	Ιχθυάλευρο,-2,1	<i>Aspergillus sp.</i>
DG18	A	D.K.2.2.α	Καλαμποκάλευρο,-2,2	<i>Fusarium sp.</i>
DG18	A	D.K.1.3.α	Καλαμποκάλευρο, -1, 3	<i>Fusarium sp.</i>
PCA	A	P.H.1.3.α	Ηλιάλευρο, -1,3	<i>Penicillium sp.</i>

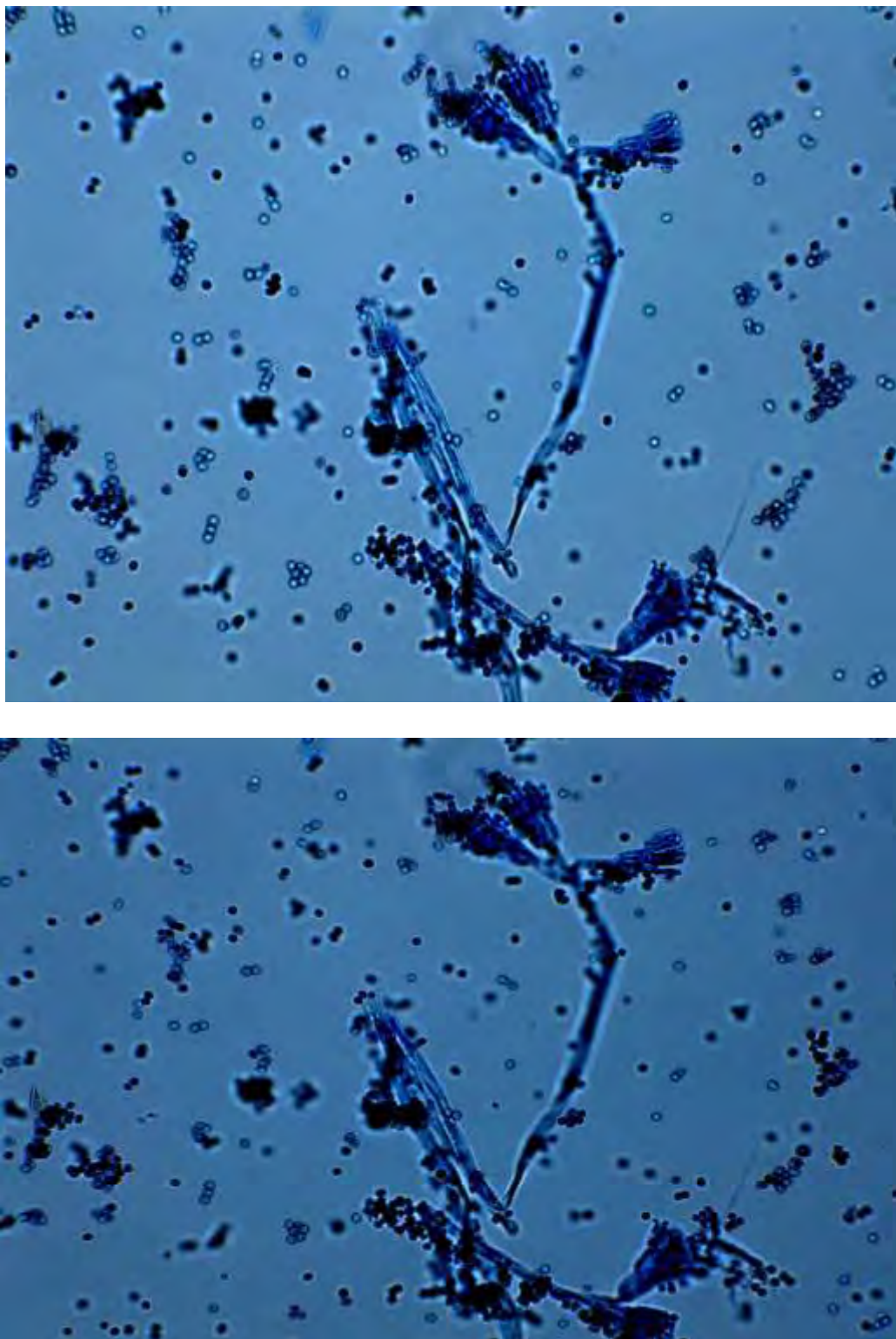
Τέλος αφού έγινε η Παρατήρηση των υποσχόμενων δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τα τρυβλία και ενώ έγινε η απομόνωση τους στο θρεπτικό έπειτα από κάποια παρασκευάσματα απ το καθένα, για τα υποσχόμενα αναγνωρίστηκαν μύκητες του γένους *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Εικόνα 13-17). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν με ταινία Parafilm στο ψυγείο έως ότου γίνει η ανάλυση τους. Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται η ταυτοποίηση που έγινε για κάθε παρασκεύασμα.

ΜΥΚΗΤΕΣ (Πείραμα 2^ο)

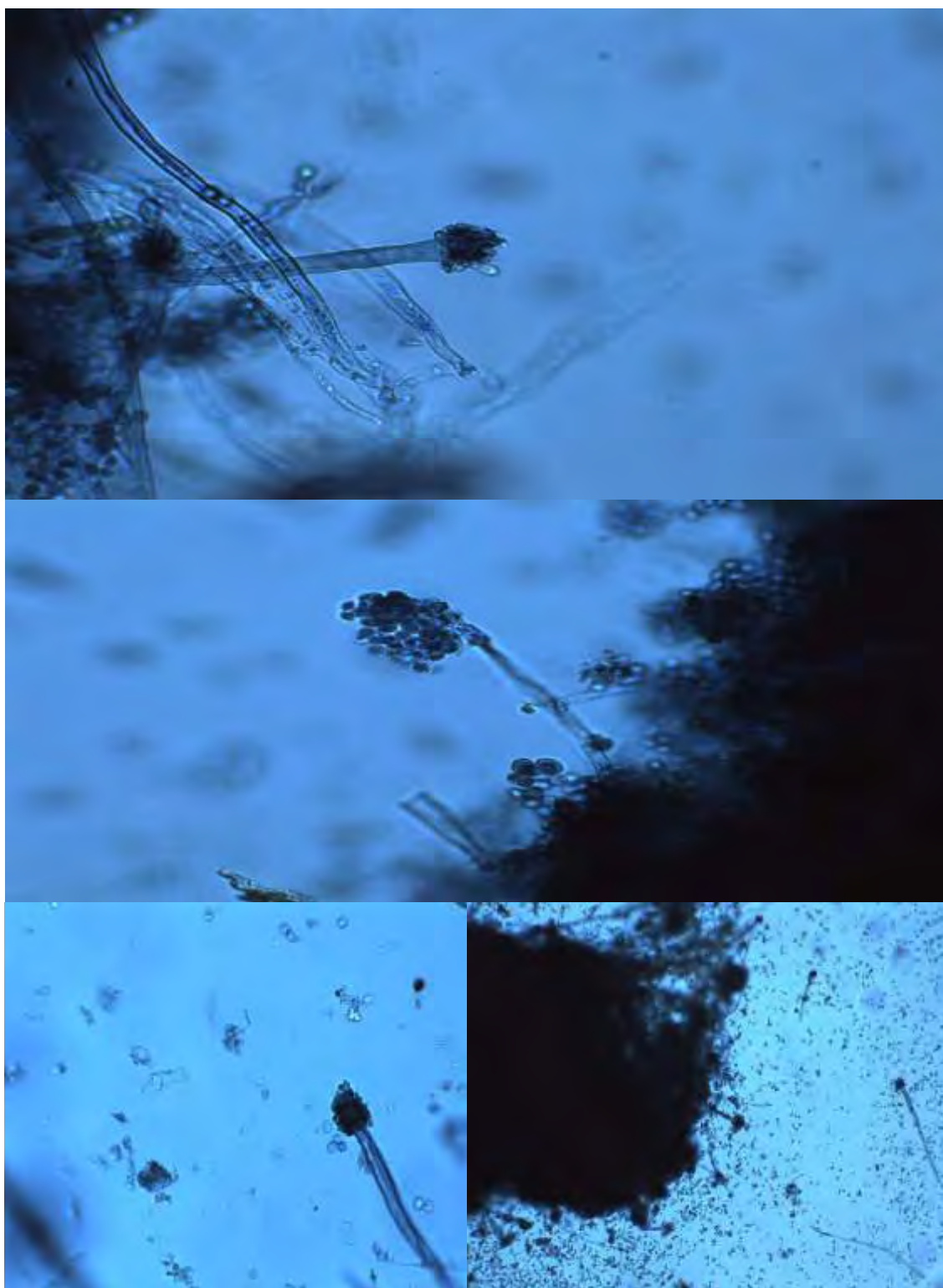
Εικόνα 13: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Fusarium* με εγκάρσια διαφραγμάτια ο οποίος διακρίνεται από τα χαρακτηριστικά μακροκονίδια (D.K.2.2.α).



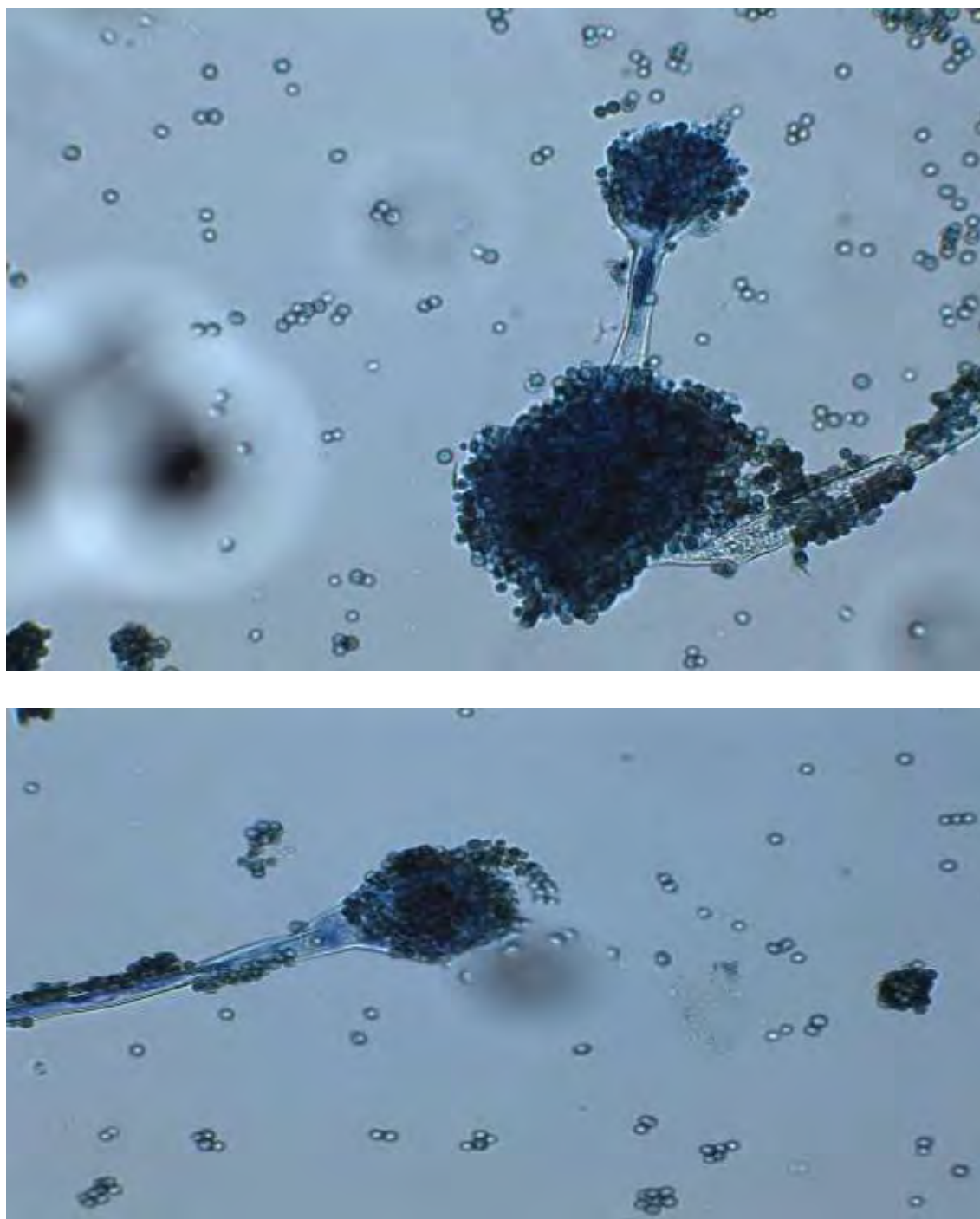
Εικόνα 14: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Fusarium* ο οποίος διακρίνεται από μικροκονίδια και μακροκονίδια (D.K.1.3.α).



Εικόνα 15: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Penicillium* ο οποίος διακρίνεται από μονοσπονδυλωτό και τετρασπονδυλωτό κονιδιοφόρο με στρογγυλά σπόρια (P.H.1.3.α).



Εικόνα 16: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Aspergillus* ο οποίος διακρίνεται από τα χαρακτηριστικά του κονιδιοφόρου του με μονόσειρη και δίσειρη κεφαλή (D.H.1.1.α).



Εικόνα 17: Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας του γένους *Aspergillus* ο οποίος διακρίνεται από τα χαρακτηριστικά του κονιδιοφόρου με μονόσειρη και δίσειρη κεφαλή και χαρακτηριστικούς σπόρους στο άκρο του (D.I.2.1.α).

3.3 Αποτελέσματα - Coconut cream

Έπειτα από την υλοποίηση των πειραμάτων τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν ότι, αφού λοιπόν τοποθετήθηκαν οι μύκητες σε coconut cream και αναπτύχτηκαν διαπιστώθηκε πως κατά τη διάρκεια της παρατήρησης κάτω από ακτίνες UV οι συγκεκριμένες απομονώσεις των μύκητων (*Penicillium*, *Aspergillus*) δεν παράγουν τις προαναφερόμενες μυκοτοξίνες (Εικόνα 18).

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη του μύκητα μπορεί είναι ανεξάρτητα της παραγωγής μυκοτοξίνης. Ενδέχεται η αναστολή της παραγωγής της μυκοτοξίνης να είναι σημαντικά μεγαλύτερη της αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα.



Εικόνα 18: Ουδεμία παραγωγή τοξινών από μύκητες (*Penicillium Aspergillus*).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν παγκοσμίως από τις πλέον πιο ισχυρές τοξικές χημικές ουσίες και μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα σε μεγάλο εύρος όπως αιτίες καρκίνου. Είναι απαραίτητο να σημειωθεί έπειτα από την υλοποίηση των πειραμάτων, πως η επίδραση των μυκήτων μπορεί να εξαρτάται από τον τύπο και την ποσότητα του περιεχομένου της ιχθυοτροφής, αλλά και από την διάρκεια της έκθεσης της.

Σε γενικές γραμμές οι συνέπειες για πιθανόν εμφάνιση μυκοτοξινών στις ζωοτροφές, καθώς και οι τοξικές επιδράσεις που μπορεί να παράγει η μυκοτοξίνη στα ψάρια είναι περισσότερο ανησυχητικές για την ασφάλεια των τροφίμων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης, που ενδεχομένως περιλαμβάνουν αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2, και M1) και τοξίνες που παράγονται από μύκητες *Fusarium* (όπως δεσοξυνιβαλενόλη, T-2 και HT-2). Οι συνέπειες της μόλυνσης από μυκοτοξίνες για τη διατροφή των ψαριών, δεν διαφέρει από άλλα είδη ζώων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και σχετίζεται άμεσα με απώλειες στην παραγωγή. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η εξαιρετική προσοχή στην παραγωγή και την αποθήκευση των ιχθυοτροφών (Desjardins, 2006).

Από τις απομονώσεις των μυκήτων (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) και κατόπιν εξέλιξης των πειραμάτων συμπεραίνεται πως το δείγμα των συστατικών ιχθυοτροφών που διατηρείται κάτω από κατάλληλες συνθήκες δεν παρουσιάζει μυκοτοξίνες. Ως συνέχεια στην έρευνα που ξεκίνησε ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο έλεγχος του προϊόντος με τις μεθόδους ELISA ή / και HPLC για ύπαρξη μυκοτοξινών αλλά και τον προσδιορισμό τοξίνης.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δυο παρτίδες τροφών. Έγινε η δειγματοληψία για την δεύτερη παρτίδα τροφών (παλιότερης συγκομιδής αλεύρου) ενώ η πρώτη προμηθεύτηκε από νέα συγκομιδή και στο τέλος έγινε η μίξη τους για το σχηματισμό μιας τρίτης παρτίδας η οποία έδειξε διαφορετικά χαρακτηριστικά. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ποικίλουν μεταξύ των δειγμάτων, εκείνη που συλλέγεται από νεότερη συγκομιδή είναι καλύτερα διατηρημένη σε αντίθεση, με τα παλαιότερα δείγματα που συλλέγονται .

Σημειώνετε πως ο μεγαλύτερος πληθυσμός μυκήτων που βρέθηκε βάση των αποτελεσμάτων μας αναπτύσσεται σε προϊόντα φυτικής προέλευσης (καλαμποκάλευρο, ηλιάλευρο) σε σχέση με τα ζωικής λόγω πιθανόν μικροβίων στην ατμόσφαιρα. Η χρησιμοποίηση φυτικών προϊόντων στην παραγωγή και κατανάλωση είναι ένας σημαντικός λόγος να προστατευτούν όσο τον δυνατό περισσότερο με το ποιο εφικτό τρόπο για την πρόληψη και αποφυγή μολύνσεων (Fegan , 2005).

Η εμφάνιση *Aspergillus* (ηλιάλευρο, ιχθυάλευρο) *Fusarium* (ιχθυάλευρο, καλαμποκάλευρο) και *Penicillium* (κρεατάλευρο, ηλιάλευρο) στα πειράματα της μελέτης μας που είναι από τα ποιο διαδεδομένα γένη μυκήτων, τονίζει ως αποτέλεσμα την ανάγκη για περαιτέρω έρευνες για να αξιολογηθεί περισσότερο ο κίνδυνος των ιχθυοτροφών και οι συνέπειες για την υγεία των καταναλωτών.

Το πρώτο σημαντικό βήμα είναι εκτός του έλεγχου της μόλυνσης από μύκητες και μυκοτοξίνες της τελικής ιχθυοτροφής ,να ελεγχθούν οι πρώτες ύλες σε αρχικό στάδιο της προμήθειας τους από τις οποίες η τροφή παρασκευάζεται έτσι ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση της μυκοτοξίκωσης στην υδατοκαλλιέργεια, και να μειωθούν οι οικονομικές απώλειες αλλά και να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία.

Συνοψίζοντας λοιπόν από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν είχαμε αξιόλογες ενδείξεις διότι δεν βρέθηκε σε κανένα συστατικό ιχθυοτροφής παρουσία μυκοτοξίνης, το οποίο είναι θετικό για μια σημαντική μελέτη όπως αυτή βασικός παράγοντας της οποίας είναι η εκτροφή των ιχθύων και κατ' επέκταση η υγεία του καταναλωτή. Συμπερασματικά πρέπει να γίνονται συστηματικοί έλεγχοι για τα διάφορα είδη μυκοτοξινών τόσο στις ζωοτροφές όσο και στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα. Η επιμόλυνση με μυκοτοξίνες και η κατανάλωση αυτών των προσβεβλημένων υλικών από τα ζώα είναι μια αναπόφευκτη φάση των συστημάτων της παραγωγής. Το πρώτο βήμα είναι να αποφεύγουμε, όσο το δυνατόν, τα τρόφιμα που είναι εξαιρετικά μολυσμένα. Επιπρόσθετες μελέτες πρέπει να αξιολογούν τα αποτελέσματα των μυκοτοξινών στην υγεία και την παραγωγικότητα των ψαριών, με στόχο την πρόληψη και αποφυγή των κινδύνων για τη δημόσια υγεία. Με τις ορθές γεωργικές πρακτικές που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη κατά τη διάρκεια τόσο πριν όσο μετά τη συγκομιδή, θα ελαχιστοποιηθεί και θα καταπολεμηθεί ο κίνδυνος μόλυνσης των ιχθυοτροφών από τοξίνες. Κυρίως κατάλληλες πρακτικές κατά την υλοποίηση της συγκομιδής σε τομείς, όπως η μεταφορά και οι συνθήκες αποθήκευσης. Με βάση και άλλες μελέτες που έγιναν φαίνεται πως το γεγονός της χρησιμοποίησης ασφαλών φυτικών προϊόντων, έχει αποδειχθεί πως χτίζει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών, οι οποίοι ενδιαφέρονται όλο και περισσότερο για απόκτηση «πράσινων» αλλά και υγιεινών προϊόντων (Savi et al., 2014). Οι μυκοτοξίνες είναι ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα στην παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών τροφίμων με άμεσες επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και ζώων. Από την έρευνά μας φάνηκε η αναγκαιότητα της διατήρησης των τροφίμων με συχνούς ελέγχους ασφάλειας, τηρώντας τους βασικούς κανόνες υγιεινής έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη των μυκοτοξινών από τη τροφική αλυσίδα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

5.1 Ελληνική βιβλιογραφία

➤ Αποστολόπουλος Νεκτάριος, (2011) Μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών Παραμέτρων ανάπτυξης της μυκοτοξίνης Ζεαραλενόνης (ZON) σε δημητριακά, πανεπιστήμιο Πατρών σχολή θετικών επιστημών Πάτρα. -

<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/4930/1/NEKTARIOS%20APOSTOLOPOULOS%20MASTER.pdf>

➤ Αρβανιτογιάννης Σ. Ιωάννης, (2002) Ασφάλεια τροφίμων, studio press. Θεσσαλονίκη (σελ. 34-35), Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σχολή γεωπονικών επιστημών τμήμα γεωπονίας ιχθυολογίας και υδάτινου περιβάλλοντος, Βόλος.

➤ Βλαχάβας Αντώνιος (2013) , Γενετική ταυτοποίηση του περιεχομένου εμπορικών ιχθυαλεύρων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης ,Τμήμα Βιολογίας – Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Τομέας Υδροβιολογία και Υδατοκαλλιέργειες Θεσσαλονίκη. -

<http://digital.lib.auth.gr/record/134888?ln=el>

➤ Γεωργακάς Ηλίας (2013), Στρατηγικές πρόληψης μόλυνσεως από μυκοτοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές, πτυχιακή μελέτη, Καλαμάτα.

➤ Δημητρίου Χ. (2009), Μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές, Τμήμα γεωργίας φυσικών πόρων και περιβάλλοντος, Έκδοση 9/2009 , Λευκωσία- Κύπρος.

➤ Ευαγγέλου Μαριάννα (2014), Μυκοτοξίνες, αφλατοξίνες, υπεύθυνες για καρκίνο, διαβήτη και σκλήρυνση κατά πλάκας, άρθρο. - <http://fytro.wordpress.com>

➤ Καλανταρίδης, Εισαγωγή στην Ασφάλεια Τροφίμων, διατριβή, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης- <http://eureka.lib.teithe.gr:8080/bitstream/handle/10184/4401/kalandaridis.pdf>.

- Καλογερίας Α.(2010), Επίδραση παραγωγικής διαδικασίας στα επίπεδα μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα, πτυχιακή μελέτη, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Καλαμάτα.
- Μαρκόγλου Α. (2010), Μυκοτοξικογόνοι Μύκητες και Μυκοτοξίνες, Τοξικολογικοί κίνδυνοι και μέθοδοι ελέγχου και αντιμετώπισης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών σελ. 1-40.
- Παπασταμάτη Ιωάννα – Μαρία,(2014) Μελέτη Τοξικών Μετάλλων και Μυκοτοξινών σε πρώτες ύλες, διπλωματική εργασία, πολυτεχνείο Κρήτης σχολή μηχανικών περιβάλλοντος. -<http://dias.library.tuc.gr>
- Παπουτσόγλου Ευσταθ., Διατροφή ιχθύων , βιβλιοθήκη πανεπιστημίου Θεσσαλίας σχολή γεωπονικών επιστημών τμήμα γεωπονίας ιχθυολογίας και υδάτινου περιβάλλοντος, Βόλος.
- Πετρωτός Κων/νος (2010), Ανάπτυξη ταχείας μεθόδου ανάλυσης επικίνδυνων μυκοτοξινών σε ξηρούς καρπούς ΓΕΩΝΑΤΣ Ε.Π.Ε. ,Τμήμα μηχανικής βιοσυστημάτων, ερευνητική εργασία, Λάρισα.
- Σακελλαράκη Σταματίνα -Τσιάβου Βασιλική (2012), Μελέτη των Γνώσεων σχετικά με την ασφάλεια τροφίμων σε οικογένειες με μικρά παιδιά, Σχολή τεχνολογίας τροφίμων και διατροφής Τμήμα διατροφής και διαιτολογίας, Θεσσαλονίκη.
- Τζανετάκης Ν (1993), Υγιεινή τροφίμων - Τοξικολογία, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη.
- Τζίμας Παναγιώτης (2011), Μυκοτοξίνες & υγεία ανθρώπων & ζώων. - <http://www.zookomos.gr/index.php>
- Τσιτσιγιάννης Δημήτρης, Ασφάλεια και κίνδυνοι στα φυτικά και ζωικά προϊόντα από τις μυκοτοξίνες, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ. 1-41.

➤ Χατζηγευσταθίου Μιχαήλ, Καργιώτη Ειρήνη, Καρδάση Ζωή, Ανάπτυξη προτύπων για πιστοποίηση υδατοκαλλιέργειών και την σήμανση των προϊόντων τους ως Οργανικής Υδατοκαλλιέργειας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Περιβάλλοντος, Μυτιλήνη. -<http://www.srcosmos.gr/srcosmos/showpub.aspx?aa=8298>

5.2 Διεθνής βιβλιογραφία

➤ Amanda Anater , LaraManyes , Giuseppe Meca , Emilia Ferrer , Fernando Bittencourt Luciano , Cláudia Turra Pimpão , Guillermina Font (2016) ,Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review, a School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Pontificia Universidad Brazil p.1-10. - <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.022>

➤ Albert G. J. Tacon and Marc Metian (2008), Aquaculture Feed and Food Safety, The Role of the Food and Agriculture Organization and the *Codex Alimentarius*- Kaneohe, Hawaii, USA, 1140: 50–59.

➤ Anonymous (1999),*Aspergillus–Pencillium*, food info of Wageningen University.

➤ Bruce B. (2010), Mycotoxins in Aquaculture Feeds, SRAC Publication No. 5002, p. 1-4.

➤ Daniel F. Fegan (2005), Aquaculture Mycotoxins - a rising threat to aquaculture, scientific article, version of this paper at Alltech's annual conference in Lexington, Kentucky, AgriWorld/Alltech Inc./ Bangkok, Thailand.

➤ Desjardins A.E (2006), *Fusarium* Mycotoxins, 260 pp. /part 1 (Chemistry, genetics, and biology), library of University Thessaly school of agricultural sciences department of ichthyology and aquatic environment.

- Geovana . Savi, Karim C. Piancetini and Vildes (2014), Ozone treatment efficiency in *Aspergillus–Pencillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains, laboratory of mycotoxicology and food contaminants, food science and technology department, center of agricultural sciences, santa catarina, Brazil (p.1745-4549).
- Maria Pia Santacroce, M. C. Conversano (2008), *Aflatoxins* in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives, Fish Biol Fisheries, 18:99–130. - <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11160-007-9064-8>.
- Naresh Magan and David Aldred (2007) ,Post-harvest control strategies, International Journal of Food Microbiology p.131–139 . -www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro