

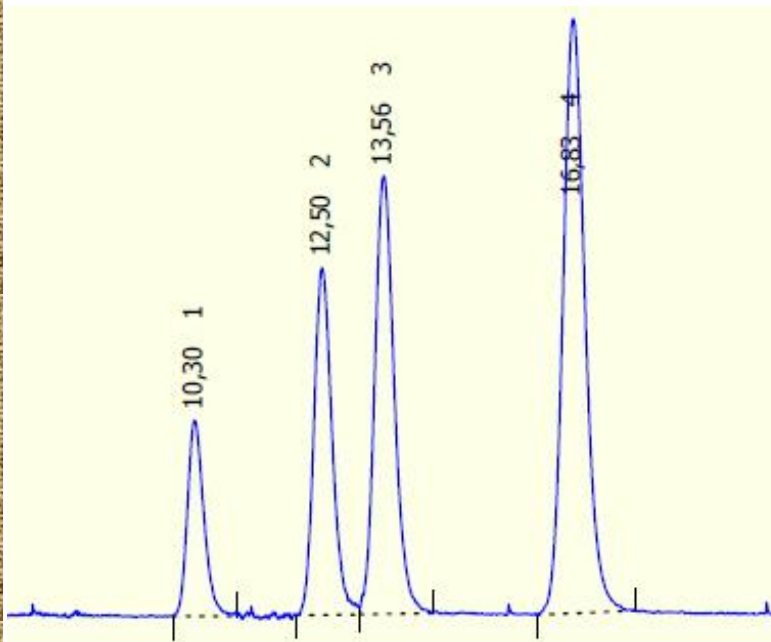
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια

ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑ



ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Στάυρος Γιαννιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (επιβλέπων)
Γεώργιος – Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.
Παναγιώτης Σκανδάμης, Λέκτορας Γ.Π.Α.
Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2009

Ευχαριστίες

Θα ήθελα ιδιαίτερος να ευχαριστήσω τον κο Ανδρέα Δήμου για την αμέριστη βοήθεια και πολύ καλή συνεργασία που είχαμε όλο το διάστημα της εκπόνησης της μελέτης. Πολλές ευχαριστίες σε όλο το εργαστήριο του Ποιοτικού Ελέγχου και ιδιαίτερος στην κα Γιαλιντάκη Μαρία, την κα Καπάνταη Μαρία και τη Νατάσα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αφροδίτη και τη Μαρία από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

Ιδιαίτερος επίσης ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ.Σωτήρη Τζάμο και όλο το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας για την πολύτιμη βοήθειά τους στην απομόνωση των μυκήτων κατά την πρώτη φάση της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης τους 4 φυσικοπαραγωγούς για την πολύ καλή συνεργασία μας.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κο Γιαννιώτη Σταύρο, διότι εκτός από την επιστημονική-τεχνική του καθοδήγηση, υποστήριξε κάθε προσπάθεια, ενθάρρυνε οποιαδήποτε πρωτοβουλία με εμπιστοσύνη και σεβασμό στο πρόσωπό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους «δικούς» μου ανθρώπους για την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα της προσπάθειάς μου και «ανέχθηκαν» την ελλιπή μου παρουσία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | | |
|------------------|--|------|----|
| | ΠΕΡΙΛΗΨΗ | σελ. | 1 |
| | ΠΡΟΛΟΓΟΣ | | 4 |
| A. | ΕΙΣΑΓΩΓΗ | | 6 |
| A.1 | ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΓΕΝΙΚΑ | | |
| A.1.1 | Ιστορικά – Στατιστικά στοιχεία | | 6 |
| A.1.2 | Παθογόνα αίτια | | 6 |
| A.1.3 | Επιπτώσεις στα ζώα και τους ανθρώπους | | 7 |
| A.1.4 | Οικονομικές επιπτώσεις | | 9 |
| A.1.5 | Φυσικές – Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών | | 11 |
| <i>A.1.5.1</i> | <i>Χημικές ιδιότητες</i> | | 11 |
| <i>A.1.5.2</i> | <i>Φυσικές ιδιότητες</i> | | 13 |
| <i>A.1.5.3</i> | <i>Χημικές αντιδράσεις αφλατοξινών</i> | | 14 |
| A.1.6 | Νομοθεσία | | 15 |
| <i>A.1.6.1</i> | <i>Ευρωπαϊκή νομοθεσία</i> | | 15 |
| <i>A.1.6.2</i> | <i>Παγκόσμια νομοθεσία</i> | | 17 |
| A.2 | ΤΑ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ | | 19 |
| A.2.1 | Καταγωγή και Ιστορία της φιστικιάς | | 19 |
| A.2.2 | Βοτανική ταξινόμηση – Μορφολογία - Βιολογία | | 21 |
| A.2.3 | Κλίμα και έδαφος | | 23 |
| A.2.4 | Φύτευση, άρδευση, κλάδεμα, λίπανση | | 24 |
| A.2.5 | Προβλήματα φυτοπροστασίας | | 25 |
| <i>A.2.5.1</i> | <i>Μυκητολογικές ασθένειες της φιστικιάς στην Ελλάδα</i> | | 25 |
| <i>A.2.5.5.1</i> | <i>Προσβολή από τους μύκητες του γένους Aspergillus</i> | | 26 |
| <i>A.2.5.2</i> | <i>Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα</i> | | 27 |
| <i>A.2.5.2.1</i> | <i>Προσβολή της φιστικιάς από ευρύτομο</i> | | 27 |
| <i>A.2.5.2.2</i> | <i>Προσβολή της φιστικιάς από το σκώρο</i> | | 28 |
| <i>A.2.5.2.3</i> | <i>Προσβολή της φιστικιάς από τη ψύλλα</i> | | 29 |
| A.2.6 | Ωρίμανση | | 30 |
| A.2.7 | Συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση | | 30 |
| A.2.8 | Προσδοκώμενη χρήση | | 31 |
| A.2.9 | Παραγωγή και Εμπόριο κελυφωτών φιστικιών | | 32 |
| A.3 | ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ | | 34 |
| A.3.1 | Γενικά στοιχεία | | 34 |
| A.3.2 | Ιστορική αναδρομή | | 34 |
| A.3.3 | Μορφολογία ασπεργίλλων – Περιγραφή – Ταξινόμηση | | 35 |
| A.3.4 | Βιομηχανική χρήση ασπεργίλλων | | 36 |
| A.3.5 | Δευτερογενής μεταβολισμός ασπεργίλλων | | 37 |
| A.3.6 | Παθογένεια ασπεργίλλων | | 38 |
| A.3.7 | Η ομάδα <i>Aspergillus flavus</i> – Τα είδη <i>A.flavus</i> και <i>A.parasiticus</i> | | 39 |
| <i>A.3.7.1</i> | <i>Βασικά ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά</i> | | 39 |
| <i>A.3.7.2</i> | <i>Γενετική δομή του A.flavus</i> | | 40 |
| <i>A.3.7.3</i> | <i>Οικολογία του A.flavus</i> | | 41 |
| <i>A.3.7.4</i> | <i>Σημασία της ομάδας του A.flavus</i> | σελ | 42 |
| <i>A.3.7.5</i> | <i>Ο A.flavus ως φυτοπαθογόνο</i> | | 43 |
| <i>A.3.7.6</i> | <i>Ο A.flavus ως ζωοπαθογόνο</i> | | 43 |
| <i>A.3.7.7</i> | <i>Αφλατοξίκωση</i> | | 44 |
| A.4 | ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ | | 46 |

| | | | |
|----------------|--|------|-----|
| A.4.1 | Βιοσύνθεση αφλατοξίνης | | 46 |
| A.4.1.1 | Μονοπάτια και ένζυμα στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης | | 46 |
| A.4.1.2 | Τα γονίδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης αφλατοξίνης | | 47 |
| A.4.1.3 | Ρύθμιση της βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης | | 48 |
| A.4.2 | Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης | | 49 |
| A.4.2.1 | Παράγοντες θρέψης | | 51 |
| A.4.2.2 | Περιβαλλοντικοί παράγοντες | | 51 |
| A.4.2.3 | Παράγοντες ανάπτυξης | | 53 |
| A.4.2.4 | Παράγοντες στρες & αντιοξειδωτικά | | 54 |
| A.5 | ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ | | 55 |
| A.5.1 | Βιολογικός έλεγχος με μη τοξικογόνα στελέχη <i>A.flavus</i> και σαπροφυτικές ζύμες | | 55 |
| A.5.2 | Ανθεκτικότητα ξενιστή μέσω πολλαπλασιασμού και γενετικής μηχανικής | | 56 |
| A.5.3 | Καταπολέμηση | | 56 |
| A.6 | ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ | | 57 |
| A.6.1 | Δειγματοληψία | | 59 |
| A.6.2 | Προετοιμασία δείγματος | | 59 |
| A.6.3 | Εκχύλιση | | 59 |
| A.6.4 | Καθαρισμός | | 61 |
| A.6.5 | Μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών | | 62 |
| A.6.5.1 | TLC – HPLC- ELISA | | 62 |
| A.6.5.2 | NP-HPLC και RP-HPLC | | 63 |
| A.6.5.3 | Παραγωγοποίηση | | 63 |
| A.7 | ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | | 66 |
| B. | ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ | | 67 |
| B.1 | Προσδιορισμός πειραματικών αγρών – σήμανση δένδρων | | 67 |
| B.2 | Δειγματοληψίες | | 68 |
| B.3 | Συγκομιδή - Αποφλοιώση – Ξήρανση - Αποθήκευση | | 78 |
| B.4 | Τεχνικές απομόνωσης μυκήτων | | 78 |
| B.5 | Αξιολόγηση μικροχλωρίδας | | 81 |
| B.6 | Ανάλυση αφλατοξίνης | | 82 |
| B.6.1 | Σχεδιασμός ανάλυσης | | 82 |
| B.6.1.1 | Υπολογισμοί | | 82 |
| B.6.2 | Υλικά | | 83 |
| B.6.3 | Αντιδραστήρια | | 83 |
| B.6.4 | Συσκευές και Όργανα | | 84 |
| B.6.5 | Μέθοδοι | | 85 |
| B.6.5.1 | Προετοιμασία πρότυπων δ/των μίγματος αφλατοξινών | Σελ. | 85 |
| B.6.5.2 | Καμπύλη βαθμονόμησης | | 85 |
| B.6.5.3 | Ανάλυση δειγμάτων αγρού για αφλατοξίνη | | 91 |
| B.6.5.3.1 | Προετοιμασία δειγμάτων | | 91 |
| B.6.5.3.2 | Άλεση-Εκχύλιση | | 92 |
| B.6.5.3.3 | Καθαρισμός δειγμάτων με χρήση στηλών IAC | | 93 |
| B.6.5.4 | Ανάλυση δειγμάτων ταυτοποίησης για αφλατοξίνη | | 97 |
| B.6.5.5 | Δοκιμές ανάκτησης | | 100 |
| B.6.5.6 | Ανίχνευση αφλατοξινών με HPLC | | 102 |
| B.6.5.6.1 | Ποσοτική ανάλυση | | 103 |
| B.6.5.6.2 | Στατιστική επεξεργασία | | 103 |

| | | | |
|------------|--|------------|-----|
| Γ. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | | 104 |
| Γ.1 | Καταγραφές πειραματικών αγρών - Ιστορικό | | 104 |
| Γ.2 | Αποτελέσματα Δειγμάτων Ταυτοποίησης – Μέτρηση μυκήτων στα τριβλία | | 108 |
| Γ.2.1 | Αποτελέσματα 1 ^{ης} Δειγματοληψίας – Αρχή Ωρίμανσης | | 109 |
| Γ.2.2 | Αποτελέσματα 2 ^{ης} Δειγματοληψίας - Ωρίμανση | | 113 |
| Γ.2.3 | Αποτελέσματα 3 ^{ης} Δειγματοληψίας - Συγκομιδή | | 117 |
| Γ.2.4 | Αποτελέσματα 4 ^{ης} Δειγματοληψίας - Ξήρανση | | 125 |
| Γ.2.5 | Αποτελέσματα 5 ^{ης} Δειγματοληψίας – Αποθήκευση | | 139 |
| Γ.2.6 | Διαγραμματική απεικόνιση μετρήσεων ανα πειραματικό αγρό – Στατιστική ανάλυση | | 146 |
| Γ.2.6.1 | Κτήμα Α | | 146 |
| Γ.2.6.2 | Κτήμα Β | | 148 |
| Γ.2.6.3 | Κτήμα Γ | | 149 |
| Γ.2.6.4 | Κτήμα Δ | | 151 |
| Γ.2.6.5 | Όλα τα κτήματα | | 153 |
| Γ.3 | Αποτελέσματα Δειγμάτων Ταυτοποίησης – Αναλύσεις σε HPLC για ανίχνευση αφλατοξίνης | | 155 |
| Γ.3.1 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Α | | 155 |
| Γ.3.2 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Β | | 159 |
| Γ.3.3 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Γ | | 163 |
| Γ.3.4 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Δ | | 166 |
| Γ.3.5 | Σύγκριση αποτελεσμάτων αναλύσεων μεταξύ των κτημάτων | | 170 |
| Γ.4 | Αποτελέσματα Δειγμάτων Αγρού – Αναλύσεις σε HPLC για ανίχνευση αφλατοξίνης | | 173 |
| Γ.4.1 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Α | | 173 |
| Γ.4.1.1 | Στατιστική επεξεργασία – Κτήμα Α Δείγματα Αγρού | | 176 |
| Γ.4.1.2 | Συζήτηση – Κτήμα Α Δείγματα Αγρού | | 177 |
| Γ.4.2 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Β | | 178 |
| Γ.4.2.1 | Στατιστική επεξεργασία – Κτήμα Β Δείγματα Αγρού | | 180 |
| Γ.4.2.2 | Συζήτηση – Κτήμα Β Δείγματα Αγρού | | 180 |
| Γ.4.3 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Γ | | 181 |
| Γ.4.3.1 | Στατιστική επεξεργασία – Κτήμα Γ Δείγματα Αγρού | | 183 |
| Γ.4.3.2 | Συζήτηση – Κτήμα Γ Δείγματα Αγρού | | 183 |
| Γ.4.4 | Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Δ | | 184 |
| Γ.4.4.1 | Στατιστική επεξεργασία – Κτήμα Δ Δείγματα Αγρού | | 187 |
| Γ.4.4.2 | Συζήτηση – Κτήμα Δ Δείγματα Αγρού | | 188 |
| Γ.4.5 | Σύγκριση αποτελεσμάτων όλων των πειραματικών αγρών | σελ | 189 |
| Δ. | ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | | 194 |
| Δ.1 | Μόλυνση φιστικιών | | 194 |
| Δ.1.1 | Συσχέτιση με τα στάδια παραγωγής | | 194 |
| Δ.1.1.1 | Παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή | | 194 |
| Δ.1.1.2 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> πριν τη συγκομιδή και ανίχνευση αφλατοξίνης στα δείγματα ταυτοποίησης | | 195 |
| Δ.1.1.3 | Παραγωγή αφλατοξίνης μετά τη συγκομιδή | | 196 |
| Δ.1.1.4 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> μετά τη συγκομιδή και ανίχνευση αφλατοξίνης στα δείγματα ταυτοποίησης | | 197 |
| Δ.1.2 | Συσχέτιση με εντομολογικές προσβολές, δυσμορφίες καρπού, μεταχρωματισμούς και καλλιεργητικές φροντίδες | | 198 |
| Δ.1.3 | Συσχέτιση με τους καρπούς με κηλίδες | | 202 |
| Δ.1.4 | Συσχέτιση με τη μέθοδο ξήρανσης | | 204 |
| Δ.1.5 | Συσχέτιση με τη μέθοδο αποθήκευσης | | 205 |

| | | | |
|------------|--|--|-----|
| Δ.2 | Επέμβαση με διάλυμα NaCl (αλάτι) | | 207 |
| Δ.3 | Παρουσία μυκήτων <i>A.flavus</i> – <i>A.niger</i> | | 209 |
| Δ.3.1 | Παρουσία και σημασία του <i>A.niger</i> | | 209 |
| Δ.3.2 | Αλληλεπίδραση <i>A.niger</i> - <i>A.flavus</i> | | 210 |
| Δ.4 | Μέτρα αντιμετώπισης του προβλήματος - Πρόληψη | | 212 |
| Δ.5 | Περαιτέρω μελέτη | | 214 |
| Ε. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | | 216 |

| | | | |
|------------|---|--|--|
| ΣΤ. | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ | | |
| 1. | Κατάλογος Πινάκων, Εικόνων και Διαγραμμάτων Μελέτης | | |
| 2. | Κλίμακα προσδιορισμού σταδίου καλλιέργειας κατά BBCH | | |
| 3. | Χρωματογραφήματα αναλύσεων βαθμονόμησης | | |
| 4. | Χρωματογραφήματα αναλύσεων ανάκτησης | | |
| 5. | Χρωματογραφήματα αναλύσεων δειγμάτων ταυτοποίησης | | |
| 6. | Χρωματογραφήματα δειγμάτων αγρού | | |
| | | | |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με τη μόλυνση των ελληνικών κελυφωτών φιστικιών με αφλατοξίνη και πραγματοποιήθηκε σε όλες τις φάσεις παραγωγής: από την αρχή της ωρίμανσης μέχρι και την αποθήκευση. Σκοπός της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί το στάδιο που παράγεται η αφλατοξίνη, πώς εξελίσσεται η μόλυνση κατά τη διάρκεια των σταδίων παραγωγής και επεξεργασίας, κάτω από ποιες συνθήκες και ποιες πρακτικές, με απώτερο στόχο να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα πριν ή/και μετά τη συγκομιδή, ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση αφλατοξίνης στο τελικό προϊόν στα αποδεκτά όρια.

Για τον παραπάνω σκοπό, επιλέγησαν 4 πειραματικοί φιστικεώνες, σημάνθηκαν 20 δένδρα από κάθε αγρό και συλλέχθηκαν 5 δείγματα για ανάλυση αφλατοξίνης. Η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 31-7-09 όταν οι καρποί ήταν στην αρχή της ωρίμανσης, η δεύτερη έγινε στην ωρίμανση στις 13-8-09, η τρίτη στη συγκομιδή (20-30 Αυγούστου ανάλογα με την ημερομηνία συγκομιδής που όρισε ο κάθε παραγωγός) και οι δύο τελευταίες στην ξήρανση και στην αποθήκευση (45 ημέρες μετά την ξήρανση). Σε κάθε δειγματοληψία, εκτός από το παραπάνω δείγμα συλλέχθηκε ένα επιπλέον δείγμα 30 τυχαίων καρπών για ανίχνευση αφλατοξίνης και απομόνωσης/ταυτοποίησης μυκήτων τοποθετώντας τους σε τριβλίο σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Από τα 3 πρώτα στάδια συλλέχθηκαν 30 εξωτερικά άθικτοι, υγιείς καρποί και 30 προβληματικοί καρποί με εμφανή προσβολή από έντομα, με μεταχρωματισμούς, μαύροι με εξωτερικά κακή εικόνα. Επιπλέον, στα 2 από τα 4 κτήματα πραγματοποιήθηκε μία δοκιμαστική εφαρμογή με διάλυμα NaCl 25% και 35% μετά την αποφλοιώση και πριν την ξήρανση. Σκοπός αυτής της εφαρμογής ήταν να ερευνηθεί τυχόν επίδραση στην παραγωγή αφλατοξίνης και την τελική συγκέντρωση. Σε όλα τα στάδια, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ 401/2006 23-2-06. Η ανάλυση αφλατοξίνης έγινε με τη χρήση HPLC σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του AOAC.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι το πιο κρίσιμο στάδιο για την παραγωγή αφλατοξίνης είναι η ωρίμανση λόγω του ότι ήταν το πρώτο στάδιο που ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από τα επιτρεπτά όρια σε όλους τους πειραματικούς αγρούς. Στη συγκομιδή, η συγκέντρωση αφλατοξίνης ήταν ακόμα υψηλότερη. Μετά τη συγκομιδή, οι διαφορές μεταξύ των φιστικιών ως προς την ποσότητα

αφλατοξίνης εξαρτώνταν κυρίως από την ποσότητα της αφλατοξίνης που είχαν οι καρποί πριν τη συγκομιδή, την μέθοδο αποξήρανσης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα από τις απομονώσεις των μυκήτων έδειξαν ότι στο πρώτο στάδιο (αρχή ωρίμανσης) ο *A.flavus* ταυτοποιήθηκε μόνο στο δείγμα των προβληματικών καρπών. Στα επόμενα στάδια άρχισε να απομονώνεται και στους εξωτερικά υγιείς καρπούς. Η ανάλυση αφλατοξίνης των δειγμάτων με τους προβληματικούς καρπούς έδειξε πολύ υψηλές ποσότητες της B₁ αφλατοξίνης. Όσον αφορά την εφαρμογή του διαλύματος NaCl πριν την ξήρανση, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κανονικά αποξηραμένων καρπών και αυτών με την εφαρμογή διαλύματος NaCl ούτε ως προς την παρουσία του *A.flavus* ούτε στη συγκέντρωση αφλατοξίνης.

ABSTRACT

The present study concerning aflatoxin contamination of greek pistachios was conducted in all production steps, from field to storage. The aim of the study was to determine the production step that aflatoxin is produced and under which conditions or handling practices so as suitable measures to be taken (pre-harvest or post-harvest) in order for the aflatoxin concentration in the end product to be within permitted limits.

For this purpose, 4 experimental pistachio orchards were selected with 20 trees each and totally 5 samples were taken from every orchard for aflatoxin analysis. The first sample was taken at early mature stage on 31st July, the second at mature on 13th August, the third at harvest (20th-30th August) and the last two at drying and storage (45 days after drying). An extra sample of 30 nuts was collected in parallel with the previously mentioned samples for both aflatoxin determination and fungal isolation by plating in selective artificial substrate. From the first 3 steps 30 externally healthy, intact nuts and 30 nuts with obvious insect damage or hull discoloration, dark with bad appearance were collected. Furthermore, an application with 25% and 35% sodium chloride solution after dehulling and before drying was tested for its effect in aflatoxin production and concentration. At all stages, sampling procedure was according to Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23rd February 2006. Aflatoxin analysis conducted with HPLC according to AOAC Official Methods.

Results showed that the most critical step for aflatoxin production is maturity because it was the first stage that aflatoxin was detected at concentration above the limit. At harvest, aflatoxin concentration was even higher. At post-harvest, aflatoxin contamination varied among orchards depending on the aflatoxin quantity at pre-harvest stage, the drying method and storage condition. The results from fungal isolation showed that at the early mature stage *A.flavus* occurred only in damaged nuts. In the following stages, it was also observed in intact nuts too. Aflatoxin analysis of the samples with damaged nuts showed very high quantities of B₁ aflatoxin. No differences either in presence of *A.flavus* or in aflatoxin concentration were observed among samples with or without salt application before drying.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανάγκη του ανθρώπου για τροφή είναι συνυφασμένη με την ίδια του την ύπαρξη. Παράλληλα όμως, τα τρόφιμα αποτελούν οικοσύστημα ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών, αλλοιογόνων αλλά και παθογόνων για τον άνθρωπο. Εφόσον επικρατήσουν κατάλληλες συνθήκες οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται και συνεπώς το τρόφιμο αλλοιώνεται ή/και μολύνεται. Μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών, οι μύκητες αποτελούν μια ιδιαίτερος σημαντική ομάδα, διότι όχι μόνο αλλοιώνουν το τρόφιμο αλλά παράγουν και μυκοτοξίνες. Η παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι ανεπιθύμητη διότι μπορεί να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες και αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού μυκήτων του γένους *Aspergillus*⁵¹. Θεωρούνται ως το πιο μελετημένο άθροισμα μυκοτοξινών και η ανακάλυψη τους το 1960 αποτέλεσε ορόσημο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της επιστήμης της μυκοτοξικολογίας αυξάνοντας παράλληλα το ενδιαφέρον για τις επιβλαβείς επιδράσεις των μεταβολιτών των μυκήτων στην υγεία ανθρώπων και ζώων. Οι αφλατοξίνες θεωρούνται έντονα τοξικές προκαλώντας μεταξύ άλλων μεταλλάξεις στο γενετικό κώδικα, καρκίνο του ήπατος και ανοσοκαταστολή, ενώ έχει αποδειχθεί και η συσχέτιση τους με την εκδήλωση άλλων ασθενειών όπως η ηπατίτιδα Β, η κίρρωση του ήπατος και το σύνδρομο Reye. Οι αφλατοξίνες έχουν ανιχνευθεί στα περισσότερα αγροτικά προϊόντα με ιδιαίτερος σημαντική παρουσία τους στους ξηρούς καρπούς και πιο συγκεκριμένα στα κελυφωτά φιστίκια. Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από τους συγκεκριμένους μύκητες, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή). Η παρουσία των μυκήτων δεν σημειοδοτεί κατ'ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης και οι συνθήκες για την παραγωγή αφλατοξίνης είναι πιο οριακές από αυτές για την ανάπτυξη του μύκητα και συνδέονται με παράγοντες που προκαλούν στρες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια). Στην οικογένεια των αφλατοξινών ανήκουν περίπου 20 διαφορετικές ως προς τη δομή τοξίνες με πιο σημαντικές τις B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ και M₂ οι οποίες είναι και οι μόνες, που βρίσκονται στα τρόφιμα. Στα κελυφωτά φιστίκια υπάρχουν οι 4: B₁, B₂, G₁, G₂.

Όλες οι παραγωγές χώρες κελυφωτών φιστικών αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο μόλυνσης των καρπών με αφλατοξίνες, με αποτέλεσμα να διενεργούνται εντατικοί έλεγχοι, οι οποίοι επιφέρουν σημαντικό επιπλέον κόστος στο προϊόν. Στο παρελθόν, η μόλυνση των κελυφωτών φιστικών με αφλατοξίνες είχε συνδεθεί κυρίως με χώρες όπου επικρατεί ζεστό και υγρό κλίμα και οι συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης του προϊόντος ήταν ακατάλληλες. Τα τελευταία χρόνια όμως, έχουν ανιχνευθεί αφλατοξίνες σε κελυφωτά φιστικά τα οποία προέρχονται από όλες τις γνωστές παραγωγές χώρες ανεξαρτήτως εφοδοκλιματικών συνθηκών. Χώρες όπως η Ελλάδα, με πιο ξηροθερμικό κλίμα, είχε θεωρηθεί ότι η παρουσία αφλατοξινών δεν ήταν πιθανή. Εξαιρέσεις άρχισαν να εμφανίζονται από το 2001, όπου ορισμένες παρτίδες κελυφωτών φιστικών για εξαγωγή βρέθηκαν οριακά ακατάλληλες. Αυτά τα περιστατικά θεωρήθηκαν μεμονωμένα και δεν διερευνήθηκαν περαιτέρω. Αργότερα, το 2005, στα πλαίσια ελέγχου των προϊόντων ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) από τη Δ/ση Γεωργίας της Νομαρχίας Πειραιά έγινε δειγματοληψία για έλεγχο αφλατοξινών στο ΠΟΠ προϊόν «Φιστίκι Αιγίνης» όπου τα αποτελέσματα αιφνιδίασαν τόσο τους εμπόρους-διακινητές όσο και τους ελεγκτές γεωπόνους. Με αφορμή αυτό το περιστατικό, άρχισε να διερευνείται η έκταση του προβλήματος καθώς και τα πιθανά αίτια. Με την πεποίθηση ότι τα ζητήματα που σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων δεν επιλύονται μόνο με ελέγχους και κυρώσεις ξεκίνησε η παρούσα μελέτη του προβλήματος της μόλυνσης των κελυφωτών φιστικών στην Ελλάδα, με την ελπίδα να βοηθήσει στην αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος ώστε να συνεχιστεί η παραγωγή ενός ασφαλούς και ποιοτικού προϊόντος.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

A.1.1 Ιστορικά – Στατιστικά στοιχεία

Το 1960, στη Μεγάλη Βρετανία πάνω από 100000 γαλοπούλες (ασθένεια X)^{17,18,20,3A} πέθαναν λόγω τοξίνωσης, η οποία προκλήθηκε από τοξικούς μεταβολίτες μυκήτων³. Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε ένα συστατικό της διατροφής τους, τις αραχίδες σε ποσοστό από 0,5-16%¹⁶, οι οποίες είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *Aspergillus flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτό τον καρπό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του³. Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μία σειρά φθοριζόντων ουσιών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στη συνέχεια μετονομάστηκαν αφλατοξίνες (Afs)³. Εξάρσεις μυκοτοξίκωσης προκλήθηκαν τον επόμενο χρόνο (1961) σε βοοειδή και χοίρους οι οποίοι είχαν ήδη διατραφεί με μολυσμένο γεύμα αραχίδας¹⁶.

Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α., παρατηρήθηκε μία έξαρση καρκίνου του ήπατος (hepatoma) στις πέστροφες, το οποίο αργότερα αποδόθηκε στην μόλυνση από αφλατοξίνες ενός μίγματος βαμβακόσπορου, συστατικού της διατροφής αυτών των ψαριών³.

Στην Ινδία, το 1974, καταγράφηκε η πιο σοβαρή έξαρση ηπατίτιδας στους ανθρώπους λόγω αφλατοξίκωσης (οξεία τοξικότητα από αφλατοξίνες)³. Στην εν λόγω περίπτωση, η αφλατοξίκωση προήλθε από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού από αφλατοξίνες στα επίπεδα από 0,25 έως 15 mg/kg και οι 108 από τους 397 ασθενείς πέθαναν³. Πιο πρόσφατα, στην Κένυα το 2005, το πρόβλημα της αφλατοξίνης επανεμφανίστηκε οδηγώντας τουλάχιστο 125 ανθρώπους στο θάνατο από κατανάλωση καλαμποκιού μολυσμένου με αφλατοξίνη¹⁷.

A.1.2 Παθογόνα αίτια

Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων όπως ο *Aspergillus flavus* και ο *Aspergillus parasiticus* ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού^{16,20}. Επίσης διάφορα άλλα είδη ασπεργίλλων όπως οι *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A.bombycis*, *A.ochraceoroseus* και *Emericella venezuelensis* έχει

αποδειχθεί ότι παράγουν αφλατοξίνες²⁰. Επειδή οι τέσσερις βασικές αφλατοξίνες (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)^{3A} απομονώθηκαν αρχικά από καλλιέργειες του *A. flavus*, τα πρώτα γράμματα του μύκητα ('A' και 'fla') χρησιμοποιήθηκαν για την ονομασία των τοξινών²⁰. Άλλες τέσσερις αφλατοξίνες οι M_1 , M_2 , P_1 , Q_1 , B_{2A} και G_{2A} , που παράγονται σε μικρότερες ποσότητες απομονώθηκαν στην πορεία από καλλιέργειες των *A. flavus* και *A. parasiticus*²⁰. Ο *A. flavus* παράγει τις B_1 και B_2 , καθώς και κάποιες συγγενείς ενώσεις όπως η M_1 , ενώ ο *A. parasiticus* παράγει τις G_1 και G_2 καθώς και τις B_1 και B_2 .^{17,20}

Για πρώτη φορά εντοπίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '60⁶. Η απανταχού παρουσία αυτών των μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνη καθώς και η δραστική βιολογική δράση των μυκοτοξινών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις έχει διεγείρει μία εκπληκτικά ογκώδη έρευνα σε διάφορα επίπεδα³ για πάνω από 40 χρόνια κυρίως στους τομείς της βιολογίας, τοξικολογίας και βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης²⁰.

A.1.3 Επιπτώσεις στα ζώα και τους ανθρώπους

Μυκοτοξίνες ανιχνεύονται συχνά σε τρόφιμα και ζωοτροφές σε όλο τον κόσμο²⁰. Έχει υπολογιστεί ότι το ¼ των καλλιεργειών παγκοσμίως έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες σύμφωνα με τον FAO – Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας^{20,3A}. Η παρουσία των «αόρατων» μυκοτοξινών είναι ανεπιθύμητη στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές διότι μπορεί να προκαλέσουν πολύ σοβαρά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων¹⁸. Οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ο πιο σημαντικός μη-μολυσματικός, χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων²⁰. Αν και η μελέτη όλων των τοξικών ουσιών στα τρόφιμα έχει αυξηθεί λόγω νομοθετικών απαιτήσεων, στις αφλατοξίνες δίδεται ιδιαίτερη προσοχή σε σχέση με τις άλλες μυκοτοξίνες λόγω του ότι θεωρούνται ιδιαίτερος τοξικές και καρκινογόνες ουσίες για τον άνθρωπο και τα ζώα^{14,20} και συνδέονται με τον καρκίνο του ήπατος και διάφορα τοξικά σύνδρομα στα ζώα¹⁷. Η ομάδα των αφλατοξινών περιλαμβάνει διάφορες ενώσεις η παρουσία των οποίων στα τρόφιμα και η τοξικότητά τους ποικίλουν. Τοξικολογικές μελέτες δείχνουν ότι πτηνά, μύες, επίμυες, κόνικλοι, πέστροφες και ένας αριθμός από άλλα σπονδυλωτά είναι ευαίσθητα στη μόλυνση από αφλατοξίνη²⁰. Πολλές αφλατοξίνες εκδηλώνουν τόσο

οξεία όσο και χρόνια τοξικότητα, περιλαμβάνοντας μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο και τερατογόνο δράση σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών³. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως ουσίες υψηλής τοξικότητας με καρκινογόνο δράση στον άνθρωπο και τα ζώα⁷. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα Τρόφιμα (EET), όσον αφορά τις αφλατοξίνες δήλωσε στη γνώμη της 23ης Σεπτεμβρίου 1994, ότι οι αφλατοξίνες είναι γονιδιοτοξικά καρκινογόνα⁴. Η ευρεία παρουσία αυτών των μυκήτων σημαίνει ότι διάφορα αγροτικά προϊόντα είναι ευάλωτα στην μόλυνση από τους ασπέργιλλους³ και γι' αυτό είναι παρούσες σε μεγάλο αριθμό τροφίμων, όπως π.χ. στα δημητριακά (καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, αλεύρι σίτου), όσπρια (φασόλια), στους ξηρούς καρπούς (αραχίδα, κελυφωτά φιστίκια, αμύγδαλα, καρύδια κ.α.), στο σόργο, στα σύκα, αποξηραμένα φρούτα, μπαχαρικά, αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα, μύρα κ.α.³. Λόγω του μεταβολισμού αυτών των μυκοτοξινών, η κατανάλωση μολυσμένης ζωοτροφής οδηγεί επίσης στη μόλυνση των προϊόντων ζωϊκής προέλευσης όπως το κρέας, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα³. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα απαντώνται οι αφλατοξίνες M₁ και M₂ μεταβολίτες (προϊόντα υδρόλυσης) των B₁ και B₂ και οι οποίες παράγονται όταν τα ζώα γαλακτοπαραγωγής τρέφονται με τροφές που περιέχουν αφλατοξίνες^{3,20}.

Οι ενώσεις που απομονώνονται συχνότερα είναι οι B₁, B₂, G₁ και G₂.^{7,3A} Από τις παραπάνω, η αφλατοξίνη B₁ είναι η περισσότερο τοξική⁷, γνωστή και ως καρκινογόνος ουσία⁶. Από τοξικολογικές μελέτες σε ενήλικες πάπιες έχουν προκύψει διάφορες τιμές LD₅₀ όσον αφορά την τοξικότητα, καρκινογένεση και μεταλλαξιγένεση των τεσσάρων κύριων αφλατοξινών, των οποίων η σειρά είναι: B₁>G₁>B₂>G₂.^{3A} Η Διεθνής Υπηρεσία για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) έχει κατατάξει την B₁ αφλατοξίνη στον κατάλογο των πιθανών καρκινογόνων για τον άνθρωπο ουσιών³. Διάφορες μελέτες συνδέουν την έκθεση στις αφλατοξίνες με μία αυξημένη πιθανότητα ύπαρξης καρκίνου του ήπατος και των πνευμόνων⁶.

Η ασθένεια γνωστή ως «Ινδική παιδική κίρρωση» (cirrhosis of Indian childhood) οφείλεται εν μέρει σε μόλυνση από αφλατοξίνες^{3,52}. Επιπλέον, το σύνδρομο Reye (Reye's syndrome) με συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας και εκφυλισμού των λιπών στα viscera των παιδιών έχει συσχετιστεί με την τοξικότητα των αφλατοξινών³. Αν και δεν έχει διερευνηθεί πλήρως η ευαισθησία των ανθρώπων στις αφλατοξίνες, πραγματοποιήθηκαν επιδημιολογικές μελέτες στην Αφρική και την Ασία, περιοχές όπου τα πολλά περιστατικά με καρκίνο του ήπατος που έχουν καταγραφεί έχουν

φανερώνει συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του καρκίνου και της ύπαρξης αφλατοξινών στη διατροφή των ανθρώπων^{3,52}. Στην Ταϊλάνδη, οι αφλατοξίνες B₁, G₁ και B₂ έχουν βρεθεί σε ανθρώπινο συκώτι με χρωματογραφική ανάλυση και η παρουσία των μεταβολιτών τους P₁ και Q₁ έχει συσχετιστεί με καρκινοπάθειες³.

A.1.4 Οικονομικές επιπτώσεις

Η μόλυνση των γεωργικών προϊόντων με αφλατοξίνη είναι ένα χρόνιο πρόβλημα σε πολλές παραγωγικές χώρες του κόσμου με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις. Η λίστα των γεωργικών προϊόντων πρωτογενούς παραγωγής τα οποία μπορεί να μολυνθούν από αφλατοξίνες περιλαμβάνει: σιτηρά(αραβόσιτο, σόργο, ρύζι, στάρι, κεχρί), ελαιούχους σπόρους (αραχίδα, σόγια, ηλιόσπορο, βαμβάκι), καρυκείμενα (τσίλι, μαύρο πιπέρι, κορίαντρο, τζίντζερ, κουρκούμη κ.α.) καρπούς δένδρων (αμύγδαλα, κελυφωτά φιστίκια, φουντούκια, καρύδα) και γάλα^{3A}. Η μόλυνση ιδιαίτερα των σιτηρών με αφλατοξίνη εκτός ότι θέτει σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών απειλεί επίσης και το διεθνές εμπόριο^{3A}. Τρόφιμα στα οποία ανιχνεύονται αφλατοξίνες σε όρια πάνω από αυτά που έχει θέσει η νομοθεσία κατάσχονται και καταστρέφονται. Αυτό οδηγεί σε οικονομική ζημιά πολλών δεσεκατομμυρίων δολλαρίων ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο²⁰. Έχει υπολογιστεί ότι το ¼ των καλλιεργειών παγκοσμίως έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες σύμφωνα με τον FAO – Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας^{20,3A}. Επίσης, υπολογίζεται ότι ετησίως, οι απώλειες των παραγωγών στις Η.Π.Α. σε επίπεδο καλλιέργειας από την μόλυνση με αφλατοξίνες είναι περισσότερο από 100 εκ. δολάρια. Από αυτά, τα 26 εκ. περίπου περιλαμβάνουν την αραχίδα^{3A}.

Το πρόβλημα είναι επίσης μεγάλο και στα κελυφωτά φιστίκια. Μέχρι και σήμερα, δειγματοληπτικοί έλεγχοι σε κελυφωτά φιστίκια αποδεικνύουν ότι το πρόβλημα εμφανίζεται σε μεγάλη συχνότητα. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η αφλατοξίνη παραμένει μεγάλο οικονομικό και εμπορικό πρόβλημα, το οποίο προκύπτει από την αδυναμία διάθεσης των προσβεβλημένων προϊόντων τόσο στην τοπική αγορά όσο και στη διεθνή.¹⁷ Στοιχεία με δείγματα κελυφωτών φιστικιών που έχουν καταγραφεί ως περιπτώσεις μόλυνσεων με αφλατοξίνες όπως έχουν δημοσιευθεί στο βιβλίο «Mycotoxins in Foodstuffs»¹⁸ M.Weidenbörner δίνονται στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 1)¹⁸.

Πίνακας 1.1 Δείγματα κελυφοτών φιστικιών μολυσμένων με αφλατοξίνες όπως έχουν καταγραφεί στο «Mycotoxins in Foodstuffs» M. Weidenbörner (2008)¹⁸.

| Αφλατοξίνη | Βαθμός μόλυνσης (αριθμός μολυσμένων δειγμάτων / συνολικό αριθμό) | Συγκέντρωση (ppb) | Χώρα προέλευσης | Χώρα ανίχνευσης |
|---|---|---|-----------------------------------|--------------------|
| B ₁ | 1/19 | 22 | Τυνησία | |
| | 53/856 | 1,4-206 | Κύπρος | |
| | 5/165 | 11,5-1382 | Ιαπωνία | |
| | 17/29 | 2,3-165 | | Ολλανδία |
| | 1/5 (ψημένο) 2/5 (νωπό) | 13,2 105-227,2 | | Μεγ.Βρετανία |
| | 1/1 | 4,6 | | Ιαπωνία |
| | 2/23 | 5-40 | | Γαλλία |
| | 2/6 | 15-94 | Ινδία | |
| | 4/23 | 2-41,3 | | Μεγ.Βρετανία |
| | 3/29 | >5 | | Μεγ.Βρετανία |
| B ₂ | 53/856 | 0,3-2,3 | Κύπρος | |
| | 5/165 | 0,5-260 | Ιαπωνία | |
| | 1/5 (ψημένο) 2/5 (νωπό) | 1,8 10-31,7 | | Μεγ.Βρετανία |
| | 1/6 | 75 | Ινδία | |
| G ₁ | 5/165 | ≤306 | Ιαπωνία | |
| | 1/6 | 12 | Ινδία | |
| G ₂ | 5/165 | ≤48,3 | Ιαπωνία | |
| | 1/6 | 8 | Ινδία | |
| Σύνολο B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ | 46/46 | 6-97 | Ιράν | Η.Π.Α |
| | 1/4 | 3,5 | | Πολωνία |
| | 8/24 | 3,9-175 | | Μεγ.Βρετανία |
| | 5/23 | 4-47,5 | | Μεγ.Βρετανία |
| | 3/29 | >4-106,9 | | Μεγ.Βρετανία |
| | 13/47 52/100 26/46 22/156 | 0,53-75 7,3-289 0,1-55,3 0,1-117 | Ιράν, Συρία, Τουρκία, Η.Π.Α | Κατάρ |
| | 17/175 | 5->25 | Καναδάς | |
| | 7/22 | ≤252 | Η.Π.Α. | |
| | 10/21 | ≤133 | Η.Π.Α. | |

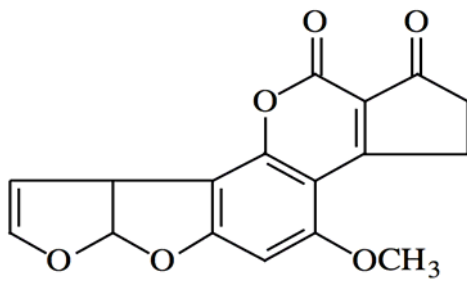
A.1.5 Φυσικές – Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών

A.1.5.1 Χημικές ιδιότητες

Οι αφλατοξίνες είναι μία ομάδα υψηλά οξυγονωμένων ετεροκυκλικών ενώσεων⁷, χαμηλού μοριακού βάρους²⁰, οι οποίες παράγονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού^{7,14,20} ορισμένων μυκήτων του *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, οι οποίοι αναπτύσσονται σε διάφορα τρόφιμα^{7,14} (ξηροί καρποί, μπαχαρικά, δημητριακά κ.α.) μεταξύ αυτών και τα κελυφωτά φιστίκια. Από χημική άποψη είναι παράγωγα δι-φουρανο-κουμαρίνης^{20,48} χαρακτηρίζονται από δι-υδροφουρανικά ή τετρα-υδροφουρανικά τμήματα συγχωνευμένα σε ένα υποκατεστημένο τμήμα κουμαρίνης (Εικόνα 1.1). Μέχρι στιγμής έχουν ανακαλυφτεί τουλάχιστο 16³ ή αλλού αναφέρεται 18^{3A} ενώσεις αφλατοξινών οι οποίες σχετίζονται δομικά³. Οι ενώσεις που απομονώνονται συχνότερα είναι οι B₁, B₂, G₁ και G₂, οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες τους M₁ και M₂ στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτη) και οι P₁ και Q₁ μεταβολίτες στο ήπαρ και τα ούρα πολλών θηλαστικών περιλαμβανομένων και των ανθρώπων³. Μεταξύ αυτών, οι G αφλατοξίνες διαφέρουν χημικά από τις B αφλατοξίνες λόγω της παρουσίας ενός 3-γαλακτονικού δακτυλίου αντί ενός κυκλοπεντενονικού δακτυλίου (cyclopentenone)³. Επίσης, στις αφλατοξίνες B₁ και G₁ υπάρχει ένας 8,9 διπλός δεσμός στον τερματικό φουρανικό δακτύλιο, ο οποίος δεν υπάρχει στις B₂ και G₂.³ (Σχήμα 1) Όμως, η μικρή αυτή διαφορά στη χημική τους δομή σχετίζεται με μία πολύ σημαντική αλλαγή στη δράση τους: οι αφλατοξίνες B₁ και G₁ είναι καρκινογόνες και θεωρούνται πολύ πιο τοξικές από τις B₂ και G₂ οι οποίες αποτελούν τα δι-υδροπαράγωγα τους.³

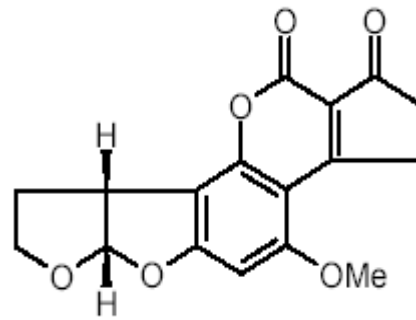
Από καθαρά χημική άποψη, οι υψηλώς συζευγμένες και σταθερές ρίζες στη δομή των αφλατοξινών προσδίδουν τη χαρακτηριστική χημική τους ιδιότητα να φθορίζουν στο υπεριώδες (UV)³. Αυτές οι τοξίνες φθορίζουν είτε μπλε (blue) είτε πράσινο (green) χρώμα υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και αυτό το χαρακτηριστικό διακρίνει τις B από τις G αφλατοξίνες^{16,48}. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μικρές διαφοροποιήσεις στη δομή τους, οι οποίες διαχωρίζουν τα διάφορα είδη των αφλατοξινών έχουν δραστική επίδραση στις αναφερόμενες ιδιότητες φθορισμού: τα B₂ και G₂ παράγωγα φθορίζουν πολύ πιο ισχυρά απ'ότι τα ακόρεστα ομόλογά τους B₁ και G₁.³ Οι αφλατοξίνες B₁ και B₂ εκπέμπουν φθορισμό στα 425 nm (μπλε) ενώ οι αφλατοξίνες G₁ και G₂ εκπέμπουν φθορισμό (πράσινο) στα 450 nm^{3A}.

Εικόνα 1.1: Χημικοί τύποι αφλατοξινών B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂.^{3A,48}



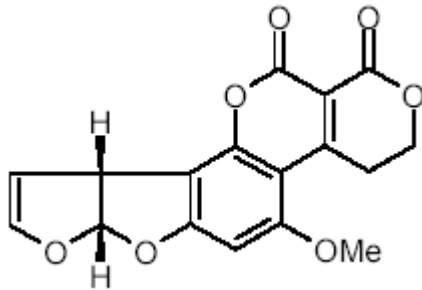
AFB₁

www.aspergillusflavus.org/aflatoxin/



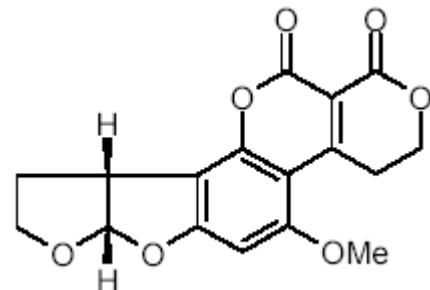
AFB₂

www.fermentek.co.il/struct/aflatoxin_b2.png



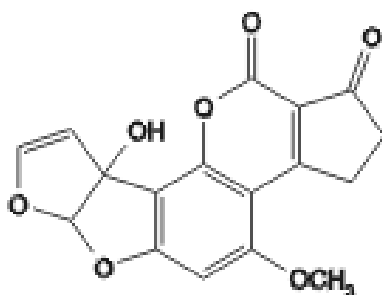
AFG₁

www.fermentek.co.il/struct/aflatoxinG1.png



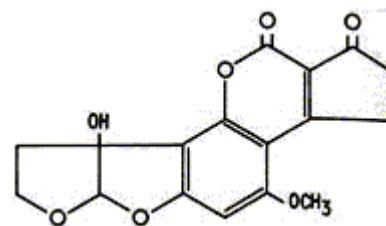
AFG₂

www.fermentek.co.il/struct/aflatoxin_G2.png



AFM₁

www.axxora.com/toxins-ALX-630-095/opfa.1.1.AL...



AFM₂

www.fermentek.co.il/aflatoxin_M2.htm

A.1.5.2 Φυσικές ιδιότητες

Οι αφλατοξίνες είναι κρυσταλλικές ουσίες^{3A}, ελεύθερα διαλυτές σε ελαφρά πολικούς³ ή μέτρια πολικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη και το διμέθυλοσουλφοξείδιο καθώς επίσης στην ακετόνη και το ακετονιτρίλιο, ενώ στο νερό διαλύονται μέχρι 10-20 mg/l. Αντίθετα είναι αδιάλυτες σε μη-πολικούς διαλύτες³. Αυτή η χαρακτηριστική τους φυσική ιδιότητα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εκχύλισης του δείγματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης.

Η πιο συχνά απαντώμενη αφλατοξίνη η B₁ έχει λευκό έως κίτρινο χρώμα, είναι κρυσταλλική και άοσμη.^{3A} Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών.

Πίνακας 1.2: Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών^{3A}

| Αφλατοξίνη | Μοριακός Τύπος | Μοριακό Βάρος | Σημείο Τήξης | UV ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ | |
|----------------|--|---------------|--------------|---------------|------------|
| | | | | 265 nm | 360-362 nm |
| B ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₆ | 312 | 268-269 | 12,400 | 21,800 |
| B ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₆ | 314 | 286-289 | 12,100 | 24,000 |
| G ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 244-246 | 9,600 | 17,700 |
| G ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 237-240 | 8,200 | 17,100 |
| M ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 299 | 14,150 | 21,250 |
| M ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 293 | 12,100 | 22,900 |

(www.mycotoxins.org)

Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερές απουσία φωτός και κυρίως υπεριώδους ακτινοβολίας ακόμα και σε θερμοκρασίες πάνω από 100 °C^{3A}. Ένα διάλυμα που προετοιμάζεται με χλωροφόρμιο ή βενζένιο είναι σταθερό για χρόνια, εφ' όσον διατηρηθεί στο σκοτάδι και σε χαμηλές θερμοκρασίες^{3A}.

A.1.5.3 Χημικές αντιδράσεις αφλατοξινών^{3,4}

Η συμπεριφορά των αφλατοξινών υπό την επίδραση διαφόρων φυσικών συνθηκών και χημικών αντιδραστηρίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα εξ αιτίας της πιθανής εφαρμογής τέτοιων μεθόδων στην αποτοξίνωση προϊόντων, που έχουν μολυνθεί. Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικά η συμπεριφορά των αφλατοξινών στην εφαρμογή θερμότητας, αλκάλαιων, οξέων και οξειδωτικών αντιδραστηρίων.

- **Θερμότητα**

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

- **Αλκάλαια**

Σε αλκαλικά διαλύματα πραγματοποιείται υδρόλυση του τμήματος της λακτόνης. Η υδρόλυση εμφανίζεται ως αντιστρεπτή, αφού έχει αποδειχθεί ότι συντελείται επανακυκλοποίηση κατόπιν οξίνισης από ένα βασικό διάλυμα που περιέχει αφλατοξίνη. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (100 °C) το άνοιγμα του δακτυλίου ακολουθείται από αποκαρβοξυλίωση και η αντίδραση μπορεί να προχωρήσει περαιτέρω προκαλώντας απώλεια της μεθόξυ ομάδας από τον αρωματικό δακτύλιο. Παρόμοια σειρά αντιδράσεων θεωρείται ότι πραγματοποιείται με την αμμώνια και διάφορες αμίνες.

- **Οξέα**

Παρουσία ανόργανων οξέων, οι AFB₁ και AFG₁ μετατρέπονται στις AFB_{2A} και AFG_{2A} εξ αιτίας της υπό οξέος καταλυόμενης προσθήκης νερού στο διπλό δεσμό του φουρανικού δακτυλίου. Παρουσία οξικού ανυδρίτη και υδροχλωρικού οξέος η αντίδραση προχωρεί περαιτέρω δίνοντας αιθόξυ παράγωγα. Παρόμοιες ενώσεις προσθήκης των AFB₁ και AFG₁ σχηματίζονται με μυρμηκικό οξύ-θειονυλοχλωρίδιο, οξικό οξύ-θειονυλοχλωρίδιο και τρι-φθοροοξικό οξύ.

- **Οξειδωτικά αντιδραστήρια**

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

- Αναγωγή

Η υδρογόνωση της AFB₁ και AFG₁ οδηγεί στην αφλατοξίνη B₂ και G₂, αντίστοιχα. Περαιτέρω αναγωγή της AFB₁ από 3 μόρια H₂ οδηγεί στην τετρα-υδροξυ-αφλατοξίνη. Αναγωγή της AFB₁ και AFB₂ με βορικό υδρίδιο του νατρίου οδήγησε στην παραγωγή αφλατοξίνης RB1 και RB2 αντίστοιχα. Αυτές προκύπτουν από το άνοιγμα του λακτονικού δακτυλίου, το οποίο ακολουθείται από αναγωγή της οξικής ομάδας και αναγωγή της κετο-ομάδας στον κυκλοπεντενονικό δακτύλιο.

A.1.6 Νομοθεσία

A.1.6.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις αφλατοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006)⁴. Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus* και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι αφλατοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές⁴. Συνιστάται επομένως να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο ευλόγως εφικτό επίπεδο⁴. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο, για λόγους ασφάλειας και δημόσιας υγείας, να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B₁. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη M₁ θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση³ ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη B₁,⁴ είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητά της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και

ιδίως από μικρά παιδιά⁴. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη.

Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις αφλατοξίνες, συνεπώς δεν μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη⁴. Συνεπώς, η ΕΕ έχει θεσπίσει νομοθετικά όρια στα υλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές¹⁴.

Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των αφλατοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών:

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

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα (SCF, http://europa.eu.int/comm/food/fs/cs/cs/index_en.html). Επιπρόσθετα, αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις.

Η μέγιστη τιμή που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για κελυφωτά φιστίκια που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα είναι 2,0 μg/kg (ppb) για την B₁ και 4,0 μg/kg (ppb) για το άθροισμα των B₁, B₂, G₁ και G₂.^{4,47} Για την αφλατοξίνη B₁ έχει θεσπιστεί ξεχωριστό όριο^{14,47}.

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σε αφλατοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων. Επόμενως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που προαναφέρθηκαν και ειδικά για τα κελυφωτά φιστίκια είναι 5,0 μg/kg (ppb) για την B₁ και 10,0 μg/kg (ppb) για το άθροισμα των B₁, B₂, G₁ και G₂.⁴ Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν αφλατοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση.⁴ Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων⁴. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από αφλατοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνσή τους⁴.

A.1.6.2 Παγκόσμια Νομοθεσία

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία αφλατοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ορίων, όπως και στην ΕΕ. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις αφλατοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως^{15,47}. Στις ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, όπου η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί σε συνδυασμό με την βελτίωση της ποιότητας ζωής παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια όσον αφορά τον έλεγχο των αφλατοξινών²⁰. Αντίθετα στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναπτυσσόμενων χωρών, κύριο μέλημα αποτελεί η καταπολέμηση της φτώχειας και των ασθενειών με αποτέλεσμα να μην έχουν

καθιερωθεί, ευρέως, κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες γενικότερα ή να μην είναι το ίδιο αυστηροί^{20,47}.

Πίνακας 1.3: Σύνοψη των υπαρχόντων κανονισμών στο τέλος του 2002

| Περιοχή | Χώρες με γνωστούς κανονισμούς | % Κάτοικοι στην περιοχή | Πιο λεπτομερείς κανονισμοί |
|---------------|-------------------------------|-------------------------|--|
| Αφρική | 14 | 54 | Μαρόκο |
| Ασία/ Ωκεανία | 25 | 89 | Κίνα και Ιράν (εναρμονισμένοι κανονισμοί για Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία) |
| Ευρώπη | 38 | 99 | Πολλές, υπό ένταξη στην Ε.Ε, χώρες (τα κράτη μέλη εναρμονισμένη νομοθεσία) |
| Λατ. Αμερική | 19 | 92 | Ουρουγουάη |
| Β. Αμερική | 2 | 100 | Καναδάς και Η.Π.Α |

www.mycotoxins.org/

Εντούτοις, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφορετικά όρια ανάμεσα στα διάφορα κράτη¹⁵. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στις Η.Π.Α. το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20 ppb για τρόφιμα και ζωοτροφές^{19,20}, ενώ για τα κελυφοτά φιστίκια στα κράτη της Ε.Ε. στα 2 ppb για την AFB₁ και 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό σημαίνει ότι στην ΕΕ τα όρια είναι 5 φορές χαμηλότερα απ'ότι στις Η.Π.Α¹⁵. Παράλληλα ο αρμόδιος αμερικανικός φορέας έχει θέσει ως όριο για την AFM₁ στο γάλα και τα συναφή προϊόντα την τιμή 0.5 µg/l, ενώ στην Ε.Ε. η αντίστοιχη τιμή είναι 0.05 µg/l. Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια, που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών.

A.2. ΤΑ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ

Η φιστικιά αποτελεί μια μικρή καλλιέργεια για την Ελλάδα αν και η έκταση που καταλαμβάνει έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες²². Είναι ένα καρποφόρο δένδρο με μικρές απαιτήσεις ως προς το έδαφος και το κλίμα²². Ο καρπός του, το κελυφωτό φιστίκι, θεωρείται από τους πιο εύγευστους ξηρούς καρπούς²². Ίσως αυτοί είναι οι λόγοι για τους οποίους η καλλιέργεια του δένδρου έχει επεκταθεί παγκοσμίως και αποτελεί αντικείμενο διεθνούς ενδιαφέροντος²².

Η καλλιέργεια της φιστικιάς παρουσιάζει αρκετά προβλήματα, τα οποία στην Ελλάδα αλλά και γενικότερα, με εξαίρεση τις ΗΠΑ, δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί²².

A.2.1 Καταγωγή και Ιστορία της φιστικιάς^{21,22,23}

Η φιστικιά (*Pistacia vera*) σύμφωνα με εργασίες ρώσων βοτανικών (Zohary 1950-1952), πρέπει να κατάγεται από την κεντρική Ασία. Το είδος *Pistacia vera* φύτεται άγριο στην Κεντρική Ασία, καλύπτοντας τεράστιες ορεινές και πεδινές εκτάσεις. Η περιοχή στην οποία αναπτύσσεται αρχίζει από το Ιράν και το Αφγανιστάν και επεκτείνεται μέσω Τουρκμεστάν, Ουζμπεκιστάν, Τατζικιστάν και Κιργιστάν μέχρι τη δυτική όχθη της λίμνης Ισσίκ-Κουλ.

Η πρώτη αναφορά στη φιστικιά στην αρχαία ελληνική γραμματεία θεωρείται ότι έγινε τον 4^ο και 3^ο αιώνα π.Χ. από τον Θεόφραστο (Περί Φυτών Ιστορία, IV, 4,7). Ο Θεόφραστος γράφει ότι, όπως λένε, στην Ινδική και στην Βακτρία (Αφγανιστάν) φύτεται ένα δένδρο όμοιο με την τέρμινθον (τερέβινθον) ως προς τα φύλλα, τους κλάδους και τα άλλα, διαφορετικό όμως προς τον καρπό. Οι καρποί είναι κάρυα που μοιάζουν με τα αμύγδαλα, αλλά είναι μικρότεροι και το κέλυφός τους δεν είναι τραχύ, στη γεύση δε, είναι πολύ νοστιμότεροι από τα αμύγδαλα και γι'αυτό προτιμώνται. Ο Θεόφραστος περιγράφει το δένδρο χωρίς να το ονομάζει. Το όνομα «πιστάκια» (από την περσική λέξη πίστα που σημαίνει φιστίκι) απαντάται για πρώτη φορά στον Νίκανδρο (Θηριακά, 891) τον 2^ο αιώνα π.Χ., ο οποίος επίσης τονίζει την ομοιότητα των καρπών με τα αμύγδαλα. Ο Διοσκουρίδης τον 1^ο αιώνα μ.Χ αναφέρει ότι τα φιστίκια παράγονται στη Συρία και έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Περί Ύλης Ιατρικής, Λόγος Πρώτος, 124). Για τα φιστίκια γράφει και ο Αθηναίος τον 2^ο αιώνα μ.Χ (Δειπνοσοφισταί, XIV, 649d-e): τα φιστίκια, τα οποία προσφέρονται στο τραπέζι των σοφών, σύμφωνα με τα τότε γνωστά, παράγονται στη Συρία και στην Αραβία. Ο

καρπός είναι λευκόφαιος, μακρός, πράσινος στο εσωτερικό και ενώ είναι λιγότερο χυμώδης από τον σπόρο της κουκουναριάς είναι περισσότερο εύγευστος από αυτόν. Αν και τα φιστίκια ήταν γνωστά ήδη στους αρχαίους Έλληνες και εκτιμώνταν για τη νόστιμη γεύση τους, δεν είναι γνωστός σήμερα ο χρόνος εισαγωγής και καλλιέργειας της φιστικιάς στην Ελλάδα. Είναι ενδιαφέρον ότι εισήχθη στη Ρώμη περίπου το 30 μ.Χ. και ταυτόχρονα στην Ισπανία (Πλίνιος, XV, 83,91). Ο Γεννάδιος (1914) ο οποίος ερεύνησε το θέμα αυτό αναφέρει ότι κατά τις πρώτες δεκαετίες του 19^{ου} αιώνα το φιστίκι ήταν «οπωρικών» της Ασίας και η φιστικιά δεν απαντιόταν στην Ελλάδα. Ο ίδιος γράφει ότι το 1856 καλλιεργούνταν στη Ζάκυνθο και μεμονωμένα δένδρα υπήρχαν και σε άλλα μέρη της Ελλάδας. Την πρώτη οργανωμένη φυτεία φιστικιάς κατάρτισε ο βιομήχανος της σοκολάτας Δ.Παυλίδης στο κτήμα του στο Ψυχικό Αττικής. Ο διευθυντής του Δημοσίου Δενδροκομείου (Βοτανικός) Ορφανίδης το 1869 άρχισε να πολλαπλασιάζει τη φιστικιά και να συνιστά την καλλιέργειά της και το έργο του συνέχισε ο διάδοχος του Π.Γεννάδιος. Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα ο Ν.Περόγλου εγκατέστησε την πρώτη φυτεία φιστικιάς στην Αίγινα. Από το κτήμα του η καλλιέργεια του δένδρου αυτού διαδόθηκε στο νησί. Το περίφημο φιστίκι Αιγίνης έχει χαρακτηριστεί προϊόν Προστατευομένης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) από την ΕΕ όπως και της Φθιώτιδας και των Μεγάρων. Αρχικά η καλλιέργεια της περιορίστηκε στα παράλια της Αττικής και στην Αίγινα. Από το 1950 άρχισε να επεκτείνεται στις περιοχές της Βοιωτίας, της Κορινθίας, της Εύβοιας και της Φθιώτιδας και από το 1968 στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Χαλκιδική, Ροδόπη), στην Κρήτη και στις Κυκλάδες. Σήμερα καλλιεργείται σε περιοχές, που χαρακτηρίζονται από ζεστό και ξηρό κλίμα, όπως είναι ο Λίβανος, η Παλαιστίνη, η Συρία, το Ιράν, η Ινδία, η Τουρκία, η νότια Ευρώπη, οι ξηροθερμικές χώρες της Ασίας και Αφρικής και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Καλιφόρνια). Η παραγωγή φιστικιών στις κυριότερες φιστικοπαραγωγούς χώρες φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Παραγωγή φιστικιών στις κυριότερες χώρες καλλιέργειας φιστικιάς (τόνοι)²²

| Χώρα | Έτος | | | |
|-------------------|-----------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | 1989-1991 | 1998 | 1999 | 2000 |
| Ιράν | 159000 | 314000 | 131000 | 200000 ^F |
| ΗΠΑ | 36000 | 85000 | 56000 | 94000 |
| Τουρκία | 39000 | 35000 | 30000 | 60000* |
| Συρία | 14000 | 36000 | 306000 | 33000 ^F |
| Κίνα ¹ | 22000 | 32000 ^F | 32000 ^F | 32000 ^F |
| Ελλάδα | 5000 | 5000* | 6000* | 7000* |
| Ιταλία | 2000 | 1000 | 3000 | - |
| Αφγανιστάν | 2000 | 4000 ^F | 3000 ^F | 3000 ^F |
| Τυνησία | 1000 | 1000 ^F | 1000 ^F | 1000 ^F |

Πηγή: FAO Production Yearbook, vol.54, 2000

F: κατ'εκτίμηση του FAO

* ανεπίσημη τιμή

¹ Η ακρίβεια των δεδομένων παραγωγής της Κίνας αμφισβητείται. Έλληνες και Αμερικανοί ειδικοί που επισκέφθηκαν την Κίνα με σκοπό την προώθηση της καλλιέργειας της φιστικιάς, δεν διαπίστωσαν την ύπαρξη συστηματικής καλλιέργειας του δένδρου αυτού.

A.2.2 Βοτανική ταξινόμηση – Μορφολογία – Βιολογία^{21,22,23}

Η φιστικιά (*Pistacia vera*) ανήκει στην οικογένεια των Anacardiaceae. Κατά τον Zohary (1952) το γένος *Pistacia* περιλαμβάνει 11 είδη. Το είδος *Pistacia vera* L. είναι η καλλιεργούμενη ήμερη φιστικιά. Στην Ελλάδα είναι αυτοφυή τα είδη *P.terebinthus* (τσικουδιά, κοκκορεβιθιά), *P.lentiscus* (σχίνος, μαστιχιά Χίου) και *P.mutica*, το οποίο σήμερα θεωρείται συνώνυμο ή υποείδος του *P.atlanticus*.

Τα υποκείμενα της φιστικιάς είναι σπορόφυτα διαφόρων ειδών του γένους *Pistacia*. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά η τσικουδιά λόγω της καλής της συγγένειας με τη φιστικιά και της ανθεκτικότητάς της στους μύκητες του γένους *Phytophthora*. Είναι όμως ευπαθής στο *Verticillium dahliae*. Στις ΗΠΑ και σε άλλες χώρες γίνεται σημαντική έρευνα για τη δημιουργία υποκειμένων με καλές δενδροκομικές ιδιότητες και ανθεκτικότητα σε εδαφογενή παθογόνα και στους νηματώδεις.

Οι αρσενικού τύπου ποικιλίες είναι τα αρσενικά άτομα της *P. vera* και διακρίνονται σε τύπου Α, Β, Γ και Δ ή Α, Β, Γ και οι ποικιλίες Chico και Peters. Η φιστικιά μπορεί να γονιμοποιηθεί και με γύρη τσικουδιάς αλλά οι παραγόμενοι καρποί είναι

κατώτερης ποιότητας. Όσον αφορά τις θηλυκές ποικιλίες, στη χώρα μας καλλιεργείται αποκλειστικά η ποικιλία “Αιγίνης”. Σε πολύ μικρή έκταση καλλιεργείται η “Νυχάτη” και σποραδικά συναντάται η “Φουντουκάτη”. Από το 1989 δόθηκε στην καλλιέργεια μια νέα ποικιλία με την ονομασία “Pontikis”. Παρ’όλο ότι το υποκείμενο τσικουδιά και ποικιλία «Αίγινα» έχουν πολύ ικανοποιητικές δενδροκομικές ιδιότητες, επισημαίνεται ότι η καλλιέργεια ενός μόνο υποκειμένου και μιας μόνο ποικιλίας ενέχει κινδύνους διότι ευνοεί τη διάδοση νέων ή εισαγομένων παθογόνων και εχθρών στα οποία τα δένδρα μπορεί να παρουσιάζουν ευπάθεια. Από τις ξένες ποικιλίες, οι σπουδαιότερες είναι η “Kerman”, η “Sfax”, η “Joley”, η “Bronte-Red” και η “Aleppo-Trabonella”.

Τα φύλλα της φιστικιάς είναι σύνθετα με περιττό αριθμό φυλλαρίων. Τα άνθη σχηματίζονται πλαγίως στο ξύλο του προηγούμενου έτους. Η φιστικιά είναι δέντρο δίοικο (αρσενικά και θηλυκά δέντρα) δηλαδή τα άρρενα και τα θήλεα άνθη φέρονται σε διαφορετικά δένδρα. Η επικονίαση γίνεται με τον αέρα διότι το θήλυ άνθος δεν φέρει πέταλα ούτε νεκτάρια και δεν ελκύει τις μέλισσες. Η φιστικιά είναι επίσης δένδρο πρωτανδρικό δηλαδή τα άρρενα άνθη εκπτύσσονται πριν από τα θήλεα.

Ο καρπός είναι δρύπη, με σχήμα επίμηκες ωοειδές και σχηματίζονται σε σύνθετους βότρες. Αποτελείται από το περικάρπιο (φλοιός), το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (κέλυφος) και το σπέρμα (ψίχα). Το σπέρμα περιβάλλεται από λεπτό φλοιό χρώματος βυσσινή ή κόκκινο στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του, που περικλείει το έμβρυο και τις δύο κοτυληδόνες, που έχουν χρώμα ανάλογα με την ποικιλία από κρεμ μέχρι πράσινο. Οι καρποί κατά την ωρίμανση αποκτούν χρώμα κρεμ ή κίτρινο με κόκκινη ή ροζ απόχρωση στο τμήμα που βλέπει ο ήλιος. Επιπλέον το περικάρπιο γίνεται μαλακό και ξεκολλάει από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο εύκολα. Στους γεμάτους καρπούς το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο σχίζεται κατά μήκος της ραφής σε ποσοστό, που κυμαίνεται από 20-95 %, χαρακτηριστικό που καθορίζει την ποιότητα τους. Το *P.vera* είναι το μόνο είδος του γένους *Pistacia* που παρουσιάζει αυτή την ιδιομορφία.

Το ριζικό σύστημα του δένδρου είναι πολύ εκτεταμένο και διεισδύει σε μεγάλα βάθη. Έτσι η φιστικιά αντέχει σε μακρές περιόδους ξηρασίας.

Η φιστικιά είναι δένδρο φυλλοβόλο. Το φθινόπωρο από το Νοέμβριο αρχίζουν να πέφτουν τα φύλλα και το δένδρο μένει σε λήθαργο όλο το χειμώνα. Η βλάστηση αρχίζει να εκπτύσσεται στα άρρενα δένδρα από τις αρχές Μαρτίου και στα θήλεα από

τα τέλη Μαρτίου και ολοκληρώνεται στα τέλη Απριλίου με μέσα Μαΐου. Ο καρπός μετά το δέσιμό του, τον Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο αυξάνει σε μέγεθος ενώ το σπέρμα δεν αναπτύσσεται κατά το διάστημα αυτό. Μέχρι το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο παραμένει μαλακό και ο καρπός είναι ευάλωτος σε προσβολές εντόμων. Από το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο γίνεται σκληρό και το σπέρμα αρχίζει να αναπτύσσεται και φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα Αυγούστου.

Η φιστικιά είναι δένδρο βραδείας ανάπτυξης. Εισέρχεται σε αξιόλογη καρποφορία από το 8^ο-10^ο έτος της ηλικίας της και η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται σε 100 και πλέον έτη. Ένας από τους φυσιολογικούς χαρακτήρες του δένδρου είναι η παρενιαντοφορία κατά την οποία εναλλάσσονται μία χρονιά με μεγάλη παραγωγή και μία με μικρή ή με ακαρπία.

A.2.3 Κλίμα και έδαφος^{21,22,23}

Η φιστικιά ευδοκimei καλύτερα σε περιοχές με μακρό, θερμό και ξηρό θέρος και ήπιους χειμώνες. Ευδοκimei άριστα σε κλίμα ζεστό και ξηρό που επηρεάζεται από τη θάλασσα. Η υψηλή υγρασία επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη της. Αναπτύσσεται καλά μέχρι υψόμετρο 650 μέτρα και δεν θα πρέπει να φυτεύεται σε άνω των 800μ υψόμετρο, γιατί οι θερμοκρασίες κατά το θέρος δεν είναι επαρκείς για την κανονική ανάπτυξη του σπέρματος. Για την ομαλή διακοπή του ληθάργου τόσο των θηλέων όσο και των αρρένων δένδρων απαιτούνται 1000 ώρες με θερμοκρασία κάτω των 7°C. Θερμοί χειμώνες επιτείνουν το φαινόμενο της πρωτανδρίας λόγω ανώμαλης διακοπής του ληθάργου. Καιρός υγρός και βροχερός την άνοιξη επηρεάζει την επικονίαση και μειώνει την καρπώδεση. Παράλληλα οι δε συχνές βροχοπτώσεις κατά το καλοκαίρι και οι υγρές συνθήκες, πριν ή κατά την περίοδο της συγκομιδής ευνοούν την ανάπτυξη ασθενειών και υποβαθμίζουν την ποιότητα των καρπών. Ακόμα ο υγρός και ο ζεστός καιρός κατά τη βλαστική περίοδο των δένδρων ευνοεί την ανάπτυξη μυκητολογικών ασθενειών.

Όσον αφορά το έδαφος αν και προσαρμόζεται σε ποικιλία εδαφών, προτιμά τα σχετικά βαθιά, καλά αποστραγγιζόμενα, μέσης σύστασης εδάφη, με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο. Ανέχεται όμως τα ελαφρώς όξινα, αλκαλικά ή αλατούχα εδάφη. Νόστιμα φιστικία παράγονται σε εδάφη στραγγερά, ασβεστώδη και με μέση σύσταση εδάφη.

A.2.4 Φύτευση, άρδευση, κλάδεμα, λίπανση^{21,22,23}

Οι φιστικιές στην Ελλάδα φυτεύονται συνήθως σε γραμμές ή σε ορθογώνια παραλληλόγραμμα. Οι αποστάσεις μεταξύ των δένδρων είναι 7x7m ή 7x6m ή 6x6m. Η σχέση αρρένων προς θήλεα είναι 1:7.

Η φιστικιά είναι ανθεκτική στην ξηρασία, δίνει όμως μεγαλύτερη παραγωγή όταν ποτίζεται. Το πότισμα δίνει καλύτερα αποτελέσματα όταν γίνεται κατά το γέμισμα των καρπών (Ιούνιο με Αύγουστο). Τα συστήματα αρδεύσεως που εφαρμόζονται είναι οι λεκάνες, κατά σταγόνες (στάγδην) και εκτοξευτήρες.

Το κλάδεμα πρέπει να γίνεται αργά τον χειμώνα και πριν από το ξεκίνημα των οφθαλμών. Γενικά, πρέπει να είναι ελαφρό και να αποσκοπεί στη διατήρηση του σχήματος και στην ανανέωση του καρποφόρου ξύλου. Από πλευράς φυτοπροστασίας έχει μεγάλη σημασία κατά το κλάδεμα να αφαιρούνται όλοι οι ξηροί κλαδοί και όσοι είναι προσβεβλημένοι από έντομα και ασθένειες και να καταστρέφονται με καύση.

Η λίπανση αποτελεί καθοριστικής σημασίας καλλιεργητική επέμβαση για την παραγωγικότητα των δένδρων της φιστικιάς, αφού μέσω αυτής επιδιώκεται η συμπλήρωση της φυσικής γονιμότητας του εδάφους του δενδροκομείου, έτσι ώστε τα δένδρα να έχουν στη διάθεσή τους εγκαίρως όλα τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, σε επαρκείς ποσότητες και σε αναλογίες ανταποκρινόμενες στις φυσιολογικές τους ανάγκες. Μολονότι τα προγράμματα λίπανσης διαφοροποιούνται λίγο ή πολύ από φυτεία σε φυτεία, από έτος σε έτος, σε γενικές γραμμές τα στοιχεία N,P και K χορηγούνται σε ίση περίπου αναλογία ή με το φώσφορο ελαττωμένο. Σπουδαία και εντελώς μοναδική επίδραση ασκεί στη γονιμότητα του εδάφους, η οργανική ουσία (χούμος) που δημιουργείται με την τακτική προσθήκη χωνεμένης κοπριάς ή χλωρής λίπανσης. Η ευεργετική επίδραση του χούμου αφορά κατά κύριο λόγο τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους – πορώδες, υδατοχωρητικότητα, αερισμό- γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη και λειτουργία του ριζικού συστήματος των δένδρων και τη δράση των μικροοργανισμών.

A.2.5 Προβλήματα φυτοπροστασίας^{21,22}

A.2.5.1 Μυκητολογικές ασθένειες της φιστικιάς στην Ελλάδα

| Όνομασία | Παθογόνο αίτιο | Συμπτωματολογία |
|----------------------------|---|---|
| Σηψιριζία | <i>Armillaria sp.</i> | Καχεκτική βλάστηση, μικροφυλλία, χλωρωτικά φύλλα, πτώση φύλλων. Νέκρωση μεμονωμένων κλάδων, το δένδρο φθίνει και ξηραίνεται. Ξηρή σήψη ριζών. |
| Φυτόφθορα | <i>Phytophthora sp.</i> | Άφθονη έκκριση κόμμεος χαμηλά στον κορμό πάνω από το σημείο του εμβολιασμού (κομμίωση), μεταχρωματισμός καμβίου μέχρι το σημείο του εμβολιασμού. Αποπληξία. |
| Βερτισιλλίωση | <i>Verticillium dahliae</i> | Χλώρωση φύλλων, ημιπληγία, καστανός μεταχρωματισμός στα αγγεία του σομού ξύλου |
| Ευτυπίωση | <i>Eutypa lata</i> | Απότομη ξήρανση μεμονωμένων κλάδων κατά το θέρος, παραμονή των ξηρών φύλλων στους κλάδους, σκούρος μεταχρωματισμός ξύλου και φλοιού |
| Σήψη ξύλου | <i>Phelinus rimosus</i> | Απότομη ξήρανση κλάδων από Ιούνιο-Αύγουστο, παραμονή φύλλων και καρπών στους κλάδους, σκούρος ερυθροκάστανος μεταχρωματισμός |
| Σεπτορίωση | <i>Septoria sp.</i> | Πολυάριθμες καστανές κηλίδες στις επιφάνειες των φύλλων |
| Σκωρίαση | <i>Pileolaria terebinthi</i> | Κηλίδες, φλύκταινες στα άνθη, ταξιανθίες, φύλλα και καρπούς. |
| Καμαροσπόριο | <i>Botryosphaeria sp.</i> | Προσβολή όλων των οργάνων του δένδρου, εμφάνιση μαύρων στιγμάτων στο τέλος του θέρους |
| Στιγματομύκωση | <i>Nematospora coryli</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> | Νεκρώσεις και παραμορφώσεις στο εσωτερικό ή/και εξωτερικό των κοτυληδόνων |
| Προσβολές από ασπέργιλλους | <i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> | Σκουρόχρωμες κηλίδες στο περικάρπιο, σήψη του σπέρματος, κιτρινοπράσινες καρποφορίες (Παραγωγή αφλατοξινών) |

Από τους βιοτικούς παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στα φυτά μόνο μύκητες έχουν καταγραφεί στις φιστικιές στην Ελλάδα, με μια εξαίρεση, το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*. Το παθογόνο αυτό παρατηρήθηκε μία μόνο φορά και η προσβολή χαρακτηρίζεται πολύ σπάνια. Στη διεθνή βιβλιογραφία επίσης, δεν έχουν περιγραφεί στη φιστικιά προκαρυωτικές ασθένειες, ιώσεις και ασθένειες παρόμοιες

με ιώσεις. Οι μυκητολογικές ασθένειες που περιγράφονται για τη φιστικιά στην Ελλάδα αναφέρονται στον Πίνακα 2.2.

***A.2.5.1.1 Προσβολή από τους μύκητες του γένους *Aspergillus**²²**

Από τους καρπούς της φιστικιάς έχουν απομονωθεί διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Μεταξύ αυτών και τα είδη *A.flavus* και *A.parasiticus* υπεύθυνοι για την παραγωγή αφλατοξινών. Αφλατοξίνες δεν παράγονται από όλες τις απομονώσεις. Οι μύκητες αυτοί έχουν βρεθεί σε καρπούς φιστικιάς πάνω στο δένδρο αλλά και σε συγκομισμένους καρπούς κατά την επεξεργασία και αποθήκευση.

- **Συμπτώματα**

Ο *A.flavus* σε προσβολές του περικαρπίου προκαλεί κηλίδες σκούρου χρώματος, που μπορούν να καταλάβουν μεγάλη επιφάνεια του καρπού. Προσβολή του σπέρματος προκαλεί σήψη. Πάνω στους προσβεβλημένους ιστούς παρατηρούνται συχνά οι κιτρινοπράσινες καρποφορίες του μύκητα.

- **Κύκλος ασθένειας - Επιδημιολογία**

Οι μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* είναι σαπρόφυτα ή/και ασθενή παράσιτα, τα οποία συνήθως εισέρχονται στον ξενιστή από πληγές. Ως σαπρόφυτα έχουν βρεθεί στο έδαφος φιστικιώνων, σε σκόνη και σκουπίδια αποθηκών, σε ξηρές άρρενες ταξιανθίες και σε καρπούς που έχουν πέσει στο έδαφος. Όλα αυτά τα υποστρώματα αποτελούν εστίες μόλυνσης, από τις οποίες τα σπόρια μεταφέρονται με τον αέρα στους ηρητημένους και στους συγκομισμένους και αποθηκευμένους καρπούς. Οι μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 17-42° C. Υψηλότερες θερμοκρασίες παρεμποδίζουν την ανάπτυξή τους. Σπόρια του *A.flavus* που έχουν παραμείνει επί 4h στους 50° C παρουσιάζουν ποσοστό βιώσιμων σπορίων 2%. Στα βλαστημένα σπόρια το ποσοστό αυτό είναι ακόμα χαμηλότερο. Αναμένεται επομένως σημαντική μείωση του ποσοστού βιώσιμων σπορίων κατά την αποξήρανση των καρπών σε φούρνους ή/και στον ήλιο ακόμα. Υπάρχει όμως πάντα ο κίνδυνος της επαναμόλυνσης των καρπών αυτών κατά την αποθήκευση.

A.2.5.2 Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα^{21,22}

Οι ζωϊκοί εχθροί της φιστικιάς που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι τα έντομα, τα ακάρεα, οι νηματώδεις, τα πουλιά και τα τρωκτικά. Στην Ελλάδα από τους εχθρούς αυτούς μόνο τα έντομα αποτελούν σοβαρό πρόβλημα. Οι σημαντικότεροι εντομολογικοί εχθροί που αναφέρονται για τη φιστικιά στην Ελλάδα περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3). Από αυτούς, το ευρύτομο, ο σκώρος και η ψύλλα της φιστικιάς δημιουργούν κατ'έτος πολύ σοβαρές ζημιές μέχρι και μηδενισμό της παραγωγής.

Πίνακας 2.3 Οι εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα²²

| Κοινή ονομασία | Επιστημονική ονομασία | Τάξη | οικογενεια |
|---------------------------|--|-------------|--------------|
| Καπνώδης | <i>Carpodis tenebrionis</i> | Coleoptera | Buprestidae |
| Σκολύτης | <i>Acrantus vestitus</i> | Coleoptera | Scolytidae |
| Σινόξυλο | <i>Sinoxylon sexdentatum</i> | Coleoptera | Bostrychidae |
| Τίνεα | <i>Teleiodes decorella</i> | Lepidoptera | Gelechiidae |
| Ψύλλα | <i>Agonosцена pistaciae</i> | Homoptera | Psyllidae |
| Σκώρος | <i>Palumbina guerinii</i> | Lepidoptera | Gelechiidae |
| Ευρύτομο | <i>Eyrytoma plotnikovi</i> | Hymenoptera | Eurytomidae |
| Τρωγόκαρπος | <i>Megastigmus pistaciae</i> | Hymenoptera | Torymiidae |
| Τζιτζικάκι (Ιδιόκερος) | <i>Idiocerus stali</i> | Hemiptera | Jassidae |
| Κοκκοειδή | <i>Aspidiotus sp.</i> <i>Melanaspis sp.</i> | Homoptera | Diaspididae |
| Έντομα αποθήκης | <i>Ephestia kuehniella</i> | Lepidoptera | Pyralididae |
| | <i>Plodia interpunctella</i> | Lepidoptera | Pyralididae |

A.2.5.2.1 Προσβολή της φιστικιάς από το ευρύτομο^{21,22}

- **Χαρακτηριστικά – Βιολογικός κύκλος**

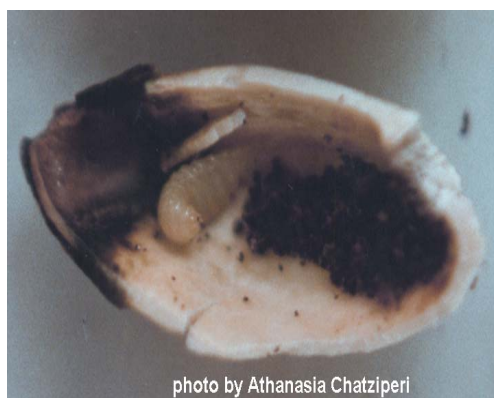
Το ευρύτομο έχει μήκος 4-5 χιλιοστά, τα θηλυκά είναι μεγαλύτερα των αρσενικών, με καστανόμαυρο κεφάλι και θώρακα, κοκκινοκίτρινη κοιλιά και κόκκινα μάτια, ενώ τα αρσενικά είναι μαύρα με κιτρινέρυθρα πόδια και μοιάζουν με μικρές σφήκες. Έχουν μία γενιά το χρόνο. Ξεχειμωνιάζουν σαν προνύμφες (σκουλήκια μήκους 6 mm, υπόλευκα, κωνικά, καμπουρωτά) μέσα στους καρπούς που έχουν μείνει στο δένδρο ή έχουν πέσει στο έδαφος. Από τέλη Μαΐου ως τέλη Ιουνίου το σκουλήκι τυλίγεται σε κουκούλι (νύμφωση) και γίνεται τέλειο έντομο το οποίο βγαίνει την ίδια εποχή από τον καρπό ανοίγοντας μια τρύπα στην βάση του. Τα θηλυκά αφού

γονιμοποιηθούν εισάγουν στο εσωτερικό των νεαρών φιστικιών από ένα αυγό κοντά στην κορυφή τους. Από την τρύπα που εισάγεται το αυγό μπαίνουν συχνά και μύκητες που ζημιώνουν την παραγωγή.

- **Ζημιές**

Οι ζημιές προκαλούνται κυρίως από τα σκουλήκια που αρχικά τρώνε τα μαλακά ακόμα εσωτερικά τοιχώματα του καρπού και αργότερα τρώει και τον αναπτυσσόμενο σπόρο. Οι ζημιωμένοι καρποί μαυρίζουν και μένουν πάνω στο δένδρο και αφού πέσουν τα φύλλα σε αντίθεση με τους κούφιους και αυτούς που έχουν προσληφθεί και από μύκητες που πέφτουν νωρίτερα. Οι ζημιές μπορεί να φτάσουν και το 95%.

Εικόνα 2.1 Προνύμφη ευρυτόμου σε φιστίκι – Συμπτώματα προσβολής των φιστικιών από ευρύτομο



A.2.5.2.2 Προσβολή της φιστικιάς από το σκώρο^{21,22}

- **Χαρακτηριστικά – Βιολογικός κύκλος**

Πρόκειται για μια μικρή κιτρινόλευκη πεταλούδα 4-5 χιλιοστών με άνοιγμα φτερών 12-14 χιλιοστών που όταν κάθεται το σώμα της σχηματίζει χαρακτηριστική γωνία 35° με την επιφάνεια στήριξης. Ξεχειμωνιάζει είτε ως αυγό είτε ως προνύμφη (σκουλήκι 6 χιλ. κιτρινόλευκο με καστανό κεφάλι) κοντά ή μέσα στους οφθαλμούς της κορυφής των βλαστών. Με την έναρξη της βλάστησης τα σκουλήκια δραστηριοποιούνται προσβάλλοντας τις κορυφές των νεαρών βλαστών και τις ταξιανθίες όπου ανοίγουν στοές και μετατρέπονται σε νύμφες (είτε μέσα στις στοές είτε σε κουκούλια που φτιάχνουν οι προνύμφες από ένα κομμάτι φυτικού ιστού από καρπό ή ποδίσκο που διπλώνουν κατά μήκος και ενώνει τις άκρες του με νήματα και σχηματίζει και αυτό

γωνία 35ο με την επιφάνεια στήριξης). Από εκεί θα βγουν οι πεταλούδες μέσα Μαΐου με μέσα Ιουνίου και θα τοποθετήσουν τα αυγά τους πάνω στους νεαρούς καρπούς.

- **Ζημιές**

Οι προνύμφες της 1ης γενιάς προσβάλλουν τους βλαστούς ή μπαίνουν ανάμεσα στα τρυφερά τσόφλια και τα τρώνε. Στα φιστίκια που παθαίνουν μελάνωση από μύκητες οι προνύμφες πεθαίνουν, αλλά στους υπόλοιπους συνεχίζουν να τρέφονται και μετατρέπονται σε έντομα που γεννούν πάλι αυγά πάνω σε καλά φιστίκια. Οι προνύμφες της 2ης γενιάς δε μπορούν πια να μπουν μέσα στο φιστίκι γιατί το ξυλώδες ενδοκάρπιο έχει σκληρύνει, έτσι τρέφονται από την πράσινη φλούδα όπου θα φτιάξουν πάλι κουκούλι από όπου θα βγουν καινούργια έντομα για 3 ακόμα γενεές που τρέφονται όλες από το εξωκάρπιο.

Εικόνα 2.2 Ενήλικο σκόρο φιστικιάς – Συμπτώματα προσβολής των φιστικιών από σκόρο



A.2.5.2.3 Προσβολή της φιστικιάς από την ψύλλα^{21,22}

- **Χαρακτηριστικά – Βιολογικός κύκλος**

Η ψύλλα της φιστικιάς έχει δύο εποχιακές μορφές που έχουν σαφείς μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές. Η χειμερινή μορφή είναι μεγαλύτερη και σκουρότερη, εμφανίζεται αρχές Οκτωβρίου και μεταναστεύει προς τα καταφύγια όπου ξεχειμωνιάζει (ρωγμές κορμού, τοίχων, έδαφος). Δραστηριοποιούνται κατά τα τέλη Απριλίου, ζευγαρώνουν και γεννούν τα αυγά τους κυρίως στην πάνω επιφάνεια των φύλλων, αλλά και στους μίσχους και νεαρούς βλαστούς από όπου θα βγει η καλοκαιρινή γενιά που έχει μήκος 2-3 mm και χρώμα ανοιχτοκίτρινο. Το είδος αυτό εξελίσσεται και αναπαράγεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και έχει αρκετές γενιές (4-5) το χρόνο. Το τέλειο έντομο αναπτύσσεται καλύτερα σε θερμοκρασία 30° C ενώ οι νύμφες στους 25-32,5° C.

- **Ζημιές**

Τόσο τα τέλεια όσο και οι νύμφες τρυπούν και ρουφούν τα μάτια και τα τρυφερά μέρη της φιστικιάς παράγοντας τεράστιες ποσότητες κολλώδους μελιτώματος που μετατρέπεται σε άσπρους στερεούς κόκκους αμέσως μετά την έκκριση και ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων. Σε πυκνούς πληθυσμούς εξασθενούν τα δένδρα επηρεάζοντας την τρέχουσα αλλά και την παραγωγή του επόμενου έτους.

Εικόνα 2.3 Ενήλικο ψύλλας φιστικιάς – Προνύμφες ψύλλας επάνω σε φύλλα



A.2.6 Ωρίμανση^{22,23}

Συνήθως οι καρποί δεν ωριμάζουν όλοι μαζί. Οι πρώτοι ώριμοι καρποί εμφανίζονται στις αρχές με τα μέσα Αυγούστου. Σαν κριτήρια ωριμότητας χρησιμοποιούνται η εύκολη αποκόλληση του περικάρπιου από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο και η εύκολη απόσπαση των καρπών με ελαφρό τίναγμα. Λόγω της διαδοχικής τους ωρίμανσης οι καρποί πρέπει να συγκομίζονται σε 2 «χέρια», μερικές δε φορές και σε 3 «χέρια» αν κριθεί ότι συμφέρει οικονομικά. Στην πράξη όμως η συγκομιδή γίνεται μονομιάς.

A.2.7 Συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση^{22,23}

Η συγκομιδή των φιστικιών στη χώρα μας αρχίζει από τα τέλη Αυγούστου με μέσα Σεπτέμβρη, ανάλογα με την ποικιλία και την περιοχή και διαρκεί 15-20 μέρες. Το πρώτο «χέρι» συνήθως συγκομίζεται όταν το 60-70% των καρπών έχουν ωριμάσει. Γίνεται με ράβδισμα ή τίναγμα των δένδρων και οι καρποί πέφτουν κάτω από την κόμη, πάνω σε απλωμένα πανιά ή δίχτυα συλλογής ελαιοκάρπων. Σε άλλες χώρες χρησιμοποιούνται μηχανικοί δονητές.

Τα συγκομισμένα φιστίκια πρέπει να αποφλοιώνονται το ταχύτερο δυνατό, διότι όταν παραμείνουν με το φλοιό, το ξυλώδες ενδοκάρπιο μαυρίζει και υποβαθμίζεται η ποιότητα τους. Επιπλέον, υπάρχει κίνδυνος προσβολής από μύκητες. Η αποφλοιώση γίνεται με ηλεκτροκίνητα αποφλοιωτικά μηχανήματα. Εν

συνεχεία τα καθαρισμένα φιστίκια τοποθετούνται σε δοχείο με νερό, απ' όπου τα μεν άσπερμα που επιπλέουν απομακρύνονται («αφρός»). Αν το λευκό χρώμα του ξυλοποιημένου ενδοκαρπίου δεν είναι ικανοποιητικό⁴⁰, τα φιστίκια λευκαίνονται με υποθειώδες νάτριο, πριν την αποξήρανση^{22,23}.

Μετά την αποφλοιώση ο καρπός αποξηραίνεται σε ειδικά ξηραντήρια σε θερμοκρασία 65°C επί 8 ώρες. Εναλλακτικά, τα φιστίκια απλώνονται σε στρώση πάχους 2-3 φιστικιών στον ήλιο επί 3-4 ημέρες. Στους αποξηραμένους σε ξηραντήρια καρπούς το ποσοστό υγρασίας μετά την αφαίρεση των λιπαρών συστατικών είναι 5-6%. Στους αποξηραμένους στον ήλιο κυμαίνεται από 8-10%. Η σχέση βάρους αποφλοιωμένων και αποξηραμένων καρπών προς νωπούς προ της αποφλοιώσης υπολογίζεται σε 40:100.

Τα φιστίκια πρέπει να αποθηκεύονται σε αποθήκες καθαρές, με καλή θερμοκή μόνωση, με χαμηλή υγρασία, για να εμποδίζεται η ανάπτυξη μυκήτων και με δυνατότητα αερισμού. Στα παράθυρα των αποθηκών πρέπει να υπάρχει λεπτή σήτα για να αποφεύγεται η είσοδος των εντόμων. Στην περίπτωση που υο φιστίκι είναι προσβεβλημένο με έντομα πάνω από το δέντρο (π.χ. με σκώρο) απολυμαίνεται σε απεντομωτήριο. Πριν από την επεξεργασία (ψήσιμο, αλάτισμα, συσκευασία) του προϊόντος γίνεται απομάκρυνση των κλειστών φιστικιών είτε με το χέρι, για μικρές ποσότητες είτε με ειδικά τύμπανα συλλεκτικών βελονών.

A.2.8 Προσδοκώμενη χρήση^{22,23}

Η μεγαλύτερη ποσότητα φιστικιών διατίθενται στην κατανάλωση με το κέλυφος, αλατισμένα και ψημένα. Σαν ψίχα χρησιμοποιείται κυρίως στη ζαχαροπλαστική (παγωτά, πάστες, ζαχαρωτά φιστίκια, μαντολάτα κ.λ.π.) και στην αλλαντοποιία. Τα φιστίκια αποτελούν πλούσια πηγή λιπών και περιέχουν πολλά λιπαρά οξέα όπως ολεϊκό, λινολεϊκό και λινολενικό, τα οποία είναι απαραίτητα για τη διατροφή του ανθρώπου⁶. Περιέχουν επίσης μεταλλικά άλατα όπως Ca, Mg, K, P, Cu κ.α. καθώς και βιταμίνες A, B₁, B₂, B₆ κ.α.⁶. Ενδεικτικά στοιχεία για τη σύσταση και θρεπτική αξία των φιστικιών παρατίθενται στους Πίνακες 2.4 και 2.5

Πίνακας 2.4 Σύσταση φιστικιών και θρεπτική αξία²²

| Συστατικό | Περιεκτικότητα ανα 100g ψίχας |
|---|--------------------------------------|
| Υδωρ(g) | 5.6 |
| Πρωτεΐνες (g) | 19.6 |
| Λίπη (g) | 53.2 |
| Υδατάνθρακες (g) | 19.0 |
| Ίνες (g) | 2.2 |
| Τέφρα (g) | 3.0 |
| Σάκχαρα (g) | 6.1 |
| Θερμίδες | 594 |
| Σχέση μη κορεσμένων/κορεσμένα λιπαρά οξέα | 8.1 |
| Βιταμίνες: | |
| A (I.U.) | 230 |
| Θειαμίνη (mg) | 0.67 |
| Νιασίνη (mg) | 1.4 |
| Βιταμίνη C (mg) | 0 |
| Ανόργανα στοιχεία (mg) | |
| Ca | 131 |
| P | 500 |
| Fe | 7.3 |
| K | 972 |
| Mg | 158 |

Πίνακας 2.5 Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών της ποικιλίας Αίγινας²²

| Συστατικό | Περιεκτικότητα ανα 100g ψίχας |
|------------------|--------------------------------------|
| Πρωτεΐνες (g) | 19.5 |
| Λίπη (g) | 53.6 |
| Υδατάνθρακες (g) | 19.4 |
| Θερμίδες | 594 |

A.2.9 Παραγωγή και εμπόριο κελυφοτών φιστικιών³⁰

Σύμφωνα με την FAOSTAT, οι 5 μεγαλύτερες χώρες παραγωγής κελυφοτών φιστικιών για το έτος 2007 είναι το Ιράν με 49%, οι ΗΠΑ με 23%, η Τουρκία με 17%, η Συρία με 6%. Η παραγωγή της Ελλάδας φτάνει το 2% της παγκόσμιας παραγωγής. Από το 1995 έως το 2007 η παγκόσμια παραγωγή κελυφοτών φιστικιών αυξήθηκε από 393.257 τον. Σε 463.451 τον, μια αύξηση της τάσης του 18%. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι υπάρχουν μεγάλες αυξομειώσεις στην παραγωγή όπως π.χ. το 2000 που η παραγωγή έπεσε 20%. Σύμφωνα με την USDA, η παραγωγή

φιστικιού στην Τουρκία θα συνεχίζει να αυξάνει με τους ίδιους ρυθμούς λόγω του κύκλου παραγωγής, αλλά και των ιδανικών συνθηκών ανάπτυξης του δένδρου εκεί. Στην Τουρκία επίσης, παρατηρείται στροφή των παραγωγών σε ποικιλίες Ιρακινής προέλευσης, εγκαταλείποντας τις παραδοσιακές ποικιλίες.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία της Icar Group τα κελυφωτά φιστίκια κάλυψαν μόλις το 12% της εγχώριας παραγωγής ξηρών καρπών στα έτη 1998-2005. Ως προς τις εξαγωγές, το 2006 τα φιστίκια κάλυψαν περίπου το 12% των συνολικών εξαγόμενων ποσοτήτων ξηρών καρπών, κατέχοντας τη δεύτερη θέση μετά την αμυγδαλόψιχα. Την ίδια χρονιά, στην εγχώρια κατανάλωση το κελυφωτό φιστίκι κάλυψε το 12,3% επί του συνόλου των ξηρών καρπών.

A.3. ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ

A.3.1 Γενικά στοιχεία¹⁷

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

A.3.2 Ιστορική αναδρομή^{16,17}

Μικροσκοπικοί μύκητες όπως οι ασπέργιλλοι αναφέρονταν συνήθως έμμεσα από τη μεταβολική τους δραστηριότητα ως παράγοντες σήψης και αποδόμησης¹⁷. Αναφέρονται από την αρχαία Ελλάδα (Νίκανδρος ο Κολοφώνιος, 185 π.Χ.) ως και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικό, Κεφ.13-14). Η πρώτη γνωστή αξιοποίηση των ασπεργίλλων για ωφελιμιστικούς σκοπούς ήταν στην Κίνα περίπου πριν από 2000 χρόνια περίπου, οι οποίοι τους χρησιμοποιούσαν για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων βοηθώντας έτσι την περαιτέρω ζύμωσή τους από ζύμες και βακτήρια. Παρόμοιες ζυμώσεις υιοθετήθηκαν και σε άλλες όμορες περιοχές όπως Ινδονησία, Ιαπωνία, Κορέα και άλλες περιοχές της Ασίας. Στην Ιαπωνία, οι ζυμώσεις των σιτηρών και της σόγιας από κάποια είδη

ασπεργίλλων είναι γνωστές με το όνομα Koji και αναπτύχθηκαν αιώνες πριν αναπτυχθεί η επιστήμη της μικροβιολογίας.

Η επιστημονική έρευνα των ασπεργίλλων αλλά και των άλλων μυκήτων ξεκίνησε αμέσως μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* πρωτοαναφέρθηκαν το 1729 από τον Pier A. Micheli (1679-1737) τον Ιταλό βοτανολόγο στο «*Nova Plantarum Genera*»¹⁶. Ο Micheli ήταν ο πρώτος που διέκρινε τις χαρακτηριστικές κονιδιοφόρους και κεφαλές του γένους αυτού και λόγω της ιδιότητάς του –ήταν ιερέας- ονόμασε αυτούς τους μύκητες ασπέργιλλους, διότι στα λατινικά *aspergillum* είναι το θρησκευτικό σκεύος που χρησιμοποιούνταν στους αγιασμούς (αγιαστούρα) στη Ρωμαιοκαθολική Εκκλησία, με το οποίο προσομοίασε τις αποικίες του μύκητα¹⁶. Ήδη από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα οι ασπέργιλλοι άρχισαν να αναγνωρίζονται ως λοιμογόνιοι παράγοντες του ανθρώπου και των ζώων, ως δραστικοί παράγοντες στις διαδικασίες αποσύνθεσης, αλλά και στις ζυμώσεις¹⁶. Τελικά, οι ασπέργιλλοι ως ξεχωριστό γένος μυκήτων πήρε οριστική μορφή από τον Wehmer το 1901¹⁶.

A.3.3 Μορφολογία ασπεργίλλων - Περιγραφή - Ταξινόμηση

Το όνομα του γένους *Aspergillus* θεωρητικά αναφέρεται στην ατελή μορφή των μυκήτων σύμφωνα με τον Κώδικα Ταξινόμησης¹⁷. Όμως έχει επικρατήσει αυτή η ονομασία λόγω της ευρείας χρήσης του¹⁷. Ανήκουν στην οικογένεια *Trichocomaceae* της κλάσης *Hyphomycetes* των μιτοσπορικών μυκήτων (αδηλομύκητες) και είναι ατελείς μορφές ασκομυκήτων.²²

Το βλαστικό μυκήλιό τους αποτελείται από διακλαδιζόμενες υφές με εγκάρσια διαχωριστικά διαφράγματα (*septa*), οι οποίες μπορεί να είναι άχρωμες ή έγχρωμες ή τοπικά έγχρωμες¹⁶. Ο σχηματισμός που φέρει τα σπόριά τους (κονίδια) ονομάζεται κονιδιοφόρος (επιμηκησμένος ποδίσκος), ο οποίος στο άκρο του σχηματίζει μια κεφαλή¹⁶. Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται από εξειδικευμένα κύτταρα των υφών, τα οποία είναι ευμεγέθη, με παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα και ονομάζονται «*foot cells*»¹⁶. Στο άκρο της κεφαλής και γύρω-γύρω υπάρχει μία ή δύο σειρές κυττάρων τα *sterigmata* στα οποία επάνω υπάρχουν τα κονίδια¹⁶. Το χρώμα, το σχήμα, το μέγεθος των κονιδιοφόρων, των κεφαλών, των στηριγμάτων και των κονιδίων αποτελούν ταξινομικά χαρακτηριστικά του γένους¹⁶. Σε ορισμένα είδη βρίσκονται ασκοκάρπια, τα οποία παράγουν ασκούς και ασκοσπόρια μέσα σε λίγες εβδομάδες. Ορισμένα είδη

μυκήτων του γένους *Aspergillum* σχηματίζουν σκληρώτια ή ψευδοσκληρώτια και σε ορισμένες περιπτώσεις παράγουν ασκοσπόρια (εγγενή σπόρια) τα οποία απαιτούν μήνες για να ωριμάσουν¹⁶.

Λόγω του ότι σχετικά λίγα είδη του γένους *Aspergillus* παράγουν κλειστοθήκια και ασκοσπόρια, η ταξινόμηση για την πλειοψηφία των απομονώσεων βασίζεται στα χαρακτηριστικά της αποικίας και στις λεπτομέρειες της μορφολογίας των σχηματισμών που φέρουν τα κονίδια¹⁶. Πιο συγκεκριμένα η ταξινόμηση βασίζεται στη μορφολογία των παρακάτω χαρακτηριστικών¹⁶:

A) Κονιδιακή κεφαλή: χρώμα, σχήμα, μέγεθος, δομή

B) Foot – Cell: σχήμα, μέγεθος, μετατροπή με το χρόνο, η σύνδεσή του με τις υπόλοιπες μυκηλιακές υφές

Γ) Κονιδιοφόρος: Μήκος, διάμετρος, χρώμα, ύπαρξη ή μη διακλάδωσης

Δ) Κορυφαία εξόγκωση κονιδιοφόρου (vesicle): σχήμα, μέγεθος

E) Sterigmata (λεπτό στρώμα κυττάρων απ' όπου παράγονται τα κονίδια): σχήμα, μέγεθος, χρώμα, αριθμός (μονόσειρα, δίσειρα)

ΣΤ) Κονίδιο (σπόριο): Σχήμα, χρώμα, μέγεθος. Ιδιαίτερα το χρώμα είναι πολύ χαρακτηριστικό π.χ. πράσινο στο είδος *A.flavus*, μαύρο-καφέ στο είδος *A.niger*.

Z) Ύπαρξη κλειστοθηκίων (ασκοκάρπια) και ασκοσπορίων

H) Δημιουργία σκληρωτίων ή ψευδοσκληρωτίων: Ορισμένα είδη (*A.flavus*, *A.niger*, *A.ochraceus* κ.α.) υπό ορισμένες συνθήκες εμφανίζονται στη μορφή αυτή. Μελέτες των Coats (1959) και Rudolf (1962) οι οποίες αφορούσαν την επίδραση περιβαλλοντικών και φυσιολογικών παραγόντων στη δημιουργία σκληρωτίων σε 6 είδη ασπεργίλλων έδειξαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών και σακχάρων (όχι γλυκόζη ή λακτόζη) σε άριστες ή κοντά στο άριστο θερμοκρασίες ανάπτυξης (20-25°C) ευνοούν το σχηματισμό σκληρωτίων¹⁶.

A.3.4 Βιομηχανική χρήση ασπεργίλλων¹⁷

Πολλές και διαφορετικές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται σε διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι ασπεργίλλοι είναι σημαντικοί στη βιομηχανία οινοπνευματωδών, στη φαρμακοβιομηχανία και στην ενζυμική βιομηχανία. Όπως προαναφέρθηκε, η παλαιότερες διεργασίες σχετίζονται με παραδοσιακές ζυμώσεις τροφίμων στις Ασιατικές χώρες. Αυτά τα ζυμούμενα προϊόντα και ποτά περιλαμβάνουν μία πάστα σόγιας (miso), σάλτσα σόγιας (shoyu), το γνωστό sake

(οίνος ρυζιού), τα shochu (οινοπνευματώδη ποτά) και το ζύδι από ρύζι (yonezu). Η πιο διαδεδομένη διεργασία είναι τα koji: μίγμα από σιτάρι, ρύζι ή άλλα σιτηρά με ή χωρίς σόγια, όπου κατάλληλα είδη ασπεργίλλων αναπτύσσονται και εκκρίνουν ένζυμα τα οποία διασπούν τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες και άλλες οργανικές ενώσεις. Το αποτέλεσμα είναι ένα πιο εύγεστο προϊόν για ανθρώπινη κατανάλωση και διαθέσιμο για περαιτέρω ζύμωση από ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον, πολλά ένζυμα των ασπεργίλλων έχουν απομονωθεί και έχουν ευρεία βιομηχανική χρήση (π.χ. αμυλάσες).

Μία άλλη σημαντική χρήση των ασπεργίλλων στη βιομηχανία είναι η παραγωγή κιτρικού οξέος. Για δεκαετίες πλέον, το είδος *A.niger* θεωρείται το βιολογικό εργοστάσιο παραγωγής κιτρικού οξέος για μαζική παραγωγή και χρήση του στη βιομηχανία αναψυκτικών και ποτών.

A.3.5 Δευτερογενείς μεταβολίτες των ασπεργίλλων¹⁷

Είναι γνωστό ότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus* έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν ένα πλήθος βιολογικά ενεργών χημικών ενώσεων. Τυπικά, ο όρος «δευτερογενής μεταβολίτης» χρησιμοποιείται για να περιγράψει αυτά τα χαμηλού μοριακού βάρους «μη απαραίτητα» φυσικά προϊόντα, τα οποία συνήθως παράγονται αφότου σταματήσει η πρωτογενής ανάπτυξη⁴⁸. Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν αντιβιοτικά, μυκοτοξίνες, ανοσοκατασταλτικά και παράγοντες μείωσης της χοληστερόλης⁴⁸. Λόγω της βιοσυνθετικής τους προέλευσης, χημικά ταξινομούνται ως πολυκετίδια, μη-ριβοσωμικά πεπτίδια, τερπενοειδή κ.α. Μεγάλη έρευνα έχει γίνει παγκοσμίως όσον αφορά τα γονίδια τα οποία ελέγχουν τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των δευτερογενών μεταβολιτών. Από τις βάσεις δεδομένων γονιδιακής αλληλουχίας των ασπεργίλλων φαίνεται ότι υπάρχει μια εκπληκτική διαφοροποίηση στον αριθμό των γονιδίων, τα οποία κυρίως εμφανίζονται σε συμπλέγματα και τα οποία εμπλέκονται κυρίως στο δευτερογενή μεταβολισμό. Δύο από τις πιο σημαντικές ενώσεις δευτερογενούς μεταβολισμού των ασπεργίλλων είναι η λοβαστατίνη και η αφλατοξίνη. Η πρώτη συνεισφέρει θετικά στην ανθρώπινη ζωή διότι χρησιμοποιείται ευρέως για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα στη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας, μειώνοντας τον κίνδυνο καρδιακών προσβολών. Αντίθετα, η δεύτερη θεωρείται μία από τις πιο ισχυρές καρκινογόνες ουσίες. Εκ τούτου, η

αφλατοξίνη είναι η πιο καλά μελετημένη μυκοτοξίνη⁴⁸. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχηματίζονται στα τελευταία στάδια της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης⁵¹.

A.3.6 Παθογένεια ασπεργίλλων^{16,17}

Η ικανότητα των ασπεργίλλων να αναπτύσσονται σε πολλά και διαφορετικά υποστρώματα σε μεγάλο σχετικά εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών έδωσε τη δυνατότητα σε ορισμένα είδη να αποικούν τόσο ζωντανούς όσο και νεκρούς ζωϊκούς ιστούς¹⁶. Συμπεριφέρονται δηλαδή τόσο ως παράσιτα όσο και ως σαπρόφυτα. Τρεις τύποι ασθενειών προκαλούνται από τους ασπεργίλλους¹⁶:

A) Λοίμωξη (πρωτογενής-δευτερογενής): το αποτέλεσμα της εισβολής του μύκητα σε ζωντανούς ιστούς (ασπεργιλώσεις). Σε αυτές τις περιπτώσεις ορισμένα είδη ασπεργίλλων (*A.flavus*, *A.nidulans*) γίνονται ευκαιριακά παθογόνα σε ανοσοκατεσταλμένους¹⁷. Αυτές ονομάζονται μυκώσεις²⁰.

B) Αλλεργία: σχετίζεται με την εισπνοή κονιδίων ή άλλης μορφής επαφής με το μύκητα (π.χ. τουμπερκούλωση)^{16,17}

Γ) Τοξίκωση: αποτέλεσμα της κατάποσης τροφής μολυσμένης με τοξικούς μεταβολίτες του μύκητα. Ανάλογα με το όνομα της τοξίνης από την οποία προκαλείται η ασθένεια παίρνει το όνομα και η τοξίκωση π.χ. από την αφλατοξίνη προκαλείται αφλατοξίκωση^{16,52}.

Οι τοξικοί μεταβολίτες που παράγονται από ορισμένα είδη *Aspergillus* επηρεάζουν τον άνθρωπο και τα ζώα με δύο τρόπους. Πρώτον, τα στοιχεία δείχνουν ότι τα παθογόνα είδη παράγουν εξωτοξίνες και ενδοτοξίνες κατά την ανάπτυξή τους σε ζωντανούς ιστούς και δεύτερον τα σαπροφυτικά ή παθογόνα είδη που αναπτύσσονται σε υποστρώματα τα οποία αργότερα χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα από τον άνθρωπο και τα ζώα είναι δυνατό να παράγουν τοξικές ουσίες, οι οποίες απορροφούνται κατά την πέψη και δρουν σε διάφορα συστήματα του σώματος. Οι ασθένειες που προκαλούνται με τον δεύτερο τρόπο δράσης ονομάζονται *μυκοτοξικώσεις* ή πιο συγκεκριμένα για τις αφλατοξίνες: **αφλατοξικώσεις**. Η δράση αυτών των τοξινών στο σώμα ποικίλει από μείωση της ανάπτυξης (ομάδα *A.glaucus*) μέχρι καρκινογένεση και θνησιμότητα (αφλατοξίνη από *A.flavus*).

A.3.7 Η ομάδα του *Aspergillus flavus* - Τα είδη *A.flavus* και *A.parasiticus*

Οι μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* αποτελούν την αιτία παραγωγής αφλατοξίνης τόσο σε στάδια πριν τη συγκομιδή όσο και μετασυλλεκτικά.²⁰

A.3.7.1 Βασικά ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά¹⁶

- Οι κονιδιακές κεφαλές είναι σφαιρικές έως ακτινωτές ή κιονοειδής. Έχουν από ανοιχτό κίτρινο-πράσινο έως βαθύ κίτρινο-πράσινο χρώμα, ή στο χρώμα της ελιάς ή έως και καφετί. Διάμετρος συνήθως 300-400μm²²
- Οι κονιδιοφόροι είναι άχρωμοι, συνήθως τραχείς αλλά ποικίλουν από λείοι έως σχεδόν τραχύς¹⁶ και χωρίς διαφράγματα^{3A}. Το μήκος του είναι <1mm σε παλαιές όμως καλλιέργειες μπορεί να φτάσει και 2-2,5mm²².
- Κορυφαία εξόγκωση κονιδιοφόρου (vesicles): σφαιρική ή σχεδόν σφαιρική στην ωρίμανση στα είδη με ευμεγέθεις κεφαλές. Στα είδη με μικρές κεφαλές παραμένει ροπαλοειδής ή σε σχήμα φιαλιδίου. Είναι γόνιμο στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας. Διάμετρος 25-45μm²².
- Sterigmata (φιαλίδια): μονόσειρα ή δίσειρα, εικόνα συνήθης και στο ίδιο στέλεχος
- Κονίδια (σπόρια): στα περισσότερα είδη είναι σφαιρικά ή σχεδόν σφαιρικά στην ωρίμανση, με ευδιάκριτη τραχύτητα ή απουσία και συχνά επιδεικνύει σημαντική παραλλακτικότητα στο μέγεθος ανάμεσα στα στελέχη. Σε άλλα είδη έχουν σχήμα ελλειπτικό και είναι λεία ή με ελαφριά τραχύτητα. Διάμετρος 3,5-4,5μm.²²
- Σκληρώτια: σκοτεινά κοκκινο-καφέ έως μωβ-καφέ ή μαύρα στην ωρίμανση, σφαιρικά, σχεδόν σφαιρικά ή επιμηκυσμένα κατακόρυφα. Σκληρώτια έχουν βρεθεί σε καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό Czapek άγαρ αλλά και στη φύση²².

Η ομάδα του *A.flavus*, περιλάμβανε πολλά είδη όπως τα : *A.oryzae*, *A.zonatus*, *A.avenaceus* κ.α., τα οποία διαχωρίστηκαν μορφολογικά. Στην επιστημονική κοινότητα υπάρχει μία ενδιαφέρουσα διαφωνία εάν ο *A.flavus* και ο *A.oryzae* αντιπροσωπεύουν τελικά διαφορετικά είδη ή είναι οικότυποι του ίδιου είδους¹⁹. Στην ίδια ομάδα, τα είδη με κοντύτερους κονιδιοφόρους και τα οποία έφεραν διαρκώς κίτρινο-πράσινες κεφαλές διαχωρίστηκαν σε δύο είδη: *A.flavus* και *A.parasiticus*. Τα δύο αυτά είδη διαχωρίστηκαν μερικώς από το χρώμα τους (οι αποικίες του *A.flavus*

είναι πρασινο-κίτρινες ή πράσινες, του *A.parasiticus* είναι σκούρες πράσινες^{3A}) και τα σχετικά μήκη των κονιδιοφόρων, αλλά κυρίως από τα φιαλίδια (sterigmata), τα οποία στον *A.flavus* είναι τυπικά δίσειρα και στον *A.parasiticus* μονόσειρα. Επίσης, ο *A.parasiticus* συνήθως δεν σχηματίζει σκληρώτια^{3A}.

A.3.7.2 Γενετική δομή του *A.flavus*¹⁹

Ο χάρτης γονιδιώματος του *A.flavus* δεν έχει πλήρως ολοκληρωθεί. Μία εκτίμηση του μεγέθους του γονιδιώματος είναι περίπου 36,8 Mb παρόμοιο με αυτό του *A.oryzae*, αλλά μεγαλύτερο από αυτό του *A.nidulans* ή του *A.fumigatus*. Επιπλέον, τόσο ο *A.flavus* όσο και ο *A.oryzae* εμφανίζουν ένα πολύ μεγάλο πλήθος γονιδίων για τον δευτερογενή μεταβολισμό. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης και τα δύο είδη έχουν ένα γονιδιακό σύμπλεγμα το οποίο βρίσκεται κοντά στο τελομερές του χρωματοσώματος III. Οποιαδήποτε πληροφορία για την αλληλούχιση είναι διαθέσιμη στην ιστοσελίδα www.aspergillusflavus.org.

Την τελευταία δεκαετία, έχουν γίνει σημαντικά βήματα στην αποκρυπτογράφηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της αφλατοξίνης²⁰. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης αφλατοξίνης φαίνεται ότι είναι παρόμοιο στα δύο είδη: *A.flavus* και *A.parasiticus*. Το γονιδιακό σύμπλεγμα βιοσύνθεσης αφλατοξίνης αποτελεί το 96% της ταυτότητας του DNA¹⁹ και αποτελείται από 29 γονίδια²⁰. Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ τους είναι η απουσία των γονιδίων *porB* και *cypA* στον *A.flavus*. Αυτά τα δύο γονίδια είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση της ομάδας G των αφλατοξινών. Με εξαίρεση ένα υποείδος, ο *A.flavus* παράγει μόνο την ομάδα B (B_1 , B_2) των αφλατοξινών ενώ ο *A.parasiticus* και τις δύο.

Οι πληθυσμοί του *A.flavus* είναι γενετικά διαφοροποιημένοι σε δύο υποείδη, τα στελέχη των οποίων διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους των σκληρωτίων και αναφέρονται ως L (Large) για τα μεγάλα σκληρώτια και S (Small) για τα μικρά. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα L και S στελέχη αντιπροσωπεύουν ουσιώδη διαφοροποίηση μέσα στο είδος *A.flavus* και ότι η κάθε ομάδα είναι μονοφυλετική. Τα περισσότερα στελέχη L παράγουν B αφλατοξίνες κανένα δεν παράγει τις G, ενώ μερικά στελέχη S παράγουν B και G. Γενικά τα S στελέχη παράγουν περισσότερες ποσότητες αφλατοξίνης. Τα L στελέχη παράγουν άφθονα κονίδια και σκληρώτια τα οποία έχουν διάμετρο συνήθως >400μm, ενώ τα S στελέχη παράγουν λιγότερα κονίδια και πολλά σκληρώτια με διάμετρο συνήθως <400μm. Το γονιδιακό

σύμπλεγμα για τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης των L και S στελεχών του *A.flavus* είναι κατά 99% ταυτόσημο σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα L και S στελέχη εμφανίζουν διαφορετικότητα ως προς τη γεωγραφική κατανομή, αν και οι αιτίες δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Η βιοσύνθεση αφλατοξίνης έχει διερευνηθεί περισσότερο στα L στελέχη, τα οποία κυριαρχούν περισσότερο στις Η.Π.Α. Γι'αυτούς τους λόγους, το στέλεχος NRRL 3357, το οποίο χρησιμοποιείται πάνω από 30 χρόνια σε πειράματα αγρού και εργαστηρίου είναι αντιπρόσωπος των L στελεχών και επιλέχθηκε για ταυτοποίηση-αλληλούχιση του γονιδιώματος των *A.flavus*.

Με βάση τη μορφολογία (μέγεθος σκληρωτίων και παραγωγή κονιδίων), τον χημειοτυπο (αφλατοξίνες και κυκλοπιαζονικό οξύ) και τη γενετική παραλλαγή (βλαστική συμβατότητα) τα στελέχη του *A.flavus* συνιστούν διάφορες υπο-ομάδες³⁴. Ένα σημαντικό ποσοστό από τα στελέχη του *A.flavus* στον αγρό δεν παράγουν αφλατοξίνες³⁴. Οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την απώλεια της ικανότητας παραγωγής αφλατοξίνης στον *A.flavus* δεν είναι πλήρως κατανοητοί³⁴.

***A.3.7.3 Οικολογία του A.flavus*¹⁹**

Ο *A.flavus* είναι ένα ανταγωνιστικό σαπρόφυτο, φυτοπαράσιτο και ζωοπαράσιτο. Συνεπώς η οικολογία του περιλαμβάνει όλες στις γνωστές τροφικές φάσεις του γένους *Aspergillus*. Οι δύο μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* είναι πολύ συγγενή είδη και αναπτύσσονται σε φυτικά υλικά τόσο πάνω όσο και μέσα στο έδαφος^{3A}. Επιπροσθέτως, *A.flavus* εμφανίζει ένα πλούσιο προφίλ σε δευτερογενείς μεταβολίτες, περιλαμβάνοντας διάφορες μυκοτοξίνες. Γνωστές μυκοτοξίνες που παράγονται από τον *A.flavus* είναι τα: κυκλοπιαζονικό οξύ, ασπερτοξίνη, αφλατρέμη, ασπεργιλλικό οξύ και αφλατοξίνες. Οι τελευταίες, οι οποίες είναι τοξικές και καρκινογόνες συσσωρεύονται στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Λόγω των επιπτώσεών τους στην υγεία έχουν γίνει πολλές έρευνες από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, οι οποίες εστιάζουν στην κατανόηση της βιολογίας και οικολογίας του πληθυσμού αυτού του μύκητα καθώς και του δευτερογενούς μεταβολισμού του. Γι'αυτό το λόγο ο μύκητα αυτός έχει περιγραφεί πολύ περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο είδος των ασπεργίλλων, καθώς και η βιοσύνθεση αφλατοξίνης είναι ένα από τα πιο καλά περιγραφόμενα μονοπάτια δευτερογενούς μεταβολισμού στους μύκητες. Επιπλέον,

λόγω και της πρόσφατης ανακάλυψης της αλληλουχίας του γονιδιώματός του χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλλο για τη μελέτη της βιολογίας, οικολογίας και παθογένειας ολόκληρου του είδους.

Ο *A.flavus* ανήκει στο υπο-γένος *Circumdati* στο τμήμα *Flavi*. Τα είδη αυτού του τμήματος υπάρχουν είναι περισσότερο συχνά στις υποτροπικές ζεστές κλιματικές περιοχές¹⁹ με μία τάση να εμφανίζονται πιο συχνά σε περιοχές με υψηλή βροχόπτωση, θερμοκρασία και υγρασία.^{3A} Ο *A.flavus* συναντάται κυρίως σε θερμοκρασίες μεταξύ 26°C και 35 °C. Απομονώνεται κυρίως από καλλιεργούμενα εδάφη, αλλά μπορεί να βρεθεί σε διάφορα υποστρώματα όπως δασικά εδάφη. Ο *A.flavus* καθώς και το συγγενές του είδος *A.parasiticus* είναι τα πιο συχνά ευρισκόμενα είδη παραγωγής αφλατοξινών. Αν και τα δυο είδη μπορεί να βρεθούν σε σπόρους βαμβακιού, καλαμποκιού, φιστικιών και άλλων ξηρών καρπών, ο *A.flavus* είναι το πιο κυρίαρχο είδος. Ο *A.parasiticus* έχει μία ελαφρώς χαμηλότερη άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης, γεγονός το οποίο εξηγεί γιατί βρίσκεται περισσότερο στην αραχίδα (υπόγειος καρπός) απ'ότι σε υπέργειους καρπούς (π.χ. κελυφωτά φιστίκια). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ αυτά τα είδη μπορούν και αποικίζουν καρπούς, πιο συχνά σχετίζονται με το έδαφος όπου πρέπει να ανταγωνιστούν την μικροπανίδα και μικροχλωρίδα του εδάφους.

A.3.7.4 Σημασία της ομάδας του *A.flavus*¹⁶

Τα είδη της ομάδας του *A.flavus* είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Απομονώνονται συχνά από εδάφη, κυρίως των τροπικών και υποτροπικών περιοχών, από ζωοτροφές και φυτικά υλικά σε αποσύνθεση, σε αποθηκευμένους σπόρους και σιτηρά και από διάφορα άλλα προϊόντα¹⁶ (φρούτα, αποξηραμένους καρπούς κ.α.). Συνεισφέρουν στις διεργασίες της αποσύνθεσης σε υψηλά επίπεδα υγρασίας, γι'αυτό και δεν παίζουν κυρίαρχο ρόλο σε σχέση με άλλα είδη μυκήτων που απαιτούν χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας. Ορισμένα είδη είναι παθογόνα στον άνθρωπο, τα ζώα και τα έντομα. Επίσης, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή ενζύμων (πρωτεολυτικών, αμυλολυτικών, λιπολυτικών, ινωδολυτικών). Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από στελέχη του *A.flavus* μετά από παρατηρήσεις ότι ορισμένες ουσίες (ασπεργιλλικό οξύ, υδροξυ-ασπεργιλλικό οξύ, φλαβισίνη, φλαβακόλη, φλαβασίνη, παρασιτισίνη, ουραντιδίνη)

έμφανίζει αντιβακτηριακή δράση. Λόγω της ικανότητας αυτής της ομάδας των μυκήτων να παράγουν κογικό οξύ (kojic acid) μελέτες έχουν γίνει για τη χρήση τους σε διαδικασίες ζύμωσης και στην παρεμπόδιση της ενζυματικής αμαύρωσης διάφορων τροφίμων. Άλλες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για τη χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή βιταμινών, παραγόντων ανάπτυξης και άλλων χημικών ουσιών (π.χ. στεροειδών, λιπών, πρωτεϊνών).

A.3.7.5 Ο *A.flavus* ως φυτοπαθογόνο¹⁹

Ο *A.flavus* είναι ένα προαιρετικό παθογόνο των αναπτυσσόμενων καρπών, κυρίως του αραβοσίτου, του βαμβακιού, της αρχίδας και των ξηρών καρπών. Δεν είναι επιθετικό παθογόνο και η αποίκισή του συχνά απαιτεί το φυτό-ξενιστή να έχει κατεσταλμένη άμυνα, συνήθως λόγω ξηρασίας και θερμοκρασιακού στρες. Η παρουσία του κυρίως σχετίζεται με τραυματισμένους καρπούς όπου μπορεί να εισβάλει και να τους μολύνει με αφλατοξίνη. Αν και είναι προαιρετικό παθογόνο είναι πολύ καλά προσαρμοσμένο στην αποίκιση καρπών και λίγοι άλλοι μύκητες προσβάλλουν και αποικίζουν καρπούς παρουσία του *A.flavus*. Αυτή η καλή προσαρμογή υποδηλώνει ότι ο *A.flavus* έχει μία μοναδική ομάδα γονιδίων απαραίτητη για την αποίκιση στους καρπούς, ή διαφορετικά, έχει ικανότητες ανταγωνιστικής υπεροχής. Μελέτες στην αραχίδα έδειξαν ότι ο *A.flavus* είναι ο κυρίαρχος μύκητας σε τραυματισμένους καρπούς αν και αντιπροσωπεύει μόλις το 1% της πανίδας του εδάφους.

Γενικά όμως, λίγοι καρποί ενός δέντρου ή ενός φυτού μολύνονται με το *A.flavus*, αλλά δυστυχώς ακόμα και ένας περιορισμένος αποικισμός οδηγεί σε παραγωγή αφλατοξίνης σε συγκεντρώσεις πάνω από το θερμοθετιμένο αποδεκτό όριο. Μόλυνση μπορεί να προκληθεί και σε μετασυλλεκτικό στάδιο εάν οι καρποί ή οι ζωοτροφές δεν αποθηκευθούν σε κατάλληλο περιβάλλον²⁰.

A.3.7.6 Ο *A.flavus* ως ζωοπαθογόνο¹⁹

Όπως ο *A.flavus* είναι προαιρετικά φυτοπαθογόνος μπορεί να είναι επίσης και προαιρετικά ζωοπαθογόνος¹⁹ προκαλώντας ασθένειες στα ζώα και τους ανθρώπους²⁰. Ο *A.flavus* είναι το δεύτερο παθογόνο αίτιο της πρόκλησης ασπεργίλλωσης στους ανθρώπους¹⁹ μετά τον *A.fumigatus*²⁰ και το βασικό παθογόνο παράγοντας της

χρόνιας ρινικής μόλυνσης (chronic indolent invasive sinonasal infection) σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Λόγω αύξησης των κρουσμάτων ασθενών με AIDS ή ασθενών με μεταμόσχευση οργάνου έχουν αυξηθεί και τα περιστατικά ασπεργιλλώσεων στα νοσοκομεία²⁰. Η θνησιμότητα από τις μολύνσεις με ασπέργιλλους είναι υψηλή λόγω του περιορισμένου αριθμού αντιμυκητιακών φαρμάκων καθώς και της παρουσίας ανθεκτικών στελεχών στα υπάρχοντα φαρμακευτικά σκευάσματα^{19,20}. Σε μια πρόσφατη έρευνα κατά την οποία παρακολουθούνταν οι συγκεντρώσεις σε σπόρια ασπεργίλλων σε ένα μεγάλο νοσοκομείο, ο τρίτος σε αριθμό αποικιών μύκητας ήταν ο *A.flavus*, πίσω από τα είδη *A.niger* και *A.candidus*.

A.3.7.7 Αφλατοξίκωση

Η αφλατοξίκωση είναι το αποτέλεσμα μόλυνσης από κατάποση μεσαίας έως υψηλής δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής²⁰.

Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιπτώσεις αφλατοξίνωσης. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται λόγος για έντονης μορφής ενδοτοξίνωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα απ' ευθείας βλάβη του ήπατος με επακόλουθη ασθένεια ή θάνατο, ενώ στη δεύτερη περίπτωση γίνεται λόγος για χρόνια έκθεση με εκδήλωση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων²⁰. Ανάλογα με τα επίπεδα και τη διάρκεια της έκθεσης στις αφλατοξίνες παρατηρούνται οι εξής συνέπειες στην υγεία: α) οι υψηλές δόσεις έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών οξείας μορφής και θάνατο, συνήθως λόγω κίρρωσης του ήπατος β) η χρόνια έκθεση οδηγεί κατά κύριο λόγο στην υποβάθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, επιφέρει ανορεξία και μειώνει την αναπαραγωγικότητα γ) κάθε είδους έκθεση δρα αθροιστικά όσον αφορά τον κίνδυνο για την εκδήλωση καρκίνου¹⁸.

- Οξεία τοξικότητα^{20,4A}

Η οξεία τοξικότητα προκαλείται από την απορρόφηση μέτριας έως μεγάλης ποσότητας αφλατοξινών. Ως φαινόμενο παρατηρείται τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Το συκώτι αποτελεί το βασικό όργανο στόχο. Έχουν παρατηρηθεί επίσης επιπτώσεις στους πνεύμονες, στο μυοκάρδιο, στα νεφρά και στον εγκέφαλο. Τυπικά συμπτώματα αφλατοξίνωσης είναι ο πολλαπλασιασμός του χοληφόρου σωλήνα, η κεντρολοβιώδης νέκρωση, η λιπώδης διήθηση του ήπατος, οι γενικότερες ηπατικές

αλλοιώσεις και τα ηπατώματα. Σε περιπτώσεις οξείας τοξικότητας στον άνθρωπο έχουν βρεθεί υψηλές ποσότητες αφλατοξινών, ύστερα από αυτοψία στο συκώτι, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο και στα νεφρά. Περιπτώσεις οξείας τοξικότητας σε ανθρώπους μετά από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων έχει αναφερθεί στην Κένυα (Ιούλιος 2004, 317 περιστατικά 125 θάνατοι), Ινδία (1974, 397 περιστατικά 108 θάνατοι), Μαλαισία και Ταϊλάνδη.

- Χρόνια τοξικότητα^{20,4A}

Η χρόνια τοξικότητα οφείλεται σε μακράς διάρκειας έκθεση σε χαμηλές έως μέτριου μεγέθους ποσότητες αφλατοξινών. Τα ζώα εξ αιτίας της μικρής διάρκειας ζωής δεν παρουσιάζουν χρόνια τοξικότητα. Η χρόνια τοξικότητα στον άνθρωπο εκδηλώνεται με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, την ανοσοκαταστολή, την ηπατίτιδα Β, τον ίκτερο, την κίρρωση του ήπατος και άλλες ήπιες, αργής εξέλιξης παθολογικές καταστάσεις. Παράλληλα θεωρείται ότι η παρατεταμένη έκθεση στις αφλατοξίνες εμπλέκεται στην εμφάνιση του συνδρόμου Reye's, σχετίζεται με το φαινόμενο kwashiorkor, επιφέρει μείωση στους ρυθμούς ανάπτυξης και αναπαραγωγιμότητας, προκαλεί δυσφορία και ανοσοκαταστολή.

A.4.ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ

A.4.1 Βιοσύνθεση αφλατοξίνης

A.4.1.1 Μονοπάτια και Ένζυμα στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης²⁰

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

Οι έρευνες δείχνουν ότι οι αφλατοξίνες συντίθενται από το μηλονυλ-συνένζυμο A (Malonyl CoA), αρχικά με το σχηματισμό του εξανοϋλ-συνενζύμου A (hexanoyl CoA) και στη συνέχεια με το σχηματισμό δεκακετιδίου ανθρακινόνης. Υπάρχουν δύο συνθάσες λιπαρών οξέων (FAS) και μία συνθάση πολυκετιδίου (PKS) οι οποίες εμπλέκονται στη σύνθεση του πολυκετιδίου από το ακετυλο-συνένζυμο A (acetyl-CoA). Το νορσολορινικό οξύ (norsolorinic acid – NOR) είναι το πρώτο σταθερό ενδιάμεσο που ταυτοποιήθηκε στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης. Οι αφλατοξίνες σχηματίζονται μετά από μια σειρά καλά οργανωμένων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Το γενικά αποδεκτό μονοπάτι βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης είναι:

hexanoyl CoA precursor → norsolorinic acid, NOR → averantin,

AVN → hydroxyaverantin, HAVN → Oxoaverantin, OAVN → averufin, AVF →

hydroxyversicolorone, HVN → versiconal hemiacetal acetate, VHA → versiconal,

VAL → versicolorin B, VERB → versicolorin A,

VERA → demethyl-sterigmatocystin, DMST → sterigmatocystin, ST →

O-methylsterigmatocystin, OMST → aflatoxin B₁, AFB₁ and aflatoxin G₁, AFG₁

Μετά από το βήμα VHA, υπάρχει μία διακλάδωση στο μονοπάτι, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των αφλατοξινών B₂ (AFB₂) και G₂ (AFG₂).

A.4.1.2 Τα γονίδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης αφλατοξίνης²⁰

Συνολικά 29 γονίδια ή ανοιχτά πλαίσια ανώγνωσης (ORF) τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης έχουν ταυτοποιηθεί, κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Τα γονίδια εμπλέκονται στη δημιουργία των ενώσεων που προηγούνται του σχηματισμού των αφλατοξινών δρώντας απ' ευθείας ή κωδικοποιώντας τα διάφορα ένζυμα.

Το πρώτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε ήταν το *aflD* (*nor-1*) το οποίο κωδικοποιεί μία κετο-αναγωγή στον *A.parasiticus* για την μετατροπή του NOR σε averantin (AVN). Διαταραχή ή εξάλειψη του *aflD* (*nor-1*) γονιδίου οδηγεί στη απώλεια όλων των αφλατοξινών και των ενδιάμεσων προϊόντων στους μύκητες. Το δεύτερο σημαντικό γονίδιο ήταν το *aflM* (*ver-1*), το οποίο κωδικοποιεί μια κετο-αναγωγή, η οποία απαιτείται για τη μετατροπή της versicolorin A (VERA) σε δυμεθυλ-στεριγματοκυστίνη (DMST) και της versicolorin B (VERB) σε δυμεθυλ-διϋδρο-στεριγματοκυστίνη (DMDHST) στον *A.parasiticus*.

Στα αρχικά βήματα του βιοσυνθετικού μονοπατιού ταυτοποιήθηκαν δύο μεγάλα γονίδια το *aflB* (*fas-1*) και το *aflA* (*fas-2*), τα οποία κωδικοποιούν την υπο-μονάδα β και α της συνθάσης λιπαρών οξέων FAS αντίστοιχα. Το τρίτο σημαντικό γονίδιο είναι το *aflC* (*pksA*), το οποίο κωδικοποιεί τη συνθάση πολυκετιδίου (PKS). Διαταραχή αυτού του γονιδίου προκαλεί διακοπή στην παραγωγή αφλατοξίνης και των ενδιάμεσων προϊόντων. Τα γονίδια *aflA*, *aflB* και *aflC* φαίνεται ότι άμεσα συνδέονται για τη μετατροπή από οξικό σε norsolorinic acid (NOR). Στα επόμενα στάδια έχει ταυτοποιηθεί το γονίδιο *aflP* (*omtA*), το οποίο κωδικοποιεί μια Ο-μεθυλ-τρανσφεράση για τη μετατροπή του ST σε OMST και DMST σε διϋδρο-Ο-μεθυλ-στερυγματοκυστίνη (DHOMST).

Τα γονίδια και τα ένζυμα για το σχηματισμό της ομάδας G των αφλατοξινών ήταν για πολύ καιρό ένα μυστήριο για τους μοριακούς βιολόγους, μέχρι την ταυτοποίηση των γονιδίων *aflQ* (*ordA*) και *aflU* (*cypA*). Υπάρχουν δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια που οδηγούν στο σχηματισμό των αφλατοξινών της ομάδας B και της ομάδας G. Το γονίδιο *aflQ* (*ordA*), το οποίο κωδικοποιεί μία μονο-οξυγενάση του κυτοχρώματος P-450, θεωρούνταν υπεύθυνο για τη μετατροπή της OMST σε AFB₁ και AFG₁ και της DMDHST σε AFB₂ και AFG₂ στον *A.flavus* και *A.parasiticus*. Επόμενες μελέτες όμως έδειξαν ότι για το σχηματισμό της ομάδας G των αφλατοξινών απαιτείται ένα επιπλέον ένζυμο, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο

aflU(cypA). Μερική απώλεια αυτού του γονιδίου οδηγεί στη διακοπή της παραγωγής αφλατοξίνης της ομάδας G στον *A.flavus*.

A.4.1.3 Ρύθμιση της βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης²⁰

Χαρακτηριστική είναι η παρουσία των γονιδίων *aflR* και *aflS(aflJ)*, ο ρόλος των οποίων είναι η ενεργοποίηση του μηχανισμού της μετάφρασης και η ρύθμιση της βιοσύνθεσης αντίστοιχα^{20,28}. Διαταραχή του γονιδίου *aflR* οδηγεί στην απώλεια έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης και στη διακοπή παραγωγής αφλατοξίνης. Αυτό σημαίνει ότι το γονίδιο *aflR* απαιτείται για την μεταγραφική ενεργοποίηση των περισσότερων –αν όχι όλων- των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης. Ο *A.sojae*, ένα μη τοξικογόνο είδος, το οποίο χρησιμοποιείται σε βιομηχανικές ζυμώσεις, βρέθηκε ότι περιέχει ένα μη-ενεργό γονίδιο *aflR*, με αποτέλεσμα να μην είναι ικανό να παράξει αφλατοξίνη.

Το γονίδιο *aflS* φαίνεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής. Διαταραχή του *aflS* στον *A.flavus* είχε σαν αποτέλεσμα την αποτυχία παραγωγής αφλατοξίνης.

Πολύ πρόσφατα η ομάδα του Καθηγητή Keller²⁰ ταυτοποίησε ένα νέο γονίδιο το οποίο ονόμασε *laeA*, για την έλλειψη έκφρασης του γονιδίου *aflR*. Διαταραχή αυτού του γονιδίου οδήγησε στην απώλεια όχι μόνο της έκφρασης του γονιδίου *aflR* για τη σύνθεση της ST, αλλά και όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πενικιλίνης στον *A.nidulans*, όπως επίσης και στα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση γλοιοτοξίνης στον *A.fumigatus*. Είναι πιθανό το γονίδιο *laeA* να εμπλέκεται στο γενικότερο ρυθμιστικό κύκλωμα των δευτερογενών μεταβολιτών, των αφλατοξινών, της ST, της πενικιλίνης και της γλοιοτοξίνης σε διάφορα είδη μυκήτων. Στο διάγραμμα 1 παρατίθεται η βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Στο τμήμα Α απεικονίζεται το σύμπλεγμα των γονιδίων, ενώ στο τμήμα Β το μονοπάτι της βιοσύνθεσης. Τα βέλη στο τμήμα Β υποδηλώνουν τη σύνδεση των γονιδίων με τα ένζυμα που κωδικοποιούν, τη σύνδεση των ενζύμων με το κάθε στάδιο της βιομετατροπής στην οποία λαμβάνουν μέρος και τη σύνδεση των πρόδρομων ενώσεων με τις επόμενες.

Παρ'όλη την πολυετή μελέτη για τις συνθήκες παραγωγής αφλατοξίνης, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα¹⁷: Τι είδους εξελικτικές πιέσεις κρατούν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση αφλατοξίνης σε σύμπλεγμα; Ποιοί είναι οι γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση αφλατοξίνης και δεν

σχετίζονται με το σύμπλεγμα; Σε ποιο σημείο στο κύτταρο παράγεται η αφλατοξίνη; Επιπλέον, αν και υπάρχει αρκετή γνώση για το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης και για τα γονίδια που εμπλέκονται θεωρείται ότι δεν έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί όλα τα γονίδια²⁰. Το να γίνει αυτό απαιτείται πολύ δουλειά και δεν μπορεί να επιτευχθεί με τις παραδοσιακές τεχνικές κλωνοποίησης²⁰. Επίσης, ο μηχανισμός της παραγωγής αφλατοξίνης ανταποκρινόμενος στις περιβαλλοντικές διαφορές δεν έχει κατανοηθεί εις βάθος²⁰. Επιπλέον, ο γενικός μηχανισμός ρύθμισης της παραγωγής αφλατοξίνης, ο οποίος εξαρτάται από την έκφραση του γονιδίου *aflR* δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα²⁰.

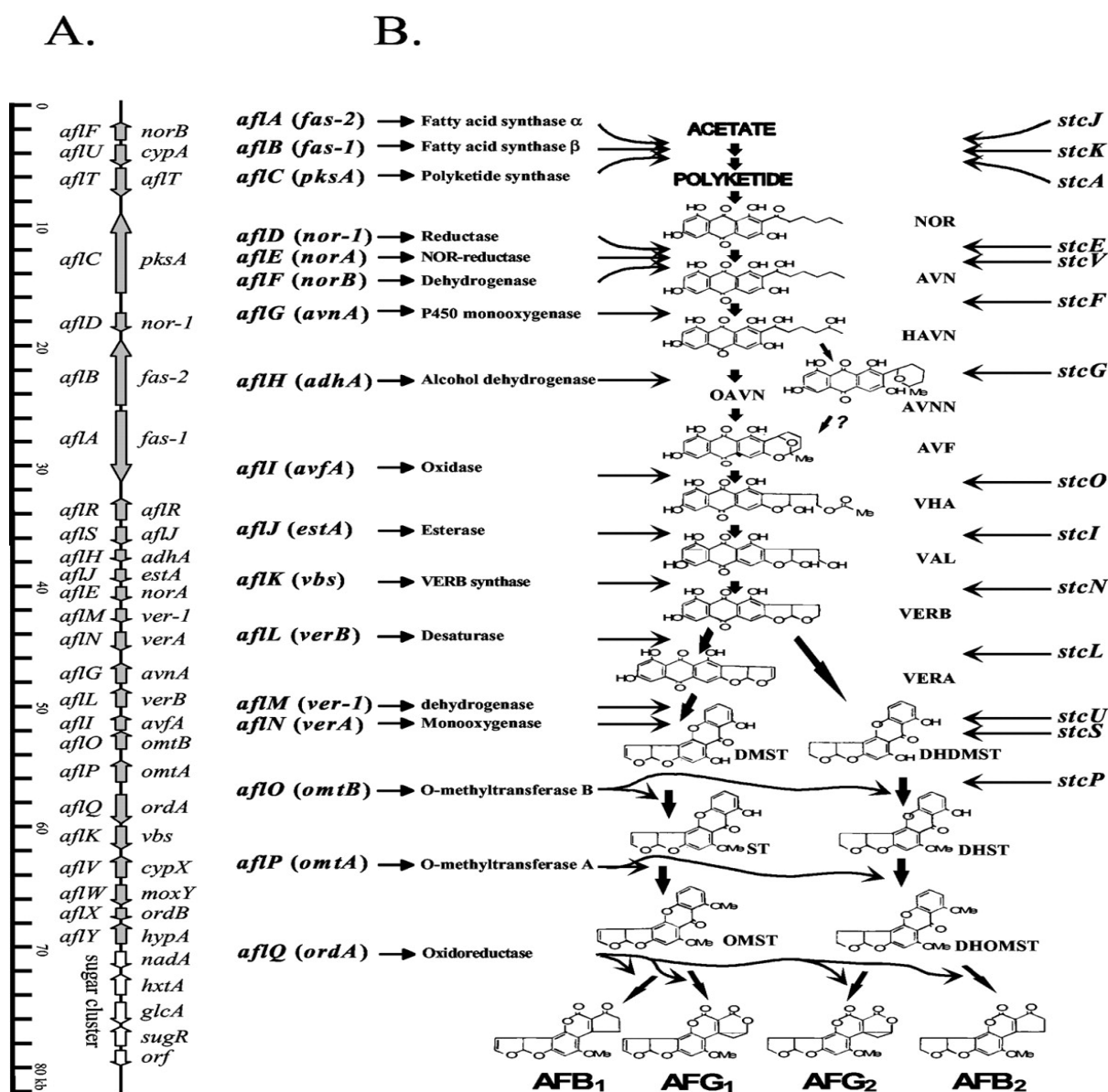
A.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης²⁰

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, είναι γνωστό ότι επιδρούν στην παραγωγή αφλατοξίνης από τοξικογόνα στελέχη των *ασπεργίλλων*. Οι μηχανισμοί σε μοριακό επίπεδο δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι αν και έχουν γίνει πολλές έρευνες και μελέτες⁴⁶. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες πιθανόν να επιδρούν στο γονίδιο ρύθμισης της αφλατοξίνης *aflR* ή να διαφοροποιούν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι αποκρίνονται σε εξωτερικά σήματα.

Ορισμένα είδη του μύκητα *A.flavus* έχουν την ικανότητα να παράγουν αφλατοξίνες: *A.flavus var. flavus*, *A.flavus ssp. parasiticus* και *A.nomius*³. Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από τους συγκεκριμένους μύκητες, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή)¹⁸. Η παρουσία των μυκήτων δεν σημειοδοτεί κατ'ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης. Γενικά, οι κλιματολογικές συνθήκες, το κατάλληλο υπόστρωμα, τα έντομα και η ευαισθησία του φυτού σε μολύνσεις από μύκητες είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή από μύκητες και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συλλογή. Σε κάθε περίπτωση, συνδέονται με παράγοντες που προκαλούν στρες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς) στους μύκητες¹⁸. Μετά τη συλλογή και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, η ανάπτυξη τοξικογόνων μυκήτων και η ενδεχόμενη παραγωγή μυκοτοξίνης επηρεάζονται από πλήθος

παραγόντων μεταξύ των οποίων η ενεργότητα νερού (a_w), το επίπεδο υγρασίας, η θερμοκρασία, ο χρόνος, το μέγεθος της ζημιάς που έχουν υποστεί οι καλλιέργειες, οι προσβολές από έντομα και άλλους μικροοργανισμούς⁴⁶ και διάφοροι χημικοί παράγοντες όπως ο αερισμός (επίπεδα O_2 και CO_2), το pH, και η παρουσία ή απουσία παρεμποδιστών θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες.

Διάγραμμα 4.1: Βιοσυνθετικό μονοπάτι αφλατοξινών www.aem.asm.org/



Συντομεύσεις:

NOR=norsolorinic acid, AVN=averantin, HAVN=5'-hydroxyaverantin, OAVN=oxoaverantin, AVNN=averufanin, AVF=averufin, VHA=versiconal hemiacetal acetate, VAL=versiconal, VERB=versicolorin B, VERA=versicolorin A, DMST=demethylsterigmatocystin, DHDMST=dihydrodemethylsterigmatocystin, ST=sterigmatocystin, DHST=dihydrosterigmatocystin, OMST=O-methylsterigmatocystin, DHOMST=dihydro-O-methylsterigmatocystin

A.4.2.1 Παράγοντες θρέψης²⁰

Θρεπτικοί παράγοντες όπως ο άνθρακας, το άζωτο, τα αμινοξέα, τα λιπίδια και τα ιχνοστοιχεία έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης.^{3A} Η σχέση μεταξύ της πηγής άνθρακα και του σχηματισμού της αφλατοξίνης έχει αποδειχθεί επαρκώς. Απλά σάκχαρα όπως γλυκόζη, μαλτόζη, αλλά όχι πεπτόνη, σορβόζη ή λακτόζη υποστηρίζουν το σχηματισμό της αφλατοξίνης. Παρ'όλα αυτά, ο μηχανισμός της ύπαρξης πηγής άνθρακα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης έχει ελαφρώς διευκρινιστεί. Η πηγή αζώτου επιδρά στο σχηματισμό της αφλατοξίνης πολλαπλώς. Η παραγωγή αφλατοξίνης είναι διαφορετική εάν στο υπόστρωμα υπάρχει νιτρώδες ή νιτρικό άλας. Τα αμινοξέα έχουν αντίστροφη επίδραση στην παραγωγή αφλατοξίνης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η τρυπτοφάνη παρεμποδίζει το σχηματισμό αφλατοξίνης ενώ η τυροσίνη ευνοεί την παραγωγή αφλατοξίνης στον *A.flavus*. Τα ιχνοστοιχεία (μεταλλικά ιόντα) έχουν επίσης αναφερθεί ότι επιδρούν στην έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης. Τα λιπίδια έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στο σχηματισμό αφλατοξίνης, όχι μόνο ως πηγή θρεπτικών συστατικών αλλά και ως υποστρώματα μεταβολισμού των αρχικών μονάδων του ακυλο-συνένζυμου Α (acyl-CoA) και ως μόρια εκπομπής σημάτων.

A.4.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

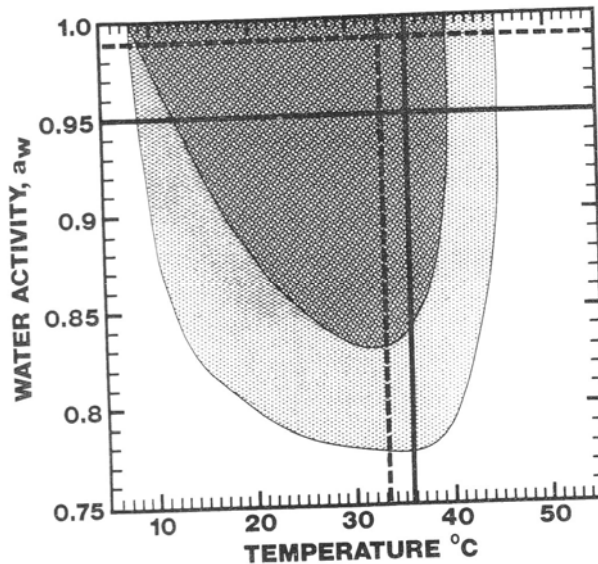
Οι εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού (a_w), παράγοντες στρες όπως η ξηρασία και άλλοι έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης²⁰ καθώς και τους πληθυσμούς των αφλατοξικογόνων μυκήτων⁴⁴. Η μόλυνση με αφλατοξίνες ποικίλει και εξαρτάται από τον καιρό που επικρατεί την καλλιεργητική περίοδο⁴⁴. Σε μελέτη για την αραχίδα στην Αυστραλία αναφέρεται αύξηση της μόλυνσης με αφλατοξίνες μετά από ξηρασία, ενώ αντίθετα μείωση μετά από επαρκείς βροχοπτώσεις⁴⁴. Πριν τη συγκομιδή, ο κυριότερος παράγοντας που επάγει την μόλυνση με αφλατοξίνες είναι οι ακανόνιστες ή ανεπαρκείς βροχοπτώσεις, ιδιαίτερα στα εδάφη που έχουν μειωμένη υδατοϊκανότητα⁴⁴. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και στις Η.Π.Α., όπου υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με το στρες ξηρασίας είναι οι κυριότεροι παράγοντες παραγωγής αφλατοξίνης⁴⁴. Πρόσφατες μελέτες θεωρούν ότι η μεταγραφή

του γονιδίου *aflR* ανταποκρίνεται σε μία G-πρωτεϊνική διάταξη εκπομπής σήματος, η οποία ελέγχεται από μία πρωτεϊνική κινάση A, ώστε το μονοπάτι εκπομπής σημάτων πιθανόν να ανταποκρίνεται στις περιβαλλοντικές επιδράσεις οι οποίες επηρεάζουν τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης²⁰.

Η παραγωγή αφλατοξίνης έχει ένα πιο περιορισμένο εύρος συνθηκών θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού απ'ότι η ανάπτυξη του μύκητα¹. Περιοριστικός παράγοντας για την προσβολή των φιστικιών από τους μύκητες αυτούς αποτελεί η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία των μη λιπαρών συστατικών των σπερμάτων.²² Η περιεκτικότητα σε υγρασία των σπερμάτων μετά την αποξήρανση στον ήλιο επί 3-4 ημέρες κατέρχεται περίπου σε 8-9-%, όταν η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος είναι 65%.²² Όταν όμως η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος αυξηθεί θα αυξηθεί και η περιεκτικότητα υγρασίας των σπερμάτων²². Σε σχετική υγρασία περιβάλλοντος 80% η υγρασία των σπερμάτων θα εξισορροπήσει στο 13%²². In vitro μελέτες συσχετίζουν την επίδραση της θερμοκρασίας και της υγρασίας (ενεργότητα νερού a_w) στην ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* και στην παραγωγή αφλατοξίνης (Σχήμα 1)¹. Σε αυτές έχουν προσδιοριστεί οριακές και βέλτιστες συνθήκες. Οι άριστες συνθήκες ανάπτυξης των *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι θερμοκρασία 36°C και ενεργότητα νερού (a_w) >0,95, ενώ σε θερμοκρασία κάτω από 8°C και a_w <0,77 οι μύκητες δεν αναπτύσσονται¹. Αλλού αναφέρεται ότι οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 17-42°C.²² Η μέγιστη παραγωγή αφλατοξίνης παρατηρείται σε θερμοκρασία 33°C (από 28-35 °C)²⁰ ή 25-35 °C²² και ενεργότητα νερού πάνω από 0,95, ενώ σε ενεργότητα νερού κάτω από 0,83 δεν παράγεται αφλατοξίνη (Εικόνα 4.1)¹. Όσο η θερμοκρασία αυξάνεται πάνω από 36°C, ο μύκητας σταματά να παράγει αφλατοξίνη αν και τα γονίδια που ελέγχουν τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης εκφράζονται. Οι ερευνητές κάνουν την υπόθεση ότι η υψηλή θερμοκρασία πιθανόν αποσταθεροποιεί την ενεργοποιό πρωτεΐνη AflR²⁰.

Η παραγωγή αφλατοξίνης συσχετίζεται στενά με τις αλλαγές του pH. Η βιοσύνθεση αφλατοξίνης στον *A. flavus* πραγματοποιείται σε όξινα υποστρώματα, αλλά παρεμποδίζεται σε αλκαλικά²⁰. Η παρουσία μιας περιοχής (PacC) κοντά στο γονίδιο *aflR* πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στην επίδραση που έχει το PH στην παραγωγή της αφλατοξίνης, καθώς και άλλες περιοχές στα γονίδια *aflR*-*aflJ* δίνουν πιθανόν τις αποδείξεις ότι η έκφραση των γονιδίων ρυθμίζεται από περιβαλλοντικά σήματα όπως το pH και τα νιτρικά άλατα²⁰.

Εικόνα 4.1¹. Επίδραση της θερμοκρασίας (T) και της ενεργότητας νερού (a_w) στην ανάπτυξη (βέλτιστες συνθήκες: μαύρες γραμμές, εύρος συνθηκών: σκιασμένη επιφάνεια) και παραγωγή αφλατοξίνης (βέλτιστες συνθήκες: διακεκομμένες γραμμές, εύρος συνθηκών: σκούρα επιφάνεια) in vitro από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*.



A.4.2.3 Παράγοντες ανάπτυξης²⁰

Ο δευτερογενής μεταβολισμός σχετίζεται με τις διεργασίες ανάπτυξης των μυκήτων όπως η δημιουργία σπορίων και ο σχηματισμός σκληρωτίων. Έχει παρατηρηθεί ότι οι συνθήκες περιβάλλοντος που απαιτούνται για το δευτερογενή μεταβολισμό και την παραγωγή σπορίων είναι παρόμοιες. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η παραγωγή σπορίων και ο σχηματισμός προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού πραγματοποιούνται στο ίδιο περίπου χρονικό διάστημα. Είδη ανεπαρκή στην παραγωγή σπορίων δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν αφλατοξίνες. Στον *A.parasiticus* συγκεκριμένες ουσίες, οι οποίες παρεμποδίζουν την σπορογένεση έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν και την παραγωγή αφλατοξίνης. Χημικές ουσίες, οι οποίες παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση πολυαμίνης στα είδη *A.parasiticus* και *A.nidulans* παρεμποδίζουν τόσο την παραγωγή σπορίων όσο και τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης/στεριγματοκυστίνης (ST). Μια βασική ένδειξη για το παραπάνω είναι ένα πρόσφατο εύρημα ότι η ρύθμιση της σπορογένεσης και της παραγωγής στεριγματοκυστίνης (ST) ελέγχεται από ένα G-πρωτεϊνικό μονοπάτι στον *A.nidulans*. Μεταλλάξεις σε γονίδια που ενεργοποιούν ένα G-πρωτεϊνικό μεταγραφικό μονοπάτι είχαν ως συνέπεια την απώλεια της έκφρασης των γονιδίων για την παραγωγή στεριγματοκυστίνης (ST) και σπορογένεσης. Το ίδιο σενάριο ισχύει και για τα είδη *A.parasiticus* και *A.flavus*. Πιο πρόσφατα, έχει υπάρξει

εξέλιξη στην ταυτοποίηση υποκαταστατών συμπλόκων, τα οποία ρυθμίζουν μαζί μορφολογικές εξελίξεις και σχηματισμό τοξινών. Σε άλλες μελέτες έχει αποκαλυφθεί ένα πρόγραμμα εκπομπής σημάτων με λιπίδια, μεταξύ του σπόρου ξενιστή και του παθογόνου ασπεργίλλου, όπου ο μύκητας προκαλεί την παραγωγή οξυγονωμένων λιπαρών οξέων του σπόρου, τα οποία με τη σειρά διεγείρουν την παραγωγή σπορίων και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων παραγωγής τοξινών.

A.4.2.4 Παράγοντες στρες και αντιοξειδωτικά⁵⁶

Σε μελέτες στη Νότια Αφρική σε αραχίδα έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του στρες ξηρασίας και αυξημένη μόλυνση με αφλατοξίνη¹. Στην αραχίδα αναφέρεται ότι οποιαδήποτε ζημιά στους καρπούς (ψίχα και κέλυφος) αυξάνει την πιθανότητα ύπαρξης του *A.flavus* και της μόλυνσης από αφλατοξίνη ανεξαρτήτως συνθηκών ανάπτυξης της καλλιέργειας^{1,2}. Η πιθανότητα γίνεται πιο ισχυρή όταν υπάρχουν και συνθήκες στρες π.χ. ξηρασία⁵⁵, υψηλή θερμοκρασία¹ αν και πιο στρεσογόνο παράγοντας στις αραχίδες φαίνεται να είναι η ξηρασία², η οποία συνδυάζεται και με την μειωμένη παραγωγή φυτοαλεξινών από την πλευρά της καλλιέργειας.⁵⁵

Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης^{3A}. Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι εφαρμογή με tert-βουτυλ υδροπεροξειδίου στον *A.flavus* προκάλεσε σημαντική αύξηση στην παραγωγή αφλατοξίνης²⁰. Το ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και με τον *A.parasiticus*²⁰.

Αντίθετα, οι υδρολυόμενες ταννίνες⁵⁶ παρεμποδίζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης με πιο αποτελεσματικό το γαλλικό οξύ²⁰. Το γαλλικό οξύ μειώνει την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στο γονίδιο *aflR*²⁰. Η προσθήκη φαινολικών ή άλλων αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ σε οξειδωτικά στρεσαρισμένο *A.flavus*, μειώθηκε σημαντικά η παραγωγή αφλατοξίνης, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη του μύκητα²⁰. Ένα άλλο αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την παραγωγή αφλατοξίνης είναι το καφεϊκό οξύ²⁰. Η παρεμποδιστική δράση των αντιοξειδωτικών φαίνεται να οφείλεται στο ότι μετριάζουν τις αντιδράσεις των ασπεργίλλων στο οξειδωτικό στρες²⁰.

A.5. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ – ΜΕΙΩΣΗΣ ΣΕ ΑΠΟΔΕΚΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ

A.5.1 Βιολογικός έλεγχος με μη τοξικογόνα στελέχη *A.flavus*^{20,34} και σαπροφυτικές ζύμες^{28,33}

Η εφαρμογή μη-τοξικογόνων στελεχών του *A.flavus* και του *A.parsiticus* στον αγρό είναι μία πολύ επιτυχημένη στρατηγική μείωσης της μόλυνσης με αφλατοξίνη πριν τη συγκομιδή. Τα μη τοξικογόνα στελέχη έχουν την ίδια ικανότητα να επιβιώσουν στο φυσικό περιβάλλον και πιθανόν να ανταγωνίζονται τα τοξικογόνα στελέχη. Αυτή η μέθοδος της αντικατάστασης του τοξικογόνου πληθυσμού από μη-τοξικογόνο έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στο βαμβάκι, στην αραχίδα και στον αραβόσιτο. Τα στελέχη τα οποία επιλέγονται για βιολογική καταπολέμηση θα πρέπει να ικανοποιούν δύο βασικά κριτήρια: θα πρέπει να είναι γενετικά σταθερά έτσι ώστε να μην παράγουν αφλατοξίνη υπό οποιεσδήποτε συνθήκες, και δεύτερον, θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά ώστε να επικρατούν των τοξικογόνων στελεχών στη φύση^{3A}. Στο βαμβάκι, το μη τοξικογόνο στέλεχος AF36^{2A,34} πήρε έγκριση για εφαρμογή στις βαμβακοκαλλιέργειες επιδεικνύοντας την υψηλότερη ικανότητα επιβίωσης και τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μείωση του επιπέδου της αφλατοξίνης (<^{20p1pb} στους αγρούς με εφαρμογή του AF36 και >100ppb στους αγρούς-μάρτυρες). Παρόμοιες εφαρμογές έχουν γίνει με επιτυχία στον αραβόσιτο και την αραχίδα. Επίσης το μη τοξικογόνο στέλεχος *A.flavus* TX9-8 έχει απομονωθεί και δοκιμασθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα ως ανταγωνιστικό των τοξικογόνων στελεχών του *A.flavus*³⁴.

Μία άλλη εφαρμογή αφορά σαπροφυτικές ζύμες, οι οποίες είναι πολύ κοινές στην επιφάνεια των φύλλων και των καρπών²⁸. Κάποιες από αυτές οι οποίες απομονώθηκαν από αμύγδαλα, φιστίκια και φουντούκια δοκιμάζονται ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα σε σχέση με τον *A.flavus*²⁸. Ένα συγκεκριμένο στέλεχος της ζύμης *Pichia anomala* WRL-076 δοκιμάστηκε σε φιστικεάνες στην Καλιφόρνια με αποτέλεσμα να υπάρξει μείωση στον αποικισμό από τον *A.flavus* και μείωση της παραγωγής σπορίων³³.

A.5.2 Ανθεκτικότητα του ξενιστή μέσω πολλαπλασιασμού και γενετικής μηχανικής²⁰

Τα είδη *A.flavus* και *A.parasiticus* βρίσκονται σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών υλικών σε παγκόσμια κλίμακα. Ζημιές των φυτικών υλικών που προκαλούνται από έντομα ή περιβαλλοντικό στρες δίνει τη δυνατότητα στους μύκητες να εισβάλλουν στους καρπούς όπου ευδοκιμούν σε υψηλές θερμοκρασίες και ξηρασία. Για την πρόληψη της μόλυνσης πριν τη συγκομιδή υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών – ξενιστών στα έντομα, στο φυτικό στρες και σε καλλιεργητικά χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών είναι η πιο αποτελεσματική και οικονομική στρατηγική για τη μείωση και εξάλειψη της μόλυνσης των καλλιεργειών προ-συλλεκτικά με αφλατοξίνη. Ανθεκτικότητα των καλλιεργειών στην μόλυνση με αφλατοξίνη μπορεί να επιτευχθεί κυρίως με τρεις τρόπους: 1) ανθεκτικότητα στην εισβολή του μύκητα 2) παρεμπόδιση του σχηματισμού αφλατοξίνης και 3) ανθεκτικότητα στα έντομα. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η εμπορικά πλέον παραγωγή των διαγονιδιακών Bt (από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*) καλαμποκιού και αραχίδας. Σε αυτά τα φυτά έχει ενσωματωθεί γονίδιο από το προαναφερόμενο βακτήριο και παράγουν μία πρωτεΐνη (η οποία αναφέρεται ως Cry πρωτεΐνη λόγω της κρυσταλλικής της δομής) η οποία είναι τοξική σε διάφορα έντομα. Αυτά τα διαγονιδιακά φυτά είναι εμπορικά διαθέσιμα από τα μέσα της δεκαετίας του '90 και εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνη.

A.5.3 Καταπολέμηση²²

Η προστασία των καρπών πάνω στο δένδρο δεν είναι εφικτή. Καλά αποτελέσματα δίνει η απομάκρυνση των καρπών κακής ποιότητας κατά την επεξεργασία τους μετά τη συγκομιδή. Μια τέτοια διαλογή με το χέρι είναι πολύ χρονοβόρα αλλά έχει πολύ καλά αποτελέσματα. Στις ΗΠΑ μελετήθηκε η κατασκευή ενός ηλεκτρονικού διαλογέα που βασίζεται σε εικόνα^{24,43}. Με αυτή θα είναι δυνατό να απομακρυνθεί ένα μεγάλο ποσοστό προσβεβλημένων καρπών. Σήμερα, τα μέτρα που μπορούν να εφαρμοστούν είναι τα εξής:

- Ταχεία αποφλοιώση και αποξήρανση των καρπών μετά τη συγκομιδή.
- Αποθηκευτικοί χώροι καθαροί, στεγνοί, με χαμηλή σχετική υγρασία.
- Αυτόματο σύστημα οπτικής ανίχνευσης προβληματικών καρπών⁴³.

A.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Η ανίχνευση των αφλατοξινών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρουν στην υγεία ανθρώπων και ζώων η ύπαρξή τους στα τρόφιμα ή τις ζωοτροφές. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι ζωτικής σημασίας το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβής, αξιόπιστες και επικυρωμένες¹⁵. Εάν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο ή αντίστροφα, προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές δημιουργώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο.

Νομοθετικά (Καν. 882/2004 Παρ.3), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) ορθότητα
- β) ευκολία εφαρμογής
- γ) όριο ανίχνευσης
- δ) όριο προσδιορισμού
- ε) ακρίβεια (λαμβάνεται από διεργαστηριακή δοκιμή)
- στ)επαναληψιμότητα
- ζ) αναπαραγωγιμότητα
- η) ανάκτηση
- θ) επιλεκτικότητα
- ι) ευαισθησία
- ια) γραμμικότητα
- ιβ) αβεβαιότητα

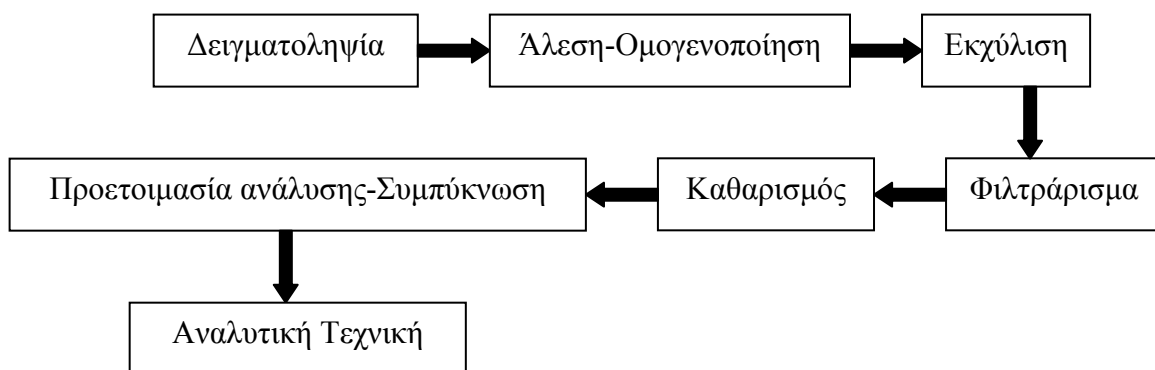
Για την ανάλυση των αφλατοξινών στα τρόφιμα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of Analytical Communities)^{9,10,11,12,15}. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό των αφλατοξινών¹⁵ λαμβάνοντας υπ' όψιν τα θεσμοθετημένα όρια.

Είναι επίσης αναγκαίο τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους με ποσοστά απόδοσης όπως απαιτούνται από τη νομοθεσία (Καν 401/2006)⁵.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα προσδιορισμού, η χρήση των οποίων εξαρτάται από την υλικοτεχνική υποδομή που έχουν τα διάφορα εργαστήρια, τις οικονομικές τους δυνατότητες, τον χρόνο της ανάλυσης και την ευαισθησία της⁴⁵. Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο της ύπαρξης αφλατοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία⁴⁷, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των αφλατοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και τέλος ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός^{3,7,14,45} με διάφορες μεθόδους.

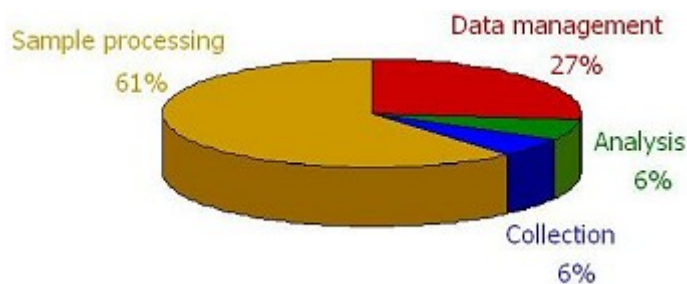
Στα διαγράμματα 6.1 και 6.2 παρουσιάζονται οι διαδικασίες που ακολουθούνται για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών σε κάποιο δείγμα και η κατανομή του χρόνου στα διάφορα στάδια της διαδικασίας.

Διάγραμμα 6.1: Τυπικό διάγραμμα ροής προσδιορισμού αφλατοξινών



Διάγραμμα 6.2: Κατανομή χρόνου σε μια ανάλυση αφλατοξινών αλλά και μυκοτοξινών γενικότερα

www.mycotoxins.org/



A.6.1 Δειγματοληψία^{45,47}

Η δειγματοληψία αφορά την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας, στο οποίο θα γίνει και η ανάλυση. Η δειγματοληψία είναι το πιο σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα^{3,32}. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ένας στους $10^4 - 10^6$ καρπούς είναι μολυσμένος με αφλατοξίνη³². Στον ευρωπαϊκό κανονισμό που καθορίζεται ο τρόπος δειγματοληψίας για τον έλεγχο των αφλατοξινών στα τρόφιμα αναφέρεται επίσης ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια με την οποία καθορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών, τα οποία κατανέμονται κατά τρόπο ανομοιόμορφο σε μία παρτίδα⁵ και ότι οι αφλατοξίνες κατανέμονται κατά τρόπο πολύ ανομοιογενή σε μια παρτίδα, ειδικότερα σε παρτίδα τροφίμων με σωματίδια μεγάλου μεγέθους⁵ όπως είναι τα κελυφωτά φιστίκια.

A.6.2 Προετοιμασία δείγματος⁴⁵

Η προετοιμασία αποσκοπεί στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια, να υπάρχει καλύτερη εκχύλιση από τον διαλύτη³. Η άλεση του δείγματος και η δημιουργία μικρών σωματιδίων ομογενοποιεί το δείγμα, στάδιο το οποίο αν και χρονοβόρο είναι απολύτως απαραίτητο και βασικό στην ανάλυση¹⁵.

A.6.3 Εκχύλιση⁴⁵

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των αφλατοξινών στα διάφορα υποστρώματα ή τρόφιμα⁷. Λόγω της διαφορετικής φύσης των προϊόντων που είναι δυνατό να μολυνθούν από αφλατοξίνες, δεν υπάρχει μία μοναδική μέθοδος κατάλληλη για όλα τα προϊόντα³. Η εκχύλιση υγρού-στερεού είναι μία από τις συνήθεις διαδικασίες στην ανάλυση αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα⁷. Η εκχύλιση, κατά ένα μεγάλο μέρος εξαρτάται από τις φυσικο-χημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με αφλατοξίνες^{3,7} και ουσιαστικά βασίζεται στη διαλυτότητα των αφλατοξινών σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες⁷. Για παράδειγμα, υλικά με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και χρωστικές απαιτούν μία πιο εκλεκτική εφαρμογή, η οποία ακολουθείται από εκτεταμένες μεθόδους καθαρισμού³

για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης. Ο διαλύτης θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να εκχylίζει μόνο αυτό που θέλουμε να αναλύσουμε –αφλάτοξίνη- με την προσθήκη όσο το δυνατό λιγότερων χημικών ενώσεων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδρασή τους στο τελικό στάδιο της ανάλυσης⁷. Για την εκχύλιση, χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή μίγματά τους όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη, λόγω του ότι οι αφλατοξίνες είναι διαλυτές σε μετρίως ή ελαφρώς πολικούς διαλύτες^{3,6}. Επίσης, η χρήση μικρών ποσοτήτων νερού σε συνδυασμό με τους προαναφερόμενους διαλύτες υγραίνει το υπόστρωμα αυξάνοντας έτσι τη διείσδυση των οργανικών διαλυτών στο δείγμα άρα βελτιώνει την εκχύλιση της αφλατοξίνης³. Οι πιο συνήθεις διαλύτες για την εκχύλιση αφλατοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι μίγματα χλωροφορμίου-νερού, μεθανόλης-νερού, μεθανόλης-ακετονιτριλίου-νερού και ακετονιτριλίου νερού^{7,9,10,11,15}. Ο διαλύτης μεθανόλη-νερό έχει το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο τοξικός σε σχέση με τα μίγματα ακετονιτριλίου¹⁵. Σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, όπως τα κελυφωτά φιστίκια (περισσότερο από 50%)⁷, συστήνεται η προσθήκη μη-πολικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, για το διαχωρισμό του λίπους^{3,7}.

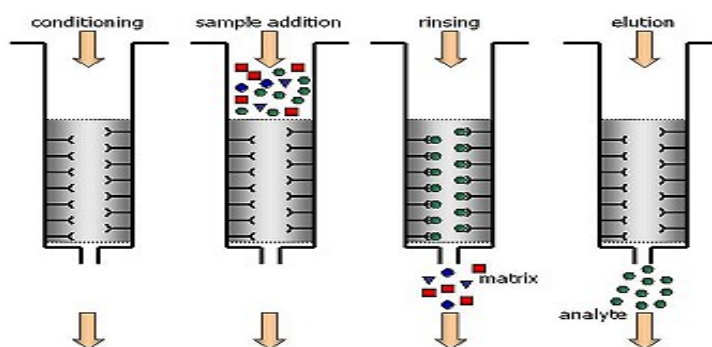
Σε τελευταίες δημοσιεύσεις αναφέρεται και η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (Pressurized Fluid Extraction – PFE) με την εμπορική ονομασία εκχύλιση επιταγχνόμενου διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction – ASE)⁷. Σε αυτή χρησιμοποιούνται διαλύτες σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης εκχύλιση του αναλύτη από στερεά ή ημι-στερεά υποστρώματα με μικρότερες ποσότητες διαλυτών σε μικρότερο χρόνο⁷. Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση αυξάνει την απόδοση λόγω του ότι μειώνεται το ιξώδες των οργανικών διαλυτών και αυξάνει η διαλυτική τους ικανότητα, αλλά εξασθενεί και η ισχυρή σύνδεση αφλατοξίνης-υλικού υποστρώματος⁷. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οργανικός διαλύτης να διεισδύει περισσότερο στο υπόστρωμα και να βελτιστοποιείται η εκχύλιση⁷. Η αύξηση της θερμοκρασίας πρέπει να είναι μέχρι ενός κατάλληλου ορίου ώστε να μην μειωθεί η εκλεκτικότητα του διαλύτη και συμπαρασύρει και άλλες ουσίες⁷. Η PFE μέθοδος έχει εφαρμοστεί για πολλούς αναλύτες σε διάφορα δείγματα, μεταξύ των άλλων για την ανάλυση αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια με τη χρήση κατάλληλης συσκευής⁷. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου έδειξαν διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους

εκχύλισης, όπως υψηλότερη απόδοση, χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης και μικρότερο όγκο διαλύτη⁷.

A.6.4 Καθαρισμός⁴⁵

Οι περισσότερες μέθοδοι που κυρίως χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια βασίζονται συνήθως σε μία διαδικασία καθαρισμού⁸ ο οποίος πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση. Γενικότερα, όπου ο καθαρισμός αποτελεί απαραίτητο στάδιο της διαδικασίας, όπως στα κελυφωτά φιστίκια, χρησιμοποιούνται διαχωριστές υγρού-υγρού (φίλτρα) ή πιο πρόσφατα συσκευές εκχύλισης στερεής φάσης (solid phase extraction cartridges) και στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC)^{3,15,37}. Οι τελευταίες, αποτελούν το πιο σύγχρονο εργαλείο καθαρισμού για τις αναλύσεις αφλατοξίνης^{3,37} (Εικόνα 6.4.1) Μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι πολύ εξειδικευμένα για αφλατοξίνες ακινητοποιούνται επάνω σε σεφαρόζη και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε μικρές στήλες³⁷. Η προς εξέταση τοξίνη συλλέγεται με έκλυση με κατάλληλο διαλύτη. Έτσι, τα εκχυλίσματα από το δείγμα του τροφίμου περνούν μέσα από τη στήλη και τελικά παραλαμβάνεται ένα εντελώς καθαρό εκχύλισμα ελεύθερο από άλλες ουσίες³⁷.

Εικόνα 6.4.1 Βασικές αρχές λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας³⁸



Οι στήλες ανοσοσυγγένειας έχουν δείξει πολλά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε διάφορα τρόφιμα¹⁵ λόγω του ότι δίνουν τη δυνατότητα μεγαλύτερων όγκων εκχυλίσματος του δείγματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου^{15,45}. Επιπλέον, δεν είναι απαιτητικές όσον αφορά την ικανότητα και την εμπειρία που απαιτείται από το χρήστη¹⁵. Ως μοναδικό μειονέκτημα είναι το κόστος¹⁵, λόγω του ότι είναι μιας χρήσης.

Ο ρυθμός ροής του υγρού της εκχύλισης από τα διάφορα φίλτρα καθαρισμού είναι πολύ σημαντικός για την απόδοση της εκχύλισης και την παραλαβή όσο το δυνατό πιο καθαρής αφλατοξίνης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όσο μειώνεται ο ρυθμός ροής και αυξάνει έτσι ο χρόνος του καθαρισμού, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης λόγω του ότι ο χρόνος επαφής του διαλύτη και του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος⁷.

Το διάλυμα που εκχυλίζεται μετά και τον καθαρισμό συλλέγεται και συμπυκνώνεται για την περαιτέρω ανάλυση³.

A.6.5 Μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών⁴⁵

A.6.5.1 TLC – HPLC- ELISA

Διάφορες μέθοδοι για την ανάλυση αφλατοξινών στα φιστίκια είναι διαθέσιμες και αναφέρονται στη βιβλιογραφία⁷: TLC, HPLC, RIA, ELISA, SPR και ανοσοδοκιμές⁶. Η τεχνική ανάλυσης με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC-Thin Layer Chromatography) χρησιμοποιούνταν εκτενέστατα για ανάλυση αφλατοξίνης^{3,7} και είχε προταθεί ως επίσημη μέθοδος ανάλυσης αφλατοξινών για κελυφωτά φιστίκια από τον AOAC⁷. Αργότερα, σημειώθηκε μία σημαντική αύξηση στη χρήση της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), η οποία έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης - HPLC^{3,7}. Πλέον, η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η HPLC για την ανάλυση αφλατοξίνης⁸, αλλά και άλλων μυκοτοξινών (π.χ. πατουλίνης σε χυμό μήλου, ωχρατοξίνης σε αραβόσιτο)⁸, λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με την μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent)³. Οι τεχνικές ανοσοδιαγνωστικής όπως η ELISA και η RIA επιδεικνύουν ταχύτητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων, εντούτοις η χρήση τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως συμπληρωματική.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της HPLC έχει αυξηθεί με αποτέλεσμα να έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες για την εφαρμογή της στην ανάλυση αφλατοξινών^{3,15} αλλά και έχει γίνει αποδεκτή από τις επίσημες μεθόδους ανάλυσης AOAC για αφλατοξίνες^{9,10,11,37}. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου ανάλυσης με HPLC φαίνεται να είναι η δυνατότητα αυτοματοποίησης³ όπως επίσης η ταχύτητα και η υψηλή ανάλυση⁸. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η υπεροχή και επικράτηση της HPLC ως

μεθόδου για την ανάλυση αφλατοξινών σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους και ιδιαίτερα τις ανοσοχημικές είναι ο υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας και ακρίβειάς της^{3,8,15,37}. Η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει εφαρμοστεί σε μια σειρά υποστρωμάτων και τροφίμων για τον έλεγχο της παρουσίας σε αφλατοξίνες όπως σιτηρά, μυκηλιακά εκχυλίσματα, βαμβακόσπορο, κρασί, αραβόσιτο, ξηροί καρποί, μπαχαρικά κ.α.⁸ Παρ' όλα αυτά η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει κόστος και απαιτεί πιο εξειδικευμένο και έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό¹⁵.

A.6.5.2 NP-HPLC και RP-HPLC

Τα πρώτα χρόνια εφαρμογής της μεθόδου χρησιμοποιούνταν η HPLC κανονικής φάσης με σύστημα ανίχνευσης για απορρόφηση στο UV. Γρήγορα αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ικανοποιητική για τον προσδιορισμό αφλατοξίνης σε επίπεδα νανογραμμάρων (ng)³. Λόγω του ότι οι αφλατοξίνες φθορίζουν, ένα σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης θεωρήθηκε καταλληλότερο, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου³. Ένα όμως από τα πιο σημαντικά προβλήματα είναι η εξάρτηση της ικανότητας φθορισμού των κυρίων αφλατοξινών (B₁, B₂, G₁, G₂) από τη σύνθεση του διαλύτη³. Η NP-HPLC από την δεκαετία του '70 σταμάτησε να χρησιμοποιείται μετά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης, λόγω μειωμένης επαναληψιμότητας των χρόνων συγκράτησης όταν το νερό ή οργανικοί διαλύτες μεταβάλλουν την υγρασία του χρωματογραφικού μέσου (silica ή αλουμίνα). Σήμερα, η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως HPLC χωρίς να επεξηγείται ιδιαίτερα. Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη-πολική στατική φάση (συνήθως silica στο οποίο έχει εφαρμοστεί RMe₂SiCl, όπου R είναι αλκύλιο όπως C₁₈H₃₇ ή C₈H₁₇) και μία υδατική μέτρια πολική κινητή φάση. Το σύστημα RP-HPLC αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ευκολίας στο χειρισμό και της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση³.

A.6.5.3 Παραγωγοποίηση

Συνεπώς, μετά την επικράτηση της HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) η ανάλυση αφλατοξινών πραγματοποιείται με κινητή φάση μεθανόλης-νερού³ ή ακετονιτριλίου-

νερού³ ή μίγματος νερού-ακετονιτριλίου-μεθανόλης σε ορισμένη αναλογία. Όμως, σε αυτούς τους υδατικούς διαλύτες, ο φθορισμός της B₁ και G₁ αφλατοξίνης είναι χαμηλός^{3,8} με αποτέλεσμα να χρειάζεται μία μέθοδος μετατροπής των B₁ και G₁ στα ισχυρώς φθορίζοντα υδροξυλιωμένα παράγωγά τους B_{2a} και G_{2a}^{3,8}. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται παραγωγοποίηση. Τα παράγωγα B_{2a} και G_{2a} αναφέρεται ότι φθορίζουν περισσότερο στους πολικούς διαλύτες από ότι τα B₁ και G₁⁸.

Διάφορες μέθοδοι παραγωγοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί και ερευνηθεί ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Αρχικά, το 1977 περίπου, η παραγωγοποίηση γίνονταν πριν το έκλουσμα εισαχθεί στη στήλη (pre-column derivatization) με την προσθήκη ισχυρών οξέων όπως το τριφθοροοξικό οξύ (trifluoroacetic acid – TFA)³. Αργότερα, το 1978 η μέθοδος παραγωγοποίησης με το TFA χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αφλατοξινών σε μια σειρά προϊόντων^{3,37} και το 1980 επεκτάθηκε και για τον προσδιορισμό της M₁ αφλατοξίνης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα³. Όμως, η χαμηλή σταθερότητα των B_{2a} και G_{2a} παραγώγων στη μεθανόλη (διαλύτη της κινητής φάσης) θεωρήθηκε βασικό μειονέκτημα της μεθόδου και αντικαταστάθηκε από μεθόδους παραγωγοποίησης μετά την είσοδο του εκλούσματος στη στήλη (post-column derivatization)^{3,37}. Επιπλέον, με την αυτοματοποίηση του συστήματος της HPLC, οι μετα-τη στήλη μέθοδοι παραγωγοποίησης προτιμώνται λόγω της μείωσης των απαιτούμενων χειρισμών για κάθε δείγμα³.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες post-column μέθοδοι παραγωγοποίησης με οξειδωτικά όπως ιώδιο και βρώμιο^{3,15}. Η μέθοδος παραγωγοποίησης με ιώδιο έγινε αποδεκτή ως επίσημη μέθοδος από τον AOAC-IUPAC. Αν και τα αποτελέσματα με αυτή την μέθοδο ήταν αξιόπιστα αναφέρονται όμως πολλά μειονεκτήματα : απαιτείται πολύς χρόνος για την σταθεροποίηση της θερμοκρασίας της κινητής φάσης (τουλάχιστο 1 ώρα) στους 75⁰C, αραίωση λόγω της προσθήκης του αντιδραστηρίου, καθημερινή προετοιμασία του διαλύματος ιωδίου για λόγους σταθερότητας, η αναγκαιότητα δεύτερης αντλίας μετά τη στήλη, καθώς και η χρήση κορεσμένων διαλυμάτων η οποία συνεισφέρει στη μεγάλη φυσική και μηχανική φθορά του σωλήνα-συνδέσμου αλλά και της αντλίας λόγω της παρατεταμένης επαφής με το ιώδιο³. Μία εναλλακτική λύση της προσθήκης ιωδίου αναπτύχθηκε το 1987, σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιείται μία μικρή στήλη γεμισμένη με ιώδιο σε στερεά μορφή³. Αντί για ιώδιο είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί βρώμιο για παραγωγοποίηση. Το βρώμιο είναι πιο ισχυρό οξειδωτικό από το ιώδιο,

αλλά είναι λιγότερο σταθερό, γι' αυτό χρησιμοποιείται ένα ηλεκτροχημικό σύστημα παραγωγής (Kobra cell)³. Το 1993, αναπτύχθηκε μία νέα τεχνική post-column παραγωγοποίησης με τη χρήση πυριδινικού βρωμιούχου υπερβρωμιδίου (Pyridinium bromide perbromide – PBPB). Το PBPB παρέχει ένα σταθερό διάλυμα, το οποίο δεν απαιτεί περαιτέρω αντιδράσεις ή αύξηση των θερμοκρασιών³. Επίσης, η τεχνική αυτή δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό³.

Μία άλλη εναλλακτική μέθοδος για την αποφυγή των παραπάνω δυσκολιών με το ιώδιο και το βρώμιο είναι η χρήση κυκλοδεξτρινών (CDs)³. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικά oligομερή, τα οποία περιέχουν από 6 έως 8 μονάδες γλυκόζης που συνδέονται με έναν α 1→4 δεσμό³. Παράγονται από τις δεξτράνες μέσω του ενζύμου CD-τρανσγλυκολάση³. Οι κυκλοδεξτρίνες δημιουργούν σύμπλοκα με τις αφλατοξίνες B₁ και G₁, τα οποία αυξάνουν την ένταση φθορισμού³. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητές τους περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία³.

Το τελευταίο διάστημα χρησιμοποιείται η φωτοχημική παραγωγοποίηση, η οποία πολύ πρόσφατα (2005) έγινε αποδεκτή από τον AOAC για τον επίσημο έλεγχο αφλατοξινών σε τρόφιμα¹⁰. Η τεχνολογία της φωτοχημικής παραγωγοποίησης είναι γνωστή αρκετές δεκαετίες και χρησιμοποιείται σε άλλες αναλύσεις^{1A}. Στη φωτοχημική παραγωγοποίηση, οι διαλύτες της κινητής φάσης της HPLC και κυρίως το νερό διεγείρεται φωτοχημικά με τη χρήση UV ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 254nm^{1A} με αποτέλεσμα η B₁ και η G₁ να μετατρέπονται εξειδικευμένα και μη αναστρέψιμα στα ισχυρώς φθορίζοντα παράγωγά τους B_{2a} και G_{2a} μέσω υδροξυλίωσης ενός διπλού δεσμού στο χημικό μόριο της αφλατοξίνης^{1A}. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο νερού δεσμεύεται από ένα μόριο αφλατοξίνης^{1A}. Λόγω του ότι η φωτοχημική παραγωγοποίηση είναι μόνιμη η ανίχνευση σε φθορισμομετρικό ανιχνευτή γίνεται εύκολα^{1A}. Τα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους παραγωγοποίησης είναι ότι δεν χρειάζονται επιπλέον αντιδραστήρια και αντλίες διότι το νερό ως αντιδραστήριο υπάρχει στην κινητή φάση^{1A}. Το αποτέλεσμα είναι να μειώνεται το κόστος της ανάλυσης, τα στάδια είναι λιγότερα και απλοποιείται η διαδικασία^{1A}. Επίσης, ο προσδιορισμός των άλλων αφλατοξινών B₂ και G₂ ή M₁ και M₂ δεν επηρεάζεται και γίνεται ταυτόχρονα^{1A}. Το μοναδικό ζήτημα είναι η παραγγελία του μηχανήματος UV και το κόστος αγοράς. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

A.7. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί σε ποιο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας και κάτω από ποιες πρακτικές παράγεται η αφλατοξίνη στα κελυφωτά φιστίκια από Ελλάδα με στόχο να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα (καλλιεργητικά, επεξεργασίας, αποθήκευσης) προκειμένου να μειωθεί εντός των επιτρεπόμενων ορίων η συγκέντρωση της αφλατοξίνης στο τελικό προϊόν.

Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν:

- 1) Παρακολούθηση και δειγματοληψία φιστικιών από 4 αγρούς διαφορετικών περιοχών σε όλες τις φάσεις παραγωγής και μεταποίησης (από το χωράφι έως και την αποθήκευση)
- 2) Εφαρμογή διαλύματος άλατος σε αποφλοιωμένα φιστίκια πριν την ξήρανση
- 3) Ανάπτυξη και ταυτοποίηση των τοξικογόνων μυκήτων σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα σε κάθε στάδιο παραγωγής - επεξεργασίας
- 4) Συσχέτιση της προσβολής των καρπών από έντομα πριν τη συλλογή και της παρουσίας/ανάπτυξης αφλατοξικογόνων μυκήτων
- 5) Ποσοτικός προσδιορισμός των αφλατοξινών στα δείγματα αγρού και ταυτοποίησης.

B. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΓΡΩΝ – ΣΗΜΑΝΣΗ ΔΕΝΔΡΩΝ

Στις αρχές Ιουλίου (3-7-08), εντοπίστηκαν και επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι πειραματικοί αγροί, οι οποίοι θα συμμετείχαν στις δειγματοληψίες και τη μελέτη για την ύπαρξη αφλατοξίνης στα φιστίκια. Προσδιορίστηκαν 4 πειραματικοί αγροί σε διαφορετικές ζώνες φιστικοπαραγωγής: Κτήμα Α, Β, Γ, Δ (Εικόνες Γ.1.1, Γ.1.2, Γ.1.3, Γ.1.4) και σε κάθε έναν επιλέχθηκαν 20 δένδρα, τα οποία και σημάνθηκαν κατάλληλα (Εικόνα Β.1.1). *Εξαιρέση:* στο Κτήμα Γ περιλήφθηκαν στον πειραματικό αγρό παραπάνω δένδρα λόγω μεγάλης προσβολής και κακής κατάστασης των δένδρων, ώστε να μην υπάρξει πρόβλημα με τη συλλογή δειγμάτων.

Εικόνα Β.1.1. Σήμανση δένδρων στους πειραματικούς αγρούς



Τα δένδρα παρακολουθούνταν ως προς τις επεμβάσεις φυτοπροστασίας, άρδευσης και λίπανσης και τα δεδομένα αυτά καταγράφονταν μαζί με το ιστορικό του κάθε χωραφιού. Τα κτήματα αυτά εμφάνιζαν διαφορετική εικόνα όσον αφορά τις προσβολές από έντομα, καθώς και τις επεμβάσεις φυτοπροστασίας (Πίνακες Β1 έως Β4).

B.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ

Σε κάθε δειγματοληψία από τον αγρό λαμβάνονταν δύο δείγματα: το **δείγμα αγρού** και το **δείγμα ταυτοποίησης**. Το πρώτο (δείγμα αγρού) αφορούσε την ανάλυση των καρπών ως προς την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνη και το δεύτερο (δείγμα ταυτοποίησης) αφορούσε την μελέτη των καρπών ως προς την παρουσία των μυκήτων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή αφλατοξίνης στο περικάρπιο (φλούδα), στο ξυλώδες ενδοκάρπιο (κέλυφος) όσο και στο σπέρμα (ψίχα). Όλα τα δείγματα μεταφέρονταν αυθημερόν στο ΓΠΑ. Το δείγμα αγρού καταψύχονταν στους -18° C όπου και παρέμενε μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης. Το δείγμα ταυτοποίησης αποθηκευόταν για λίγες ώρες σε ψυγείο και στη συνέχεια ακολουθούσε η διαδικασία για την απομόνωση των μυκήτων η οποία περιγράφεται παρακάτω. Στη συνέχεια, μέρος των καρπών αυτών (μισοί) αναλύθηκαν και προσδιορίστηκαν για την ύπαρξη αφλατοξινών ώστε να συνδεθεί η εικόνα της παρουσίας των μυκήτων και της τοξίνης.

1^η Δειγματοληψία (αγρός) – Αρχή ωρίμανσης

Η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 31 Ιουλίου (Εικόνα B.2.1). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν αυθημερόν στο εργαστήριο του ΓΠΑ. Στο στάδιο αυτό, η δειγματοληψία για το δείγμα αγρού έγινε με βάση τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής, της 23^{ης} Φεβρουαρίου 2006, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα σε ποσότητα ανάλογη της αναμενόμενης ηρτημένης παραγωγής.

Για το δείγμα ταυτοποίησης συλλέχθηκαν τυχαία 60 καρποί συνολικά : 30 υγιείς (χωρίς κανένα εμφανές σημάδι από προσβολή εντόμου ή μεταχρωματισμό ή μαύρισμα ή πληγή ή χτύπημα) και 30 προβληματικοί (μαύροι, χτυπημένοι, άσπερμοι).

Το κάθε δείγμα αγρού συλλεγόταν σε τρίχινους σάκους ώστε να αερίζεται καλύτερα ο καρπός, σφαινοτάταν κατάλληλα για κάθε αγρό ξεχωριστά (π.χ. Κτήμα Α – Αγρός – Ημερομηνία) και μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Μηχανικής – Επεξεργασίας - του ΓΠΑ.

Εικόνα Β.2.1. Κτήμα Α : 1^η Δειγματοληψία στο χωράφι – Αρχή ωρίμανσης



2^η Δειγματοληψία - Ωρίμανση

Η δεύτερη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 13 Αυγούστου. Ακολούθηθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για το 2^ο δείγμα, εκτός των άλλων καρπών λήφθηκαν και καρποί οι οποίοι εμφάνιζαν σχισίματα στο εξωκάρπιο (φλούδα) λόγω υπερωρίμανσης και οι οποίοι σημάνθηκαν ξεχωριστά.

3^η Δειγματοληψία – Συγκομιδή

Η 3η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τη συγκομιδή των πειραματικών αγρών σε διαφορετικές ημερομηνίες για κάθε κτήμα ανάλογα την ημέρα που συγκόμισε ο παραγωγός (Εικόνες 7 & 8). Οι ημερομηνίες συγκομιδής για κάθε κτήμα χωριστά περιγράφονται στους Πίνακες Β1 έως Β4. Από το Κτήμα Γ δεν συλλέχθηκε δείγμα συγκομιδής διότι δεν θεωρήθηκε σκόπιμο λόγω του ότι η συγκομιδή έγινε κοντά στην ημερομηνία της 2^{ης} δειγματοληψία. Επιπλέον, η παραγωγή ήταν πολύ μικρή σε αυτόν το φιστικεώνα λόγω των έντονων προσβολών από ευρύτομο²² και σκώρο²² και θεωρήθηκε σημαντικότερο να παραμείνει το δείγμα και να συλλεχθεί στην 4^η δειγματοληψία (ξήρανση).

Τα σημασμένα δένδρα (20) από κάθε πειραματικό αγρό συγκομίστηκαν χωριστά από τα υπόλοιπα και συλλέχθηκαν τα δείγματα όπως προαναφέρθηκε (Δείγμα Αγρού και Δείγμα

Ταυτοποίησης). Στο στάδιο αυτό, η δειγματοληψία για το Δείγμα Αγρού έγινε από τους σάκους συγκομιδής με βάση τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής, της 23^{ης} Φεβρουαρίου 2006, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα.

Για το Δείγμα Ταυτοποίησης, οι καρποί συλλέχθηκαν και σημάνθηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω (1^η Δειγματοληψία). Σε αυτό το στάδιο ήταν δυσκολότερο Να διαχωριστούν οι υγιείς από τους χτυπημένους καρπούς λόγω του ότι μετά τη διαδικασία της συγκομιδής όλοι οι καρποί είχαν υποστεί τραυματισμούς.

Εικόνα Β.2.2 Κτήμα Δ : Συγκομιδή φιστικιού



Εικόνα Β.2.3. Κτήμα Δ : Καθάρισμα καρπού κατά τη συγκομιδή



4^η Δειγματοληψία – Ξήρανση

Συλλέχθηκαν τα δύο είδη δειγμάτων από κάθε αγρό μετά την διαδικασία της ξήρανσης. Η δειγματοληψία αυτή πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές ημερομηνίες ανάλογα με τον **τρόπο** (ήλιος ή ξηραντήριο) και τον **χρόνο** που αποξηράνθηκε το προϊόν. Το δείγμα από τα Κτήματα Α, Γ και Δ αποξηράνθηκε στον ήλιο (Εικόνα Β.2.4) ενώ από το Κτήμα Β στο ιδιόκτητο ξηραντήριο του παραγωγού. Οι ημερομηνίες και λοιπά στοιχεία ως προς την ξήρανση αναφέρονται αναλυτικά στους Πίνακες Β1 έως Β4. Στο στάδιο αυτό, η δειγματοληψία για το Δείγμα Αγρού έγινε με βάση τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής, της 23^{ης} Φεβρουαρίου 2006, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα και σημάνθηκαν κατάλληλα. Στο Κτήμα Β το δείγμα ξήρανσης για ανάλυση συλλέχθηκε από το σύνολο του συγκομισμένου φιστικιού του παραγωγού λόγω του ότι δεν ήταν δυνατό να διαχωριστεί στο ξηραντήριο η ποσότητα συγκομιδής από τα 20 επιλεγμένα δένδρα του πειραματικού αγρού Β.

Για το 2^ο δείγμα συλλέχθηκαν 30 αποξηραμένοι καρποί για μελέτη της ύπαρξης μυκήτων τόσο στο κέλυφος όσο και στην ψίχα μετά την ξήρανση. Λεπτομέρειες των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από κάθε Κτήμα περιγράφονται στους Πίνακες Β1 έως Β4.

Εικόνα Β.2.4. Κτήμα Δ : Άπλωμα καρπού στον ήλιο για ξήρανση



Επέμβαση με NaCl (αλάτι)

Πριν από τη δειγματοληψία ξήρανσης και μετά την αποφλοιώση του φιστικιού (Εικόνα B.2.6), πραγματοποιήθηκε μία επέμβαση πειραματικά, με διάλυμα NaCl (άλατος) στα Κτήματα Α και Δ. Μετά την εισαγωγή του φιστικιού στον αποφλοιωτήρα και την αποφλοιώση και πριν απλωθεί στον ήλιο για ξήρανση, χωρίστηκε το συγκομισμένο προϊόν σε 3 μέρη. Το 1^ο απλώθηκε κανονικά στον ήλιο χωρίς καμμία επέμβαση (μάρτυρας – Επέμβαση Α). Το 2^ο εμβάπτιστηκε σε κορεσμένο διάλυμα μαγειρικού άλατος 25% για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση (Επέμβαση Β) (Εικόνα B.2.5). Το 3^ο εμβάπτιστηκε σε υπέρκορο διάλυμα μαγειρικού άλατος 35% για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση (Επέμβαση Γ). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ποσότητα άλατος που χρησιμοποιήθηκε στην Επέμβαση Β είναι ισοδύναμη με την ποσότητα που χρησιμοποιείται παραδοσιακά πριν το ψήσιμο του φιστικιού. Μετά την εφαρμογή του άλατος, η κάθε επέμβαση απλώθηκε χωριστά στον ήλιο και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε χωριστά για κάθε επέμβαση. Στοιχεία για τις επεμβάσεις και τις δειγματοληψίες για κάθε κτήμα αναφέρονται αναλυτικά στους Πίνακες Β1 και Β4.

Εικόνα B.2.5. Κτήμα Δ :Επέμβαση με αλάτι – Εμβάπτιση καρπών σε διάλυμα NaCl



5^η Δειγματοληψία – Αποθήκευση

Η 5^η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 45 ημέρες μετά τη δειγματοληψία ξήρανσης. Από το συγκομισμένο και αποξηραμένο προϊόν κάθε πειραματικού αγρού λήφθηκαν τα δύο είδη δειγμάτων μετά από 45 ημέρες αποθήκευσης στο συνήθη χώρο που αποθηκεύει ο κάθε παραγωγός το προϊόν του μέχρι την πώληση ή το ψήσιμο.

Από το Κτήμα Γ δεν λήφθηκε δείγμα διότι η ποσότητα που συγκομίστηκε ήταν πολύ μικρή λόγω έντονων προβλημάτων φυτοπροστασίας και μετά την ξήρανση λήφθηκαν μόνο 2 κιλά. Από τα υπόλοιπα Κτήματα λήφθηκε κανονικά το δείγμα της αποθήκευσης και ειδικότερα από το Κτήμα Δ λήφθηκαν 3 δείγματα (τα 2 από τις επεμβάσεις με το NaCl). Από το Κτήμα Α αυτό δεν κατέστη δυνατό λόγω του ότι το αποξηραμένο προϊόν κλάπηκε από τους χώρους του παραγωγού. Από αυτό που παρέμεινε λήφθηκε κανονικά δείγμα. Στο δείγμα αποθήκευσης από το Κτήμα Β είχε προηγηθεί χειροδιαλογή.

Στο στάδιο αυτό, για το δείγμα αγρού η δειγματοληψία έγινε με βάση τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής, της 23^{ης} Φεβρουαρίου 2006, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Για το δείγμα ταυτοποίησης συλλέχθηκαν 30 καρποί από κάθε Κτήμα και κάθε επέμβαση για μελέτη της ύπαρξης των μυκήτων του γένους *Aspergillus* σε αυτό το στάδιο. Λεπτομέρειες για τη συλλογή δειγμάτων περιγράφονται στους Πίνακες Β1 έως Β4.

Εικόνα Β.2.6. Κτήμα Β :Αποφλοιώση καρπών



Πίνακας Β1. ΚΤΗΜΑ Α : ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ – ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

| ΗΜΕΡ/ΝΙΑ | ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΛΛΕΡΓΕΙΑΣ* | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ | ΔΕΙΓΜΑ ΑΓΡΟΥ | ΔΕΙΓΜΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ |
|--|---|---|---|---|
| 31-7-08 Αγρός | BBCH:82 Το 20% των καρπών σε πλήρη ωρίμανση | Σημαντική προσβολή από ευρύτομο – σκώρο στα ακριανά δένδρα | 4,5 κιλά καταψύχθηκε αυθημερόν | (6-8-08) 10 υγιείς και 10 προσβεβλημένους σε 3 επαναλήψεις |
| 13-8-08 Αγρός | BBCH:87-88 Το 70%-80% των καρπών ώριμοι κάποιιοι και με σχίσσιμο της φλούδας | Ίδια κατάσταση – Δεν υπήρχε προσβολή από ψύλλα | - >> - | - >> - Υπήρχαν και καρποί με σχισμένη φλούδα |
| 20-8-08 Συγκομιδή | BBCH:89 Σχεδόν το σύνολο των καρπών ώριμοι κάποιιοι και με σχίσσιμο της φλούδας | Ίδια κατάσταση – Δεν υπήρχε προσβολή από ψύλλα | 3-4 κιλά - >> - | - >> - Υπήρχαν και καρποί με σχισμένη φλούδα |
| ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ - ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΤΑΠΟΙΗΣΗΣ | | | | |
| 20-8-08 - Αποφλοιώση - Εμβάπτιση σε αλάτι - Ξήρανση - Άπλωμα στον ήλιο | Συνολική ποσότητα: 90 κιλά περίπου 1) 50 κιλά χωρίς άλας μάρτυρας – Επέμβαση Α 2) 30 κιλά με 25% αλάτι (10 lt νερό + 2,5 kg αλάτι) Επέμβαση Β 3) 3) 10 κιλά επέμβαση με 35% αλάτι (10 lt νερό + 3,5 kg αλάτι) Επέμβαση Γ | | | |
| 1-9-2008 Ξήρανση | - ! Υπήρχε πρόβλημα κλοπής ! - Επαναληπτική επέμβαση με αλάτι - Δείγμα από το σύνολο του συγκομισμένου προϊόντος | Μεγάλοι καρποί, σχεδόν όλοι ανοιχτοί, καλά γεμισμένοι. Υπήρχαν σε μερικούς εσωτερικές κηλίδες στην ψίχα. | 3 κιλά Επέμβαση Α 3 κιλά Επέμβαση Β 3 κιλά Επέμβαση Γ | 30 καρποί από την κάθε επέμβαση |
| 16-10-2008 Αποθήκευση | ! Υπήρχε πρόβλημα κλοπής ! | | 3 κιλά από Επέμβαση Α | 30 καρποί από την κάθε επέμβαση |

* Η κλίμακα προσδιορισμού των σταδίων της καλλιέργειας παρατίθεται στο Παράρτημα 2

Πίνακας Β2. ΚΤΗΜΑ Β : ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ – ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

| ΗΜΕΡ/ΝΙΑ | ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΛΛΕΡΓΕΙΑΣ* | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ ²² | ΔΕΙΓΜΑ ΑΓΡΟΥ | ΔΕΙΓΜΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ |
|--|--|--|--|---|
| 31-7-08 Αγρός | BBCH: 77-79 Καρποί στο κανονικό μέγεθος και χρώμα αλλά ανώριμοι | Σημαντική προσβολή από ψύλλα στα ακριανά δένδρα και ευρύτομο | 4,5 κιλά καταψύχθηκε αυθημερόν | (6-8-08) 10 υγιείς και 10 προσβεβλημένους σε 3 επαναλήψεις |
| 13-8-08 Αγρός | BBCH:83 30% των καρπών σε πλήρη ωρίμανση | - >> - Αυξήθηκε η προσβολή με ψύλλα | - >> - | - >> - |
| 1-9-08 Συγκομιδή (φυλαγμένο το δείγμα η συγκομιδή έγινε 30/8) | BBCH:89 Σχεδόν το σύνολο των καρπών ώριμοι κάποιιοι και με σχίσσιμο της φλούδας | Υπήρχε ψύλλα αλλά με τον ψεκασμό είχε μειωθεί Θα μπορούσε να συγκομιστεί και 2 ^ο χέρι | - >> - | - >> - |
| ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ - ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΤΑΠΟΙΗΣΗΣ | | | | |
| 1-9-08 Ξήρανση | - Η ξήρανση έγινε στο ιδιόκτητο ξηραντήριο (63°C για 8,5 ώρες) - Πολύ καλά αποξηραμένοι καρποί | - Βρέθηκαν καρποί με προνύμφες σκώρου (όχι πολλοί) - Υπήρχαν και καρποί με εσωτερική κηλίδα στην ψίχα | 3-4 κιλά | 30 καρποί αποξηραμένοι 30 καρποί από τον «αφρό» - Εικόνα Β.2.7 |
| 16-10-08 Αποθήκευση | - Ιδιαίτερος εύγεστοι αλλά μικροί | - Πολύ καλή γενική εικόνα των καρπών | 1,5 κιλό (από το σύνολο του αγρού μετά από χειροδιαλογή) | 30 καρποί αποθηκευμένοι |

* Η κλίμακα προσδιορισμού των σταδίων της καλλιέργειας παρατίθεται στο Παράρτημα 2

Εικόνα Β.2.7. Κτήμα Β :Δειγματοληψία αποξηραμένου καρπού σε ξηραντήριο από τον «αφρό» της αποφλοίσωσης



Πίνακας Β3. ΚΤΗΜΑ Γ : ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ – ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

| ΗΜΕΡ/ΝΙΑ | ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΛΛΕΡΓΕΙΑΣ* | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ | ΔΕΙΓΜΑ ΑΓΡΟΥ | ΔΕΙΓΜΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ |
|--|---|--|---|--|
| 31-7-08 Αγρός | BBSH:82 20% των καρπών σε πλήρη ωρίμανση | Πολύ μεγάλο ποσοστό προσβεβλημένων καρπών από ευρύτομο και σκώρο | 3 κιλά καταψύχθηκε αυθημερόν | (6-8-08) 10 υγιείς και 10 προσβεβλημένους σε 3 επαναλήψεις |
| 13-8-08 Αγρός | BBSH: 87-88 70-80% καρπών και πλήρη ωρίμανση – σχισμένοι καρποί στη φλούδα | - >> - | - >> - | - >> - Υπήρχαν και καρποί με σχισίματα στη φλούδα |
| 21-8-08 Συγκομιδή - Αποφλοιώση | BBSH:89 Σχεδόν το σύνολο των καρπών ώριμοι κάποιοι και με σχίσσιμο της φλούδας | - >> - Υπήρχε έντονη προσβολή από ημίπτερα ²² | Δείγμα συγκομιδής δεν συλλέχθηκε λόγω του ότι ήταν πολύ κοντά στην προηγούμενη δειγματοληψία. | |
| ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ - ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΤΑΠΟΙΗΣΗΣ | | | | |
| 1-9-2008 Ξήρανση (στον ήλιο) Εικόνα 12 | - Υπήρχαν αρκετοί κλειστοί καρποί - Πολλοί καρποί είχαν εσωτερική κηλίδα - Πολλοί καρποί ήταν σκούροι | Πολύ μεγάλη απώλεια παραγωγής λόγω προσβολών | 2 κιλά (μόνο αυτό υπήρχε) | - 30 καρποί αποξηραμένοι λευκοί - 30 καρποί αποξηραμένοι σκούροι - 30 καρποί με εσωτερική κηλίδα |

! Δεν υπήρχε δείγμα αποθήκευσης λόγω πολύ μικρής απόδοσης του αγρού

* Η κλίμακα προσδιορισμού των σταδίων της καλλιέργειας παρατίθεται στο Παράρτημα 2

Εικόνα Β.2.8. Κτήμα Γ : Δείγμα ξήρανσης



Πίνακας Β4. ΚΤΗΜΑ Δ : ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ – ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

| ΗΜΕΡ/ΝΙΑ | ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΛΛΕΡΓΕΙΑΣ* | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ | ΔΕΙΓΜΑ ΑΓΡΟΥ | ΔΕΙΓΜΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ |
|--|---|--|--------------------------------|---|
| 31-7-08 Αγρός | B BCH:82 Το 20% των καρπών σε πλήρη ωριμανση | - Σημαντική προσβολή από ψύλλα στα ακριανά δένδρα - Προσβολή από σκώρο και ευρύτομο | 4,5 κιλά καταψύχθηκε αυθημερόν | (6-8-08) 10 υγιείς και 10 προσβεβλημένους σε 3 επαναλήψεις |
| 13-8-08 Αγρός | B BCH:87-88 Το 70-80% των καρπών σε πλήρη ωριμανση – καρποί με σχισμένη φλούδα | - >> - Σημαντική προσβολή από ημίπτερα | - >> - | - >> - Υπήρχαν και καρποί με σχισίματα στη φλούδα |
| 23-8-08 Συγκομιδή | B BCH:89 Σχεδόν το σύνολο των καρπών ώριμοι κάποιοι και με σχίσμο της φλούδας | - >> - Σημαντική προσβολή από ημίπτερα | 3 κιλά | 10 υγιείς και 10 προσβεβλημένους σε 3 επαναλήψεις |
| ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ - ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΤΑΠΟΙΗΣΗΣ | | | | |
| 23-8-08 - Αποφλοιώση - Εμβάπτιση σε αλάτι - Ξήρανση - Άπλωμα στον ήλιο | Συνολική ποσότητα: 90 κιλά περίπου 1) 50 κιλά χωρίς άλας μάρτυρας – Επέμβαση Α 2) 30 κιλά με 25% αλάτι (10 lt νερό + 2,5 kg αλάτι) Επέμβαση Β 3) 3) 10 κιλά επέμβαση με 35% αλάτι (10 lt νερό + 3,5 kg αλάτι) Επέμβαση Γ | | | |
| 1-9-08 Ξήρανση | -Γενικά σκούροι καρποί με αρκετούς μεταχρωματισμούς - Μικροί καρποί - Σχεδόν όλοι οι καρποί είχαν εσωτερική κηλίδα | -Κακή ποιότητα γευστικά | 3 κιλά από κάθε επέμβαση | 30 καρποί από κάθε επέμβαση |
| 16-10-08 Αποθήκευση | Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου | Έντονη προσβολή από προνύμφες εντόμων αποθήκης | 3 κιλά από κάθε περίπτωση | 30 καρποί από κάθε περίπτωση |

* Η κλίμακα προσδιορισμού των σταδίων της καλλιέργειας παρατίθεται στο Παράρτημα 2

B.3. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ – ΑΠΟΦΛΟΙΩΣΗ – ΞΗΡΑΝΣΗ – ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Η συγκομιδή χρονικά καθορίστηκε από τον παραγωγό του κάθε πειραματικού αγρού και τα 20 σημασμένα δένδρα συγκομίστηκαν ξεχωριστά. Η συγκομιδή έγινε με τον συνήθη τρόπο με ράβδισμα των κλάδων και συλλογή του καρπού σε απλωμένο πανί που είναι τοποθετημένο περιμετρικά του κορμού (Εικόνες B.2.2 και B.2.3).

Η αποφλοΐωση έγινε αμέσως μετά τη συγκομιδή σε αποφλοιωτήρες νερού (Εικόνα B.2.6) των παραγωγών. Οι αποφλοιωμένοι καρποί τοποθετήθηκαν σε σάκους για να οδηγηθούν στην αποξήρανση.

Την ίδια ημέρα οι καρποί από τους αγρούς Α, Γ και Δ απλώθηκαν στον ήλιο για ξήρανση σε ταράτσες αποθηκών ή ιδιόκτητων κτισμάτων. Μέρος των αποφλοιωμένων καρπών από τα κτήματα Α και Δ πριν το άπλωμα στον ήλιο δέχθηκαν την επέμβαση με NaCl και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον ήλιο (Εικόνα B.2.4.). Οι καρποί του κτήματος Β οδηγήθηκαν για μηχανική αποξήρανση την επόμενη ημέρα της αποφλοΐωσης σε ξηραντήριο στους 63°C για 8,5 ώρες.

Η αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύνηθες τρόπο αποθήκευσης του κάθε παραγωγού. Από το Κτήμα Γ δεν αποθηκεύθηκε καρπός διότι η ποσότητα συγκομιδής ήταν πολύ μικρή λόγω απώλειας από τις έντονες προσβολές από έντομα. Η αποθήκευση στα κτήματα Α και Δ έγινε σε ιδιόκτητους αποθηκευτικούς χώρους μη ελεγχόμενων συνθηκών, ενώ από το κτήμα Β οι καρποί μετά την ξήρανση οδηγήθηκαν στους αποθηκευτικούς χώρους – ψυγεία ελεγχόμενων συνθηκών του Αγροτικού Συνεταιρισμού. Από εκεί συλλέχθηκε και το τελευταίο δείγμα αποθήκευσης του κτήματος Β.

B.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ

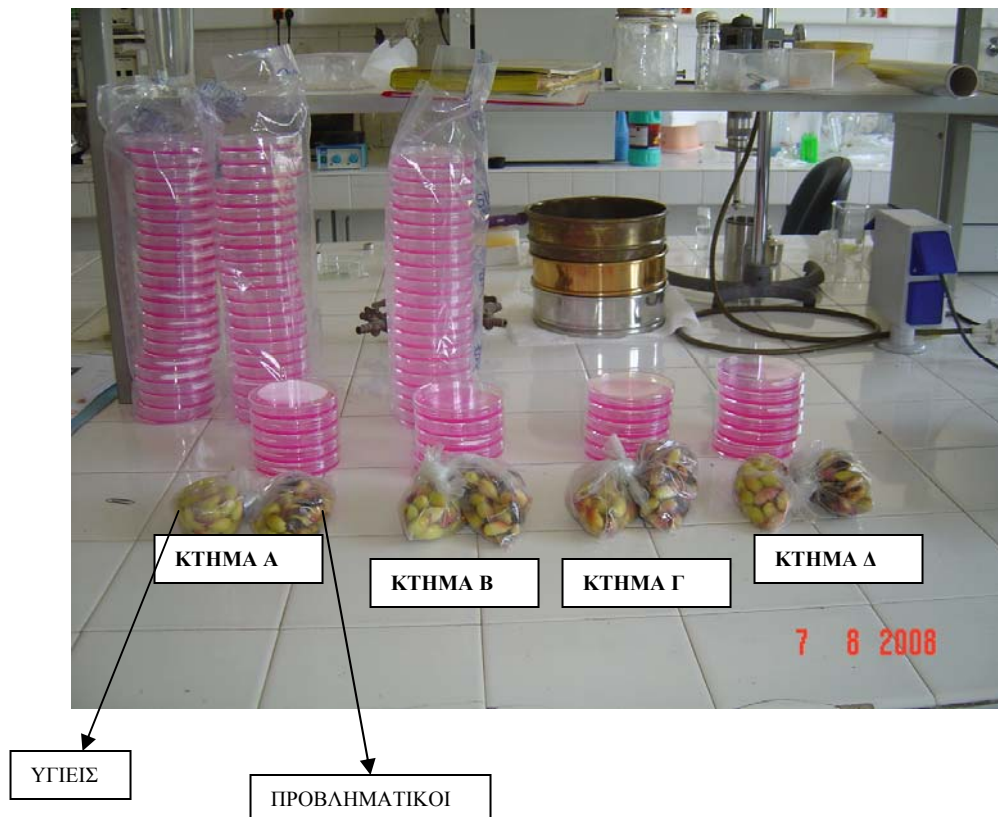
Το Δείγμα Ταυτοποίησης από κάθε δειγματοληψία αποθηκευόταν χωριστά σε ψύξη. Στη συνέχεια, ετοιμαζόταν το εκλεκτικό τεχνητό υποστρώματα DRBC²⁶ (Πίνακας B.5) για τους ασπέργιλλους και στη συνέχεια αποστειρώνόταν. Κατόπιν, το αποστειρωμένο εκλεκτικό υπόστρωμα απλωνόταν στα τριβλία Petri και στη συνέχεια τοποθετούνταν οι καρποί (Εικόνα B.4.1) μετά από κατάλληλο χειρισμό: εξωτερική απολύμανση⁴⁹ (Εικόνα B.4.2) σε διάλυμα 10% χλωρίνη, στέγνωμα, χωρισμός στη μέση⁴⁹, τοποθέτηση στο υπόστρωμα και επώαση σε κατάλληλο θάλαμο στους 25⁰C για 4 ημέρες ή περισσότερο

ανάλογα την ανάπτυξη των μυκήτων. Το υπόλοιπο μισό δείγμα κρατούνταν στην κατάψυξη για ανάλυση αφλατοξίνης.

Πίνακας Β.5. Συστατικά θρεπτικού υποστρώματος DRBC

| | |
|---|---------|
| Γλυκόζη | 10g |
| Πεπτόνη | 5g |
| K ₂ HPO ₄ | 1g |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0,5g |
| Άγαρ | 15g |
| Απεσταγμένο νερό | 1 litre |
| Rose Bengal | 25 mg |
| dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) | 2 mg |
| chloramphenicol | 100 mg |

Εικόνα Β.4.1. Δείγμα Ταυτοποίησης – Εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC



Εικόνα Β.4.2. Εξωτερική απολύμανση καρπών – Εμβάπτιση σε χλωρίνη



Οι καρποί του Δείγματος Ταυτοποίησης από την 1^η μέχρι και 3^η Δειγματοληψία (Δείγμα συγκομιδής) κόβονταν στη μέση⁴⁹ και τοποθετούνταν στο τριβλίο ολόκληροι (φλούδα – κέλυφος – ψίχα) – Εικόνα Β.4.3. Σε κάθε τριβλίο τοποθετούνταν 3-4 καρποί. Ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιούνταν σε plexi glass.

Εικόνα Β.4.3. Τοποθέτηση μισών καρπών στα τριβλία Petri για επώαση



Στην 4^η και 5^η δειγματοληψία, οι καρποί του Δείγματος Ταυτοποίησης ήταν αποφλοιωμένοι και αποξηραμένοι. Μετά την εξωτερική απολύμανση στο διάλυμα χλωρίνης και πριν την μόλυνση των τριβλίων διαχωρίζονταν το κέλυφος από την ψίχα. Σε κάθε τριβλίο τοποθετούνταν η μισή ψίχα και το μισό κέλυφος (Εικόνα Β.4.4) από κάθε καρπό ενώ οι υπόλοιποι μισοί καταψύχονταν για ανάλυση αφλατοξίνης.

Εικόνα Β.4.4. Τοποθέτηση μισών καρπών στα τριβλία Petri για επώαση από αποξηραμένους καρπούς – 4^η Δειγματοληψία



Β.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ

Μετά την επώαση στο θάλαμο γινόταν ταυτοποίηση μικροσκοπικά των ειδών των μυκήτων του γένους *Aspergillus* και μέτρηση σε ψίχα – κέλυφος – εξωκάρπιο. Η ταξινόμησή τους βασίστηκε στο μορφολογικό διαχωρισμό με μικροσκοπική παρατήρηση σύμφωνα με τους K.Raper και D.Fennell¹⁶. Η μέτρηση αφορούσε την εμφάνιση ή όχι των ειδών *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* και *Aspergillus carbonarius*.

B.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ

Το Δείγμα Αγρού από κάθε δειγματοληψία αποθηκευόταν στην κατάψυξη (-18 °C) αφού προηγουμένως μεταφερόταν σε πλαστικές σακούλες και σημαίνονταν κατάλληλα. Τα δείγματα παρέμεναν στην κατάψυξη μέχρι την προετοιμασία για ανάλυση αφλατοξινών.

6.1. Σχεδιασμός ανάλυσης

Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στις επίσημες μεθόδους του AOAC «AOAC Official Method 2005.08 Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter»¹⁰ και «AOAC Official Method 999.07, Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder»⁹ με ορισμένες τροποποιήσεις. Η καθαρισμός των δειγμάτων έγινε με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) και εν συνεχεία τα δείγματα μετρήθηκαν στην HPLC. Η ανάλυση στην HPLC πραγματοποιήθηκε με φθορισμομετρικό ανιχνευτή και η παραγοντοποίηση για τον διαχωρισμό των 4 ειδών αφλατοξίνης (B₁, B₂, G₁, G₂) με φωτοαντιδραστήρα UV στα 254nm.

Το πειραματικό μέρος της ανάλυσης χωρίστηκε σε τρεις φάσεις:

- α) κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης
- β) μέτρηση της συγκέντρωσης των αφλατοξινών σε δοκιμές ανάκτησης
- γ) μέτρηση της συγκέντρωσης των αφλατοξινών στα δείγματα αγρού και ταυτοποίησης

6.1.1. Υπολογισμοί

A) Υπολογισμός της σχετικής τυπικής απόκλισης

Η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας⁵ (Relative Standard Deviation, RSDr: όπου ο δείκτης r δηλώνει την επαναληψιμότητα, προερχόμενος από το αρχικό γράμμα της λέξης repeatability). Ο υπολογισμός της σχετικής τυπικής απόκλισης γίνεται με βάση τη σχέση: $(s_r/X) \times 100$, όπου s_r η τυπική απόκλιση που υπολογίζεται από τα ληφθέντα αποτελέσματα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και X ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των μετρήσεων.

B) Υπολογισμός του ποσοστού ανάκτησης (recovery)

Το ποσοστό ανάκτησης προσδιορίστηκε με χρήση πρότυπου μίγματος αφλατοξινών όπως αναλυτικότερα περιγράφεται στην παράγραφο 6.5.5. Το ποσοστό της ανάκτησης (recovery) υπολογίζεται από τη σχέση $(C_2/C_1) \times 100$, όπου C_1 η αρχική συγκέντρωση και C_2 η μετρούμενη συγκέντρωση του δείγματος σε αφλατοξίνες. Το κάθε αποτέλεσμα μέτρησης διορθώθηκε σύμφωνα με το ποσοστό ανάκτησης.

B.6.2. Υλικά

- Διηθητικό χαρτί Whatman GF/A
- Φίλτρα Whatman 110mm
- Φίλτρα GH Polypro 47mm 0.2μm, Hydrophilic Polypropylene Membrane Filters (Gelman Laboratory)
- Πιπέτες των 5-50 και 100-1000 μl με τα αντίστοιχα ρύγχι
- Πιπέτες γυάλινες των 10 και 20 ml
- Σύριγγες πλαστικές μιας χρήσεως των 60 ml
- Μικροσύριγγες των 250 μl και 500 μl
- Στήλες ανοσοσυγγένειας για αφλατοξίνες (AflaClean™ 3ml widebore, LC Tech)
- Βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός (ποτήρια ζέσεως των 50 ml, 100 και 200ml, κωνικές φιάλες των 100 ml, ογκομετρικές φιάλες των 50, 100, 200 και 250 ml, ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 50, 100 και 1000 ml, γυάλινα χωνιά, φιαλίδια με καπάκι των 4ml, κουτάλι, αλουμινόχαρτο, πλαστικά γάντια μιας χρήσης).

B.6.3. Αντιδραστήρια

- Νερό (HPLC grade, MERCK, 1.15333.2500, απιονισμένο, απεσταγμένο)
- Μεθανόλη (methanol, HPLC grade, MERCK, 1.06007.2500)
- Μεθανόλη (methanol, pro analysi)
- Ακετονιτρίλιο (acetonitril)
- n-Εξάνιο
- Χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, SIGMA, S9888)
- PBS ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 7.2

- 0.2gr KCl
 - 0.2gr KH₂PO₄
 - 1.16gr Na₂HPO₄ άνυδρο
 - 8gr NaCl
 - 1l νερό απεσταγμένο
- Πρότυπο αφλατοξινών μίγμα 0.5 μg/mL B₂ και G₂ 2 μg/mL B₁ και G₁ σε ακετονιτρίλιο, OEKANAL[®], analytical standard SIGMA-ALDRICH Art/Pr:34036, Batch:8205X

B.6.4. Συσκευές και όργανα

- Πλαστικό mixer
- Ζυγός με ακρίβεια 0,01 g
- Ultra Turex
- Μεταλλικά στατό
- Σύστημα αντλίας με κενό (τελευταία διήθηση)
- Solid Phase Extraction
- Θερμαινόμενη εστία
- Λουτρό υπερήχων (Ultrasonic Elmo S₃₀)
- Σύστημα εξάτμισης υγρού αζώτου
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Merck Hitachi Lachrom, αντλία L-7100, φθορισμομετρικός ανιχνευτής L-7485, ολοκληρωτής HP3394A στήλη....).
- UV - Post Column Derivatization (Φωτοχημικός Αντιδραστήρας UVETM, 254nm LC Tech)

B.6.5 Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε

6.5.1. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων μίγματος αφλατοξινών

Το αρχικό πρότυπο έχει συγκέντρωση 5000ppb συνολική αφλατοξίνη (2000ppb B₁, G₁ και 100ppb B₂, G₂). Από αυτό παρασκευάστηκε πρότυπο με συγκέντρωση 1000 ppb συνολική αφλατοξίνη (ή 400ppb B₁, G₁ και 100ppb B₂, G₂) σε τελικό όγκο 2.5 ml. Ο τελικός όγκος υπολογίστηκε ώστε να είναι αρκετός για την παρασκευή όλων των πρότυπων διαλυμάτων που θα χρειαζόνταν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Σύμφωνα με τον τύπο $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ έχουμε $V_2 = 2,5\text{ml}$ τελικό όγκο $C_1 = 5000\text{ppb}$, $C_2 = 1000\text{ppb}$ άρα $V_1 = 0.5\text{ml}$. Το εμπορικό πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης είναι σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, ενώ τα πρότυπα για την καμπύλη βαθμονόμησης πρέπει να είναι σε διαλύτη της κινητής φάσης της HPLC. Ο διαλύτης της κινητής φάσης ήταν μίγμα νερό-ακετονιτρίλιο-μεθανόλη σε αναλογία 6:2:2. Για τελικό όγκο 2,5ml απαιτείται αναλογικά 1.5ml νερό, 0.5ml μεθανόλη και 0.5 ακετονιτρίλιο. Οπότε το πρότυπο διάλυμα των 1000ppb παρασκευάζεται ως εξής: Σε φιαλίδιο των 4ml τοποθετείται μίγμα 1.5 ml νερού και 0.5ml μεθανόλης και αναδεύεται καλά. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια μικροσύριγγας μεταφέρονται 500μl (0.5ml) από το αρχικό εμπορικό πρότυπο αφλατοξίνης. Με βάση το πρότυπο των 1000ppb παρασκευάζονται οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται είτε με αραιώση σε τελικό όγκο 1ml ξεκινώντας από το πιο αραιό προς το πιο πυκνό διάλυμα είτε με έγχυση με την αντίστοιχη πιπέτα.

6.5.2. Καμπύλη βαθμονόμησης

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος από τις αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁ και G₂ σε συγκεντρώσεις όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας Β6) για τελικό όγκο 1ml. Τα πρότυπα προήλθαν από το πρότυπο των 1000ppb συνολική αφλατοξίνη, το οποίο περιείχε 100 ng/mL B₂ και G₂ και 400 ng/mL B₁ και G₁. Ο διαλύτης των πρότυπων διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν μίγμα νερού-μεθανόλης-ακετονιτρίλιου σε αναλογία 6:2:2, όμοιος με το διαλύτη της κινητής φάσης στην ανάλυση με HPLC. Για κάθε μία συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για

τον εντοπισμό της ανιχνευσιμότητας των αφλατοξινών σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ οι υπόλοιπες χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας Β6. Συγκεντρώσεις αφλατοξινών για κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης – Υπολογισμός

| A/A | Αρχικός όγκος V1(ml) | Αρχικός όγκος V1(μl) | C2 total (ppb) | B1 (ppb) | G1 (ppb) | B2 (ppb) | G2 (ppb) |
|-----|----------------------|----------------------|----------------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,004 | 4 | 4 | 1,6 | 1,6 | 0,4 | 0,4 |
| 3 | 0,005 | 5 | 5 | 2 | 2 | 0,5 | 0,5 |
| 4 | 0,006 | 6 | 6 | 2,4 | 2,4 | 0,6 | 0,6 |
| 5 | 0,008 | 8 | 8 | 3,2 | 3,2 | 0,8 | 0,8 |
| 6 | 0,01 | 10 | 10 | 4 | 4 | 1 | 1 |
| 7 | 0,02 | 20 | 20 | 8 | 8 | 2 | 2 |
| 8 | 0,04 | 40 | 40 | 16 | 16 | 4 | 4 |
| 9 | 0,05 | 50 | 50 | 20 | 20 | 5 | 5 |
| 10 | 0,1 | 100 | 100 | 40 | 40 | 10 | 10 |

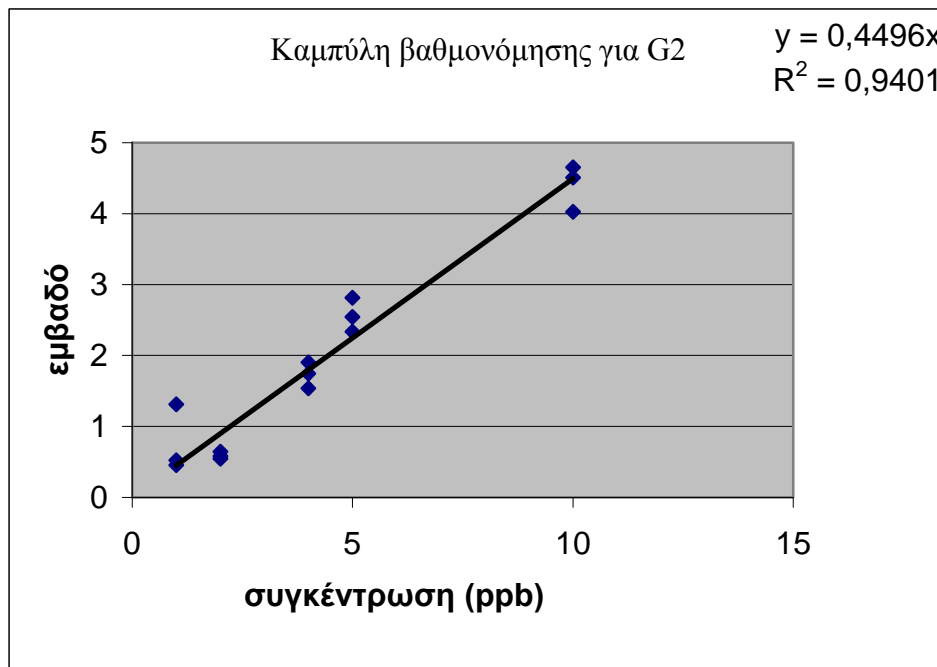
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας Β.6.1 έως και Β.6.4) για τις G₂, G₁, B₂ και B₁ ξεχωριστά. Στα αντίστοιχα διαγράμματα (Διάγραμμα Β.6.1. έως και Β.6.4) φαίνονται οι καμπύλες βαθμονόμησης.

Στο Παράρτημα 3 επισυνάπτονται όλα τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων που περιγράφονται στους πίνακες και αφορούν την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας Β.6.1. G₂ - Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης

| | Συγκέντρωση (ppb) | Area (mV.s) | Area % | M.O | Sr | RSDr |
|-------------|-------------------|-------------|--------|------|------|----------|
| ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | 10 | 4,509 | 10,2 | 9,28 | 0,06 | 0,636848 |
| | 10 | 4,654 | 9,7 | | | |
| | 10 | 4,026 | 11,9 | | | |
| | 5 | 2,544 | 11,6 | 9,17 | 0,05 | 0,545643 |
| | 5 | 2,813 | 11,7 | | | |
| | 5 | 2,334 | 11,1 | | | |
| | 4 | 1,744 | 11,2 | 9,36 | 0,04 | 0,419882 |
| | 4 | 1,537 | 10,4 | | | |
| | 4 | 1,903 | 12,6 | | | |
| | 2 | 0,644 | 8 | 9,44 | 0,07 | 0,72182 |
| | 2 | 0,58 | 6,5 | | | |
| | 2 | 0,544 | 6,1 | | | |
| | 1 | 0,522 | 13,4 | 9,73 | 0,23 | 2,365967 |
| | 1 | 1,313 | 25,1 | | | |
| | 1 | 0,456 | 10,1 | | | |

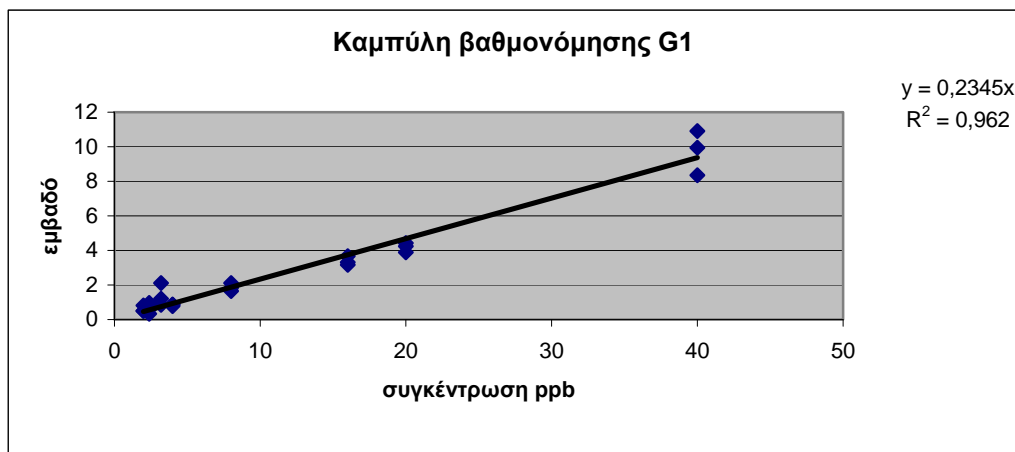
Διάγραμμα Β.6.1. Συσχετισμός μεταξύ επιφανειών και συγκέντρωσης της AFG₂ σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 1 - 10 ppb.



Πίνακας Β.6.2. G₁ - Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης

| | Amount (ppb) | Area (mV.s) | Area % | M.O | Sr | RSDr |
|-------------|--------------|-------------|--------|------|------|----------|
| ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | 40 | 9,95 | 22,5 | 9,73 | 1,29 | 13,27687 |
| | 40 | 10,903 | 22,8 | | | |
| | 40 | 8,346 | 22,8 | | | |
| | 20 | 4,232 | 19,3 | 4,18 | 0,28 | 6,596169 |
| | 20 | 3,885 | 16,2 | | | |
| | 20 | 4,43 | 21 | | | |
| | 16 | 3,667 | 23,5 | 3,38 | 0,26 | 7,698546 |
| | 16 | 3,16 | 21,4 | | | |
| | 16 | 3,312 | 21,9 | | | |
| | 8 | 1,829 | 22,6 | 1,86 | 0,23 | 12,50341 |
| | 8 | 2,106 | 23,7 | | | |
| | 8 | 1,644 | 18,4 | | | |
| | 4 | 0,772 | 19,8 | 0,83 | 0,05 | 6,509146 |
| | 4 | 0,857 | 16,4 | | | |
| | 4 | 0,873 | 19,3 | | | |
| | 3,2 | 1,197 | 35,6 | 1,39 | 0,65 | 46,95533 |
| | 3,2 | 2,118 | 52,2 | | | |
| | 3,2 | 0,856 | 30,3 | | | |
| | 2,4 | 0,972 | 40 | 0,63 | 0,32 | 51,35374 |
| | 2,4 | 0,33 | 16,9 | | | |
| | 2,4 | 0,586 | 26 | | | |
| | 2 | 0,823 | 22,9 | 0,61 | 0,18 | 30,17609 |
| | 2 | 0,504 | 23,8 | | | |
| | 2 | 0,504 | 22,7 | | | |

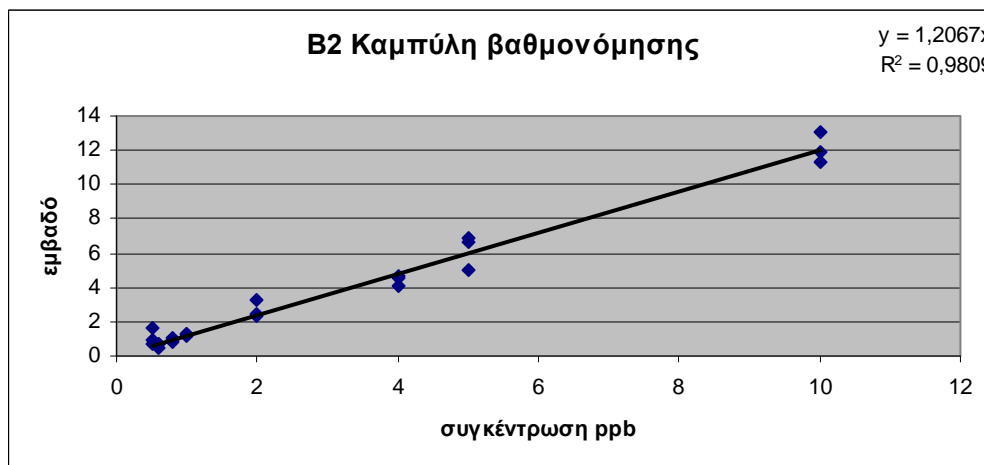
Διάγραμμα Β.6.2. Συσχετισμός μεταξύ επιφανειών και συγκέντρωσης της G₁ σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 2 - 40 ppb.



Πίνακας Β.6.3. B₂ - Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης

| ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | Amount (ppb) | Area (mV.s) | Area % | M.O | Sr | RSDr |
|-------------|--------------|-------------|--------|------|-------|----------|
| | 10 | 10 | 11,92 | 27 | 12,08 | 0,88 |
| 10 | | 13,035 | 27,2 | | | |
| 10 | | 11,29 | 27,1 | | | |
| 5 | 5 | 6,627 | 30,2 | 6,18 | 1,05 | 16,96234 |
| | 5 | 6,93 | 28,8 | | | |
| | 5 | 4,982 | 23,6 | | | |
| 4 | 4 | 4,666 | 29,9 | 4,44 | 0,28 | 6,34392 |
| | 4 | 4,126 | 27,9 | | | |
| | 4 | 4,536 | 30 | | | |
| 2 | 2 | 2,461 | 30,5 | 2,68 | 0,47 | 17,59629 |
| | 2 | 2,351 | 26,4 | | | |
| | 2 | 3,216 | 36,1 | | | |
| 1 | 1 | 1,233 | 31,6 | 1,22 | 0,06 | 5,275048 |
| | 1 | 1,148 | 22 | | | |
| | 1 | 1,274 | 28,2 | | | |
| 0,8 | 0,8 | 1,059 | 31,5 | 0,90 | 0,15 | 16,09715 |
| | 0,8 | 0,771 | 19 | | | |
| | 0,8 | 0,88 | 31,2 | | | |
| 0,6 | 0,6 | 0,435 | 17,9 | 0,61 | 0,16 | 25,34288 |
| | 0,6 | 0,717 | 36,8 | | | |
| | 0,6 | 0,69 | 30,6 | | | |
| 0,5 | 0,5 | 1,597 | 44,4 | 1,08 | 0,45 | 42,02694 |
| | 0,5 | 0,896 | 42,4 | | | |
| | 0,5 | 0,747 | 33,7 | | | |

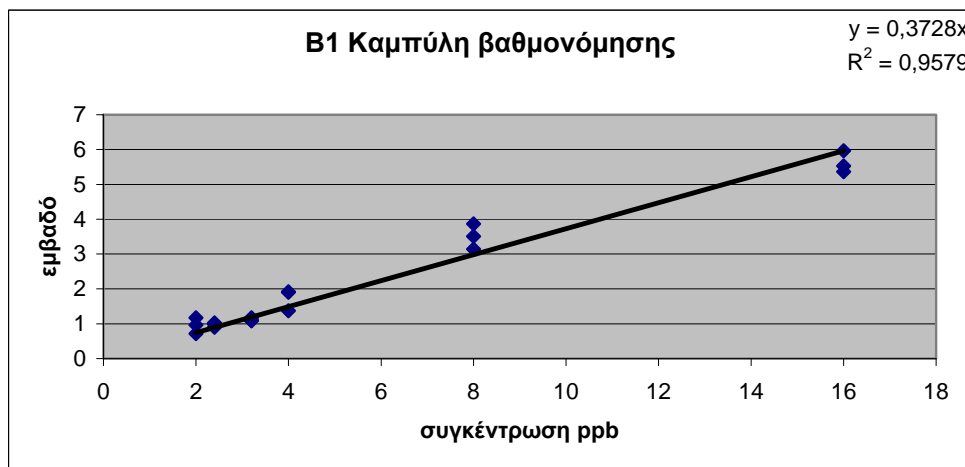
Διάγραμμα Β.6.3. Συσχετισμός μεταξύ επιφανειών και συγκέντρωσης της B₂ σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 2 - 40 ppb.



Πίνακας Β.6.4. Β₁ - Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης

| ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | Amount (ppb) | Area (mV.s) | Area % | Height % | M.O | Sr | RSDr |
|-------------|--------------|-------------|--------|----------|-------|----------|----------|
| | 40 | 17,759 | 40,20 | 36,20 | 17,69 | 1,61 | 9,095924 |
| | 40 | 19,264 | 40,30 | 36,90 | | | |
| | 40 | 16,048 | 38,20 | 35,90 | | | |
| | 20 | 8,522 | 38,9 | 34,8 | 9,42 | 0,94 | 10,00179 |
| | 20 | 10,401 | 43,3 | 37 | | | |
| | 20 | 9,338 | 44,3 | 36,8 | | | |
| | 16 | 5,527 | 35,4 | 33,9 | 5,62 | 0,31 | 5,547306 |
| | 16 | 5,969 | 40,4 | 36,1 | | | |
| | 16 | 5,367 | 35,5 | 33,7 | | | |
| 8 | 3,142 | 38,9 | 35,5 | 3,51 | 0,36 | 10,32328 | |
| 8 | 3,866 | 43,4 | 39,9 | | | | |
| 8 | 3,513 | 39,4 | 36,5 | | | | |
| 4 | 1,377 | 35,3 | 33,4 | 1,73 | 0,31 | 17,7776 | |
| 4 | 1,908 | 36,5 | 32,5 | | | | |
| 4 | 1,913 | 42,4 | 38,4 | | | | |
| 3,2 | 1,102 | 32,8 | 37,2 | 1,12 | 0,05 | 4,188755 | |
| 3,2 | 1,172 | 28,9 | 32,6 | | | | |
| 3,2 | 1,083 | 38,4 | 38,4 | | | | |
| 2,4 | 1,024 | 42,1 | 42,1 | 0,97 | 0,06 | 6,269936 | |
| 2,4 | 0,904 | 46,3 | 41,5 | | | | |
| 2,4 | 0,981 | 43,5 | 39,2 | | | | |
| 2 | 1,173 | 32,6 | 32,4 | 0,95 | 0,23 | 24,17624 | |
| 2 | 0,714 | 33,8 | 33,9 | | | | |
| 2 | 0,965 | 43,5 | 40,3 | | | | |

Διάγραμμα Β.6.4. Συσχετισμός μεταξύ επιφανειών και συγκέντρωσης της Β₁ σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 2 - 40 ppb.



Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα B.6.1, B.6.2., B.6.3 και B.6.4 το τετράγωνο του συντελεστή συσχετισμού (R^2) πλησιάζει τη μονάδα, το οποίο δείχνει ότι υπάρχει καλός συσχετισμός μεταξύ των εμβαδών των κορυφών και της περιεκτικότητας των προτύπων διαλυμάτων.

Γενικά οι μετρήσεις παρουσιάζουν αρκετά καλή επαναληψιμότητα. Ειδικότερα για τη G_2 η σχετική τυπική απόκλιση (RSD_r) έχει πολύ μικρές τιμές σε εύρος από 1-10ppb. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις 0.5, 0.6 και 0.8 η τιμή RSD_r φαίνεται να είναι υψηλή, με αποτέλεσμα η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων σε συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες από 1 ppb να είναι μειωμένη. Για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις από 2 έως 40 ppb φαίνεται ότι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις παρουσιάζουν χαμηλές τιμές και εκτός εξαιρέσεων υπάρχει καλή επαναληψιμότητα.

B.6.5.3. Ανάλυση δειγμάτων αγρού για αφλατοξίνες

B.6.5.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων

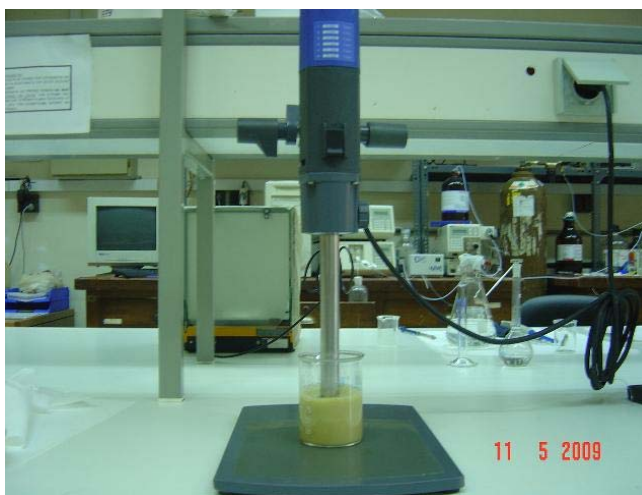
Η προετοιμασία των δειγμάτων αποσκοπούσε στον διαχωρισμό του σπέρματος (ψίχα), στο οποίο τελικά έγινε έλεγχος για την ύπαρξη αφλατοξίνης. Στα δείγματα κελυφωτών φιστικιών από την 1^η (αρχή ωρίμανσης) έως και την 3^η δειγματοληψία (συγκομιδή) διαχωρίστηκε το εξωκάρπιο (φλούδα), το ξυλώδες ενδοσπέρμιο (κέλυφος) και το σπέρμα (ψίχα). Επίσης, από το συνολικό δείγμα διαχωρίστηκαν οι άσπερμοι και οι κλειστοί καρποί. Μετά το διαχωρισμό η ψίχα κρατήθηκε για τις περαιτέρω διεργασίες ενώ τα υπόλοιπα μέρη του καρπού καταψύχθηκαν αφού ζυγίστηκαν και σημάνθηκαν κατάλληλα.

Αντίστοιχα, στα δείγματα μετά τη συγκομιδή (ξήρανση – αποθήκευση) διαχωρίστηκε το σπέρμα από το κέλυφος, καθώς και οι κλειστοί και άσπερμοι καρποί. Η ίδια προετοιμασία γινόταν και πριν την ανάλυση των δειγμάτων ταυτοποίησης. Το βάρος των Δειγμάτων Αγρού και Ταυτοποίησης (ασπεργύλων) για όλα τα μέρη του καρπού παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας B7 και Πίνακας B8).

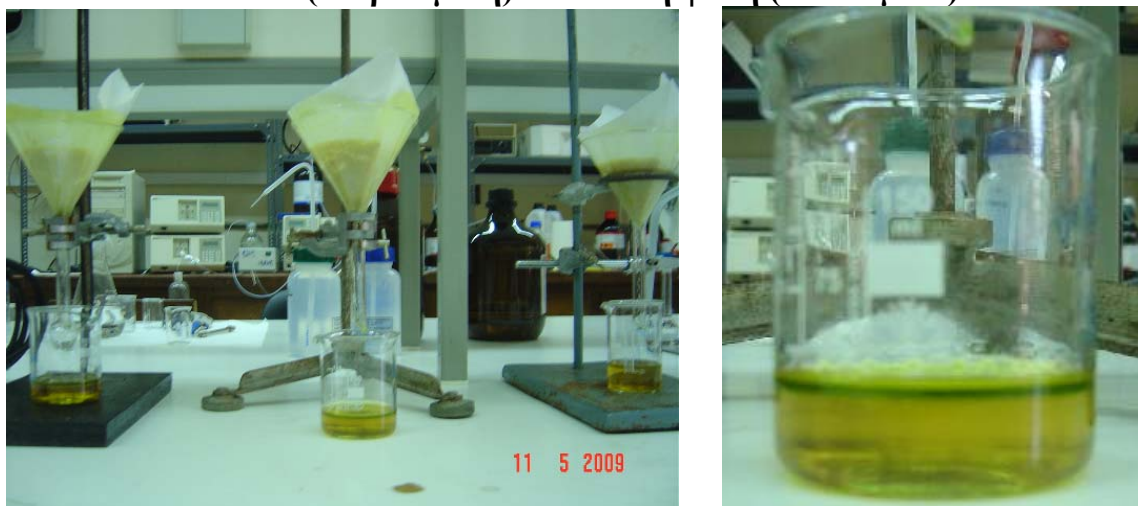
B.6.5.3.2. Άλεση-Εκχύλιση

Η διαδικασία της ανάλυσης των δειγμάτων για αφλατοξίνη ξεκινούσε με άλεση του συνολικού δείγματος του σπέρματος σε λεπτά σωματίδια σε πλαστικό μίξερ και επιμελή ανάμειξη ώστε να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση, σύμφωνα και με το Παράρτημα ΙΙ του Καν. ΕΚ αριθ. 401/2006 της Επιτροπής «*Κριτήρια για την προετοιμασία του δείγματος και για τις μεθόδους ανάλυσης που εφαρμόζονται κατά τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα*»⁵. Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζονταν 20 g της αλεσμένης ψίχας, τα οποία μεταφέρονταν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια, προσθέτονταν 2g NaCl, 100 ml διάλυμα εκχύλισης CH₃OH-H₂O σε αναλογία 8/2 v/v και 50ml n-εξανίου. Το δείγμα αλέθονταν για τουλάχιστο 5 λεπτά σε υψηλή ταχύτητα στο Ultra Turex (Εικόνα Β.6.1). Ολοκληρώνοντας την άλεση, το δείγμα αφήνονταν να ηρεμήσει και έπειτα περνούσε από φίλτρο Whatman GF/A και συλλεγόταν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως (Εικόνα Β.6.2α). Στο τέλος της διήθησης το διήθημα διαχωρίζονταν σε δύο φάσεις, με τη φάση του λαδιού να υπέρκειται (Εικόνα Β.6.2β).

Εικόνα Β.6.1. Άλεση του δείγματος σε υψηλή ταχύτητα σε Ultra Turex



Εικόνα Β.6.2. (α) Διήθηση του αλεσμένου δείγματος και συλλογή του εκχυλίσματος. (β) Διαχωρισμός του εκχυλίσματος σε δύο φάσεις: φάση λαδιού (υπερκείμενη) - υδατική φάση (υποκείμενη)



(α)

(β)

B.6.5.3.3. Καθαρισμός δειγμάτων με χρήση στηλών IAC.

Πριν από τον καθαρισμό των δειγμάτων με στήλες IAC ακολουθούνταν μια προκαταρκτική διαδικασία: Με πιπέτα των 20 ml μεταφέρονταν 14 ml από το υποκείμενο (υδατική φάση) του διηθήματος σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100ml, στον οποίο προστίθονταν PBS buffer (pH: 7.2) μέχρι συνολικού τελικού όγκου 100ml. Στη συνέχεια, το μίγμα διήθημα-PBS αναδεύονταν ελαφρά περνούσε από φίλτρο Whatmann 110mm (Εικόνα Β.6.3).

Εικόνα Β.6.3. Φιλτράρισμα του μίγματος με PBS σε Whatman 100mm.



Το μίγμα συλλεγόταν σε άλλο ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια περνούσε από δεύτερο φίλτρο 0.2μm με τη βοήθεια αντλίας ώστε να αφαιρεθεί η επιπλέον τυρβότητα και να είναι διαυγές. Κατόπιν, το δείγμα περνούσε άμεσα από τις στήλες IAC.

Ο καθαρισμός με τις στήλες ανοσοσυγγένειας περιγράφεται παρακάτω:

- Στη συσκευή Solid Phase Extraction προσαρμόζεται η στήλη IAC (Εικόνα Β.6.4). Κάτω από τη στήλη υπάρχει πλαστικό δοχείο κατάλληλο για τη συλλογή των υγρών που θα προκύψουν από τα ξεπλύματα. Ανοίγοντας τη στρόφιγγα, απομακρύνουμε λίγο από το υγρό πλήρωσης της στήλης.
- Στο ανώτερο τμήμα της στήλης προσαρμόζεται πλαστική σύριγγα των 60 ml μιας χρήσης.
- Προσθέτουμε στη σύριγγα 50ml από το φιλτραρισμένο διαυγές διήθημα. Ανοίγοντας τη στρόφιγγα κάτω από τη στήλη IAC το διήθημα περνά μέσα από τη στήλη και ρυθμίζουμε τη ροή. Η ροή πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην ξεπερνά τα 2ml/min.

Εικόνα Β.6.4. Καθαρισμός με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC).



- Μόλις περάσουν και τα 50ml από τη στήλη ξεπλένουμε τη στήλη IAC περνώντας 10ml απεσταγμένο νερό από τη σύριγγα. Στο τέλος πρέπει να περάσει αέρας για 5-10sec και να απομακρυνθεί τελείως και τα υπολείμματα νερού.
- Στη συνέχεια, με πιπέτα του 1 ml τοποθετούμε εντός της στήλης 1 ml CH₃OH HPLC και αφήνουμε για 5min ώστε να δράσει επάνω στο τζελ.
- Η μεθανόλη συλλέγεται σταγόνα-σταγόνα σε φιαλίδιο των 4ml.
- Η έκλουση γίνεται 2-3 φορές με 1ml μεθανόλη τη φορά. Θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την έκλουση με μεθανόλη, ώστε η ροή να είναι σταγόνα-σταγόνα.
- Μόλις περάσει η μεθανόλη αφήνεται να περάσει αέρας από τη στήλη ώστε να συλλεχθούν προσεχτικά όλα τα υπολείμματα μεθανόλης στο φιαλίδιο.

Στη συνέχεια, τα φιαλίδια οδηγούνται για εξάτμιση με υγρό άζωτο μέχρι αποξήρανσης. Κατόπιν, αποθηκεύονται στο ψυγείο αφού τυλίγονταν με αλουμινόχαρτο. Τις περισσότερες περιπτώσεις συνεχιζόταν ο ποσοτικός προσδιορισμός στην HPLC, οπότε με πιπέτα του 1ml γινόταν επαναδιάλυση με 0.5ml διαλύτη της κινητής φάσης της HPLC (νερό-μεθανόλη-ακετονιτρίλιο 6:2:2). Διαφορετικά, όταν ξεκινούσε η προετοιμασία για μέτρηση στην HPLC, τα αποθηκευμένα δείγματα έβγαιναν από το ψυγείο και γινόταν τότε η επαναδιάλυση. Η αποθήκευση δεν διαρκούσε πάνω από 4 ημέρες. Ολοκληρώνοντας την προετοιμασία του δείγματος επιτυγχανόταν συμπύκνωση κατά 2,8 φορές. Για κάθε δείγμα ανάλυσης πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις.

Πίνακας Β7. Βάρος Δειγμάτων Αγρού

| Α/ Α | ΔΕΙ ΓΜ/ ΨΙΑ | ΚΤΗΜΑ | ΗΜ/ ΝΙΑ (2008) | ΒΑΡΟΣ (γρ) | | | | | | | | | | ΣΥ- ΝΟ ΛΟ |
|---------|-------------------|------------------|----------------------|------------|------|-------------|------|----------------|------|----------|------|----------|------|-----------------|
| | | | | κέλυφος | | ψίχα | | έξω- κάρπιο | | άσπερμοι | | κλειστοί | | |
| | | | | | % | | % | | % | | % | | % | |
| 1 | Αρχή ωρίμανση | A | 31-7 | 320 | 5.6 | 400 | 7.0 | 2230 | 39.1 | 300 | 5.3 | 2450 | 43.0 | 5700 |
| 2 | | B | | 58 | 1.2 | 70 | 1.4 | 1860 | 38.0 | 108 | 2.2 | 2804 | 57.2 | 4900 |
| 3 | | Γ | | 150 | 5.5 | 193 | 7.1 | 883 | 32.5 | 577 | 21.3 | 911 | 33.6 | 2714 |
| 4 | | Δ | | 434 | 7.6 | 531 | 9.3 | 2270 | 39.6 | 272 | 4.7 | 2220 | 38.8 | 5727 |
| 5 | Ωρίμανση | A | 13-8 | 870 | 18.5 | 1082 | 23.0 | 1890 | 40.1 | 304 | 6.5 | 565 | 12.0 | 4713 |
| 6 | | B | | 373 | 6.4 | 463 | 8.0 | 2350 | 40.5 | 70 | 1.2 | 2550 | 43.9 | 5806 |
| 7 | | Γ | | 350 | 9.7 | 416 | 11.5 | 1248 | 34.5 | 598 | 16.5 | 1003 | 27.7 | 3615 |
| 8 | | Δ | | 1187 | 21.2 | 1490 | 26.6 | 2350 | 42.0 | 110 | 2.0 | 461 | 8.2 | 5598 |
| 9 | Συγκο μιδή | A | 20-8 | 934 | 21.0 | 1145 | 25.8 | 1500 | 33.8 | 590 | 13.3 | 274 | 6.2 | 4443 |
| 10 | | B | 30-8 | 188 | 7.1 | 217 | 8.2 | 828 | 31.1 | 340 | 12.8 | 1086 | 40.8 | 2659 |
| 11 | | Δ | 23-8 | 647 | 20.0 | 740 | 22.9 | 1100 | 34.1 | 348 | 10.8 | 395 | 12.2 | 3230 |
| 12 | Ξήρανση | A | 1-9 | 1390 | 43.0 | 1570 | 42.7 | | | | | 200 | 6.3 | 3160 |
| 13 | | A (25% αλάτι) | | 811 | 44.5 | 870 | 47.8 | | | | | 140 | 7.7 | 1821 |
| 14 | | A (35% αλάτι) | | 755 | 45.3 | 840 | 50.4 | | | | | 71 | 4.3 | 1666 |
| 15 | | B | | 770 | 29.5 | 830 | 31.8 | | | | | 1010 | 38.7 | 2610 |
| 16 | | Γ | | 870 | 39.0 | 920 | 41.3 | | | | | 440 | 19.7 | 2230 |
| 17 | | Δ | | 1152 | 42.4 | 1224 | 45.0 | | | | | 342 | 12.6 | 2718 |
| 18 | | Δ (25% αλάτι) | | 980 | 43.2 | 999 | 44.0 | | | | | 290 | 12.8 | 2269 |
| 19 | | Δ (35% αλάτι) | | 780 | 43.6 | 810 | 45.3 | | | | | 200 | 11.2 | 1790 |
| 20 | Αποθήκη | A | 16-10 | 1300 | 44.4 | 1440 | 49.1 | | | | | 190 | 6.5 | 2930 |
| 21 | | B | | 890 | 29.1 | 930 | 30.4 | | | | | 1240 | 40.5 | 3060 |
| 22 | | Δ | | 1165 | 40.0 | 1300 | 44.7 | | | | | 445 | 15.3 | 2910 |
| 23 | | Δ (25% αλάτι) | | 1250 | 43.7 | 1285 | 44.9 | | | | | 327 | 11.4 | 2862 |
| 24 | | Δ (35% αλάτι) | | 1300 | 44.7 | 1280 | 44.0 | | | | | 330 | 11.3 | 2910 |

Χρησιμοποιώντας τις στήλες IAC για τον καθαρισμό τα δείγματα συμπυκνώνονται 2,8 φορές. Εάν δηλαδή C_1 είναι η πραγματική συγκέντρωση ενός δείγματος σε αφλατοξίνη και C_2 η μετρούμενη συγκέντρωση τότε $C_1 = C_2/2,8$. Η μικρότερη ποσότητα προτύπου αφλατοξίνης που ανιχνεύτηκε από την HPLC με καλή επαναληψιμότητα είναι 0,5 ppb όπως φαίνεται και στις δοκιμές ανάκτησης. Στην περίπτωση που για ένα δείγμα

φιστικιών, το οποίο έχει υποστεί καθαρισμό με τη χρήση στηλών ανοσοσυγγένειας μετρηθεί από την HPLC συγκέντρωση αφλατοξίνης 0,5 ppb, τότε η πραγματική του συγκέντρωση είναι $0,5 / 2,8 = 0,18$ ppb. Η τιμή των 0,18 ppb αντιπροσωπεύει το όριο ανίχνευσης του οργάνου, που προσδιορίστηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος και για τη συγκεκριμένη μελέτη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η νομοθεσία θέτει ως μέγιστο επιτρεπόμενο όριο αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια την τιμή 2 ppb για την AFB₁ και 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών αποδεικνύεται πως η ανίχνευση των συγκεκριμένων μυκοτοξινών με αυτή τη μέθοδο είναι αρκετά αξιόπιστη.

Συνοπτικά, τα βήματα της γενικής μεθοδολογίας προετοιμασίας – καθαρισμού των Δειγμάτων Αγρού είναι:

Γενική Μέθοδος

| | | |
|--|----------------------------|--------|
| Μάζα δείγματος: | 20 gr | |
| Προσθήκη NaCl: | 2 gr | |
| Διαλύτης εκχύλισης (μεθανόλη/νερό 80:20) : | | 100ml |
| n-Εξάνιο : | 50ml | |
| Όγκος εκχυλίσματος: | | 14 ml |
| Αραίωση (PBS): | | 100 ml |
| Όγκος που περνά από IAC: | | 50 ml |
| Επαναδιάλυση στην κινητή φάση: | | 0,5 ml |
| Συμπύκνωση: | 2,8 | |
| Υπολογισμός συμπύκνωσης: | (20/100 x 14/100 x 50/0,5) | |

B.6.5.4. Ανάλυση δειγμάτων ταυτοποίησης για αφλατοξίνη

Η παραπάνω μέθοδος προετοιμασίας-εκχύλισης εφαρμόστηκε μόνο στα Δείγματα Αγρού (Πίνακας Β7). Όπως προαναφέρθηκε, τα Δείγματα Ταυτοποίησης (συλλογή 30 τυχαίων καρπών) για τον προσδιορισμό των ασπεργίλλων αναλύθηκαν επίσης στην HPLC για μέτρηση αφλατοξίνης. Σε αυτή την περίπτωση, το δείγμα που αναλύθηκε ήταν οι υπόλοιποι μισοί καρποί που απόμειναν από το plating. Επομένως, το κάθε Δείγμα Ταυτοποίησης είχε διαφορετικό βάρος και λόγω του μικρού αριθμού καρπών ήταν πολύ μικρότερο από τα 20gr που χρησιμοποιούνταν στα Δείγματα Αγρού. Για τους παραπάνω λόγους και δεδομένου ότι ήταν επιθυμητό να διατηρηθεί μία συμπύκνωση κατά περίπου

2 φορές όπως στα Δείγματα Αγρού η μέθοδος προετοιμασίας – εκχύλισης τροποποιήθηκε κατάλληλα.

Ακολουθήθηκαν δύο μεθοδολογίες τροποποίησης ανάλογα εάν το δείγμα ήταν >5gr (Μέθοδος 1) ή <5gr (Μέθοδος 2). Και στις δύο περιπτώσεις, η τροποποίηση αφορούσε τη μάζα NaCl και τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης (μεθανόλη-νερό, n-εξάνιο). Οι υπόλοιπες αραιώσεις ή συμπυκνώσεις ήταν ακριβώς οι ίδιες:

| | Μέθοδος 1 | Μέθοδος 2 |
|--|----------------------|----------------------|
| Μάζα δείγματος: | >5gr | <5gr |
| Προσθήκη NaCl: | 1gr | 0,5gr |
| Διαλύτης εκχύλισης (μεθανόλη/νερό 80:20) : | 50ml | 25ml |
| n-Εξάνιο : | 25ml | 10ml |
| Όγκος εκχυλίσματος: | 14 ml | 14 ml |
| Αραίωση (PBS): | 100 ml | 100 ml |
| Όγκος που περνά από IAC: | 50 ml | 50 ml |
| Επαναδιάλυση στην κινητή φάση: | 0,5 ml | 0,5 ml |
| Συμπύκνωση: | m x 0,28 | m x 0,56 |
| Υπολογισμός συμπύκνωσης: | (m/50x14/100x50/0,5) | (m/25x14/100x50/0,5) |

Πίνακας Β8. Περιγραφή Δειγμάτων Ταυτοποίησης για ανάλυση αφλατοξίνης – Βάρος, Μέθοδος επεξεργασίας του δείγματος και Συμπύκνωση

| A/A | ΚΤΗΜΑ | ΣΤΑΔΙΟ | ΕΙΔΟΣ | ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ΓΡ) | ΜΕΘΟΔΟΣ | ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ |
|-----|--------------|----------------|---------------|----------------------|---------|------------|
| 1 | Α | ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | ΥΓΙΕΙΣ | 7,7 | 1 | 2,156 |
| 2 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 3,5 | 2 | 1,96 |
| 3 | | ΩΡΙΜΑΝΣΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 10,3 | 1 | 2,884 |
| 4 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 7,8 | 1 | 2,184 |
| 5 | | ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 11,0 | 1 | 3,08 |
| 6 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 8,77 | 1 | 2,4556 |
| 7 | | | - | 8,4 | 1 | 2,352 |
| 8 | | ΕΗΡΑΝΣΗ | 25% ΑΛΑΤΙ | 7,7 | 1 | 2,156 |
| 9 | | | 35% ΑΛΑΤΙ | 9,98 | 1 | 2,7944 |
| 10 | | ΑΠΟΘΗΚΗ | - | 7,8 | 1 | 2,184 |
| 11 | Β | ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | ΥΓΙΕΙΣ | 9,5 | 1 | 2,66 |
| 12 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 3,7 | 2 | 2,072 |
| 13 | | ΩΡΙΜΑΝΣΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 9,86 | 1 | 2,7608 |
| 14 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 5,9 | 1 | 1,652 |
| 15 | | ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 9,8 | 1 | 2,744 |
| 16 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 8,3 | 1 | 2,324 |
| 17 | | ΕΗΡΑΝΣΗ | - | 7,58 | 1 | 2,1224 |
| 18 | | | ΑΦΡΟΣ | 2,67 | 2 | 1,4952 |
| 19 | | ΑΠΟΘΗΚΗ | - | 7,6 | 1 | 2,128 |
| 20 | Γ | ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | ΥΓΙΕΙΣ | 7,5 | 1 | 2,1 |
| 21 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 2,35 | 2 | 1,316 |
| 22 | | ΩΡΙΜΑΝΣΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 9,5 | 1 | 2,66 |
| 23 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 5,7 | 2 | 3,192 |
| 24 | | ΕΗΡΑΝΣΗ | ΛΕΥΚΟΙ | 8,7 | 1 | 2,436 |
| 25 | | | ΣΚΟΥΡΟΙ | 7,35 | 1 | 2,058 |
| 26 | ΕΣΩΤ ΚΗΛΙΔΕΣ | | 7 | 1 | 1,96 | |
| 27 | Δ | ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | ΥΓΙΕΙΣ | 9 | 1 | 2,52 |
| 28 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 2,7 | 2 | 1,512 |
| 29 | | ΩΡΙΜΑΝΣΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 11,45 | 1 | 3,206 |
| 30 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 6,7 | 1 | 1,876 |
| 31 | | ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | ΥΓΙΕΙΣ | 11,17 | 1 | 3,1276 |
| 32 | | | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 9,45 | 1 | 2,646 |
| 33 | | | - | 7,5 | 1 | 2,1 |
| 34 | | ΕΗΡΑΝΣΗ | 25% ΑΛΑΤΙ | 7,7 | 1 | 2,156 |
| 35 | | | 35% ΑΛΑΤΙ | 8,29 | 1 | 2,3212 |
| 36 | | ΑΠΟΘΗΚΗ | - | 7,5 | 1 | 2,1 |
| 37 | | | 25% ΑΛΑΤΙ | 8 | 1 | 2,24 |
| 38 | 35% ΑΛΑΤΙ | | 7,6 | 1 | 2,128 | |

*Μέθοδος 1: Δείγμα >5γρ, Μέθοδος 2: Δείγμα <5γρ

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας Β8) περιγράφονται όλα τα Δείγματα Ταυτοποίησης που συλλέχθηκαν από όλους τους πειραματικούς αγρούς σε όλα τα στάδια παραγωγής – μεταποίησης των κελυφωτών φιστικιών. Η στήλη με την αναφορά στη μέθοδο αναφέρεται στην τροποποίηση που ακολουθήθηκε κατά την προετοιμασία του συγκεκριμένου δείγματος για ανάλυση και για τον υπολογισμό της συμπύκνωσης.

B.6.5.5. Δοκιμές ανάκτησης

Για τη δοκιμή της ανάκτησης λήφθηκε δείγμα κελυφωτών φιστικιών, το οποίο δεν περιείχε αφλατοξίνες ύστερα από έλεγχο από εξωτερικό διαπιστευμένο εργαστήριο (Agrolab A.E.). Το δείγμα των φιστικιών μιάνθηκε με ποσότητα 5ppb, 10ppb και 20ppb συνολική αφλατοξίνη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών το οποίο παρασκευάστηκε από το αρχικό πρότυπο των 1000ppb. Για τις B₁ και G₁ οι παραπάνω ποσότητες μίανσης αντιστοιχούν σε 2ppb, 4ppb και 8ppb ενώ για τις B₂ και G₂ σε 0.5ppb, 1ppb και 2ppb, αντίστοιχα. Για τις συγκεντρώσεις των 10ppb και 20ppb συνολική αφλατοξίνη πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και για την 5ppb δύο επαναλήψεις.

Για τη δοκιμή της ανάκτησης η διαδικασία ήταν η ακόλουθη: λαμβάνονται τα επιμέρους δείγματα των 20 g τα οποία αλέθονται για περίπου ένα λεπτό, όπως περιγράφηκε και στην παραπάνω διαδικασία για τα άγνωστα δείγματα. Εν συνεχεία, μαιίνονται με την αντίστοιχη γνωστή συγκέντρωση προτύπων σε ποσότητα 1ml. Κατά τη μεταφορά του προτύπου θα πρέπει το πρότυπο να μεταφερθεί σε όλη την ποσότητα του δείγματος και γι' αυτό το δείγμα αλέθεται ξανά για περίπου 5-10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα αφήνονται να ηρεμήσουν για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η προετοιμασία τους είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθείται για τα άγνωστα δείγματα αγρού.

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές ανάκτησης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες για κάθε αφλατοξίνη ξεχωριστά (Πίνακας Β.9, Β.10, Β.11 και Β.12)

Πίνακας Β.9. Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη G₂.

| Ποσότητα επιμόλυνσης (ppb) | Εμβαδό (mV.s) | Συγκέντρωση (ppb)* | Πραγματική συγκέντρωση (ppb) | % Ανακτηση |
|--|---------------|--------------------|------------------------------|--------------|
| 0,5 | 0,422 | 0,94 | 0.336 | 67,04 |
| 0,5 | 0,43 | 0,96 | 0.342 | 68,31 |
| 1 | 0,975 | 2,17 | 0.775 | 77,45 |
| 1 | 1,095 | 2,44 | 0.871 | 86,98 |
| 1 | 1,18 | 2,62 | 0.936 | 93,73 |
| 2 | 1,921 | 4,27 | 1.525 | 76,30 |
| 2 | 1,59 | 3,54 | 1.264 | 63,15 |
| 2 | 1,915 | 4,26 | 1.521 | 76,06 |
| * Χωρίς τον υπολογισμό της συμπίκνωσης (2.8) | | | M.O. | 76,13 |

Πίνακας Β.10. Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη G₁.

| Ποσότητα επιμόλυνσης (ppb) | Εμβαδό (mV.s) | Συγκέντρωση (ppb)* | Πραγματική συγκέντρωση (ppb) | % Ανακτηση |
|--|---------------|--------------------|------------------------------|--------------|
| 2 | 0,914 | 3,90 | 1,393 | 69,60 |
| 2 | 0,899 | 3,83 | 1,368 | 68,46 |
| 4 | 1,958 | 8,35 | 2,982 | 74,55 |
| 4 | 2,295 | 9,79 | 3,496 | 87,38 |
| 4 | 2,185 | 9,32 | 3,329 | 83,19 |
| 8 | 4,541 | 19,36 | 6,914 | 86,45 |
| 8 | 3,731 | 15,91 | 5,682 | 71,03 |
| 8 | 4,066 | 17,34 | 6,193 | 77,41 |
| * Χωρίς τον υπολογισμό της συμπίκνωσης (2.8) | | | M.O. | 77,26 |

Πίνακας Β.11. Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη B₂.

| Ποσότητα επιμόλυνσης (ppb) | Εμβαδό (mV.s) | Συγκέντρωση (ppb)* | Πραγματική συγκέντρωση (ppb) | % Ανακτηση |
|--|---------------|--------------------|------------------------------|--------------|
| 0,5 | 1,325 | 1,10 | 0,393 | 78,43 |
| 0,5 | 1,023 | 0,85 | 0,304 | 60,55 |
| 1 | 3,178 | 2,63 | 0,939 | 94,06 |
| 1 | 3,061 | 2,54 | 0,907 | 90,60 |
| 1 | 2,926 | 2,42 | 0,864 | 86,60 |
| 2 | 5,401 | 4,48 | 1,600 | 79,93 |
| 2 | 5,113 | 4,24 | 1,514 | 75,66 |
| 2 | 4,59 | 3,80 | 1,357 | 67,92 |
| * Χωρίς τον υπολογισμό της συμπίκνωσης (2.8) | | | M.O. | 79,22 |

Πίνακας Β.12. Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη Β₁.

| Ποσότητα επιμόλυν-σης (ppb) | Εμβαδό (mV.s) | Συγκέντρωση (ppb)* | Πραγματική συγκέντρωση (ppb) | % Ανακτηση |
|--|---------------|--------------------|------------------------------|--------------|
| 2 | 1,457 | 3,91 | 1,396 | 69,79 |
| 2 | 1,598 | 4,29 | 1,532 | 76,54 |
| 4 | 3,738 | 10,03 | 3,582 | 89,53 |
| 4 | 4,473 | 12,00 | 4,285 | 107,13 |
| 4 | 3,64 | 9,76 | 3,486 | 87,18 |
| 8 | 6,919 | 18,56 | 6,629 | 82,86 |
| 8 | 6,102 | 16,37 | 5,846 | 73,07 |
| 8 | 7,552 | 20,26 | 7,236 | 90,44 |
| * Χωρίς τον υπολογισμό της συμπύκνωσης (2.8) | | | M.O. | 84,57 |

Από τους παραπάνω πίνακες με τις δοκιμές ανάκτησης για τις 4 αφλατοξίνες φαίνεται ότι τα ποσοστά ανάκτησης είναι σύμφωνα με τα κριτήρια απόδοσης για τις αφλατοξίνες όπως αναφέρονται στη νομοθεσία⁵.

Στο Παράρτημα 4 επισυνάπτονται όλα τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων που αφορούν τις δοκιμές ανάκτησης.

6.5.6. Ανίχνευση αφλατοξινών με HPLC

Τα χαρακτηριστικά της συσκευής HPLC που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση του πειράματος καθώς και οι συνθήκες λειτουργίας της αναφέρονται παρακάτω:

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος με θάλαμο έγχυσης (loop): 100 μl
- Συνδυασμός διαλυτών – Κινητή φάση: νερό-μεθανόλη-ακετονιτρίλιο : 6-2-2
- Φιάλη με ήλιο:
- Στήλη: RESTEK, Pinnacle II, C18, 5μm, 250x4,6mm
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Lachrom Merck Hitachi, L-7485). Το μήκος διέγερσης των αφλατοξινών ρυθμίστηκε στα 360 nm και το μήκος εκπομπής στα 435nm.
- Αντλία : Lachrom Merck Hitachi, L-7100
- Ταχύτητα ροής : 1 ml/min Η έκλουση είναι ισοκρατική.
- Ολοκληρωτής : (Hewlett Packard HP3394A)

- Σύστημα παραγωγοποίησης μετά τη στήλη¹⁰: Φωτοχημικός Αντιδραστήρας με Υπεριώδες φως (UVE) στα 254nm

B.6.5.6.1. Ποσοτική ανάλυση

Οι αναλύσεις όλων των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν με HPLC. Με τη μικροσύριγγα των 250 μl λαμβάνονται σε κάθε ανάλυση 125μl – 150μl από το υπό εξέταση δείγμα και εισάγονται στη συσκευή για μέτρηση. Πριν από κάθε ένεση πραγματοποιούνται τουλάχιστο 5 πλύσεις με μεθανόλη και εν συνεχεία 2 ξεπλύματα με το δείγμα. Στα Δείγματα Ανάλυσης γίνονταν 3 ενέσεις για κάθε επανάληψη (3 επαναλήψεις x 3 ενέσεις = 9 μετρήσεις). Στα Δείγματα Ταυτοποίησης γίνονταν 2 ενέσεις για κάθε δείγμα. Κάθε ημέρα, πριν από την έναρξη των ενέσεων για τα άγνωστα δείγματα, γίνονταν μία δοκιμή με πρότυπο διάλυμα 100ppb συνολική αφλατοξίνη τόσο για έλεγχο της καλής λειτουργίας της HPLC καθώς και για τον καλύτερο ποιοτικό προσδιορισμό των 4 κορυφών. Ο διαλύτης της κινητής φάσης επιλέχθηκε να είναι νερό-ακετονιτρίλιο-μεθανόλη 6:2:2, διότι σε αυτή την αναλογία υπήρχε καλός διαχωρισμός των 4 αφλατοξινών.

B.6.5.6.2. Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα τόσο των μετρήσεων για την ύπαρξη *A.flavus* όσο και των αναλύσεων αφλατοξίνης επεξεργάστηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα STATGRAPHICS Centurion XV.II. Η στατιστική ανάλυση αφορούσε την ύπαρξη διαφορών μεταξύ των δειγματοληψιών και μεταξύ των πειραματικών αγρών για κάθε δειγματοληψία. Όπου η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) έδειξε ότι οι μέσοι όροι διέφεραν σημαντικά προσδιορίστηκαν οι επεμβάσεις με τη μέθοδο Fisher της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΓΡΩΝ – ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Η μελέτη ξεκίνησε σύμφωνα με το κατατεθειμένο πρόγραμμα από τον Μάιο με περιοδικές επισκέψεις στους φιστικεώνες έως και τον Ιούνιο. Σκοπός των επισκέψεων ήταν η παρακολούθηση τόσο της καλλιέργειας (καταγραφή φαινολογικών σταδίων) όσο και των πληθυσμών των εντόμων – εχθρών της καλλιέργειας (ευρύτομο, σκώρος, ψύλλα) με την ανάρτηση παγίδων σε διάφορους αγρούς. Επίσης, συγκεντρώθηκαν πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση της καλλιέργειας την φετινή χρονιά από παραγωγούς (αναμενόμενη ηρτημένη παραγωγή, προγράμματα φυτοπροστασίας – λίπανσης, καταπολέμηση εντόμων, κλιματολογικές συνθήκες, κατάσταση δένδρων προηγούμενης χρονιάς – ακαρπία, καρποφορία). Οι καταγραφές για κάθε πειραματικό αγρό ξεχωριστά περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας Γ.1.1 έως Γ.1.4).

Πίνακας Γ.1.1 Κτήμα Α : ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΧΩΡΑΦΙΟΥ - ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Σύνολο δένδρων: 220

| <i>Ψεκασμοί</i> | <i>Λιπάνσεις</i> | <i>Αρδεύσεις</i> | <i>Αναλύσεις</i> | <i>Παρατηρήσεις</i> |
|--|------------------|-------------------------|------------------|--|
| 10/5/08 carbaryl+mancozeb | 2008 - | 1) 30-7-08 | - | Γενική κατάσταση φιστικεώνα καλή, περιποιημένα, κλαδεμένα δένδρα που ποτίζονται με πολύ καλή καρποφορία. Εκτιμώμενη παραγωγή: 6-7 κιλά/δένδρο |
| 25/5/08 carbaryl+ mancozeb | 2007 - | 2) 13/8/08 | | |
| | 2006 | | | |
| <i>Παρατηρήσεις:</i> Ο αγρός γειτνιάζει με δρόμο και στα ακριανά δένδρα (προς το δρόμο) υπήρχε εμφανώς περισσότερη προσβολή από σκώρο. Ο αγρός εμφάνιζε μέτρια προσβολή από σκώρο και ευρύτομο (βρέθηκαν προνύμφες). Υπήρχε και μικρή προσβολή από ψύλλα. | 20-10-20 | Με περίπου 1 κυβ/δένδρο | | |

Εικόνα Γ1.1. Κτήμα Α – Στάδιο καλλιέργειας



Πίνακας Γ 1.2. Κτήμα Β : ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΧΩΡΑΦΙΟΥ – ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Σύνολο δένδρων: 450 (σε αναβαθμίδες)

| <i>Ψεκασμοί</i> | <i>Λιπάνσεις</i> | <i>Αρδεύσεις</i> | <i>Αναλύσεις</i> | <i>Παρατηρήσεις</i> |
|--|--|--------------------------|------------------|--|
| 10/5/08 diazinon+ mancozeb | 2008 KNO3 | 1) 10/7/08 2) 25/7/08 | 2007 εδάφους | Σε πολύ καλή κατάσταση ο φιστικεώνας (πολύ περιποιημένα δένδρα κλαδεμένα τα οποία ποτίζονται) και πολύ καρποφορία. |
| 20/5/08 diazinon+mancozeb | 300γρ/δένδρ ο 2 φορές | 3) 10/8/08 | | |
| 6/8/08 spinosad+λάδι | 2007 πρόγραμμα λίπανσης (σύσταση από γεωπόνο περιοχής) | | | |
| <i>Παρατηρήσεις:</i> Ελάχιστη έως καθόλου προσβολή από σκώρο και ευρύτομο κυρίως στα ακριανά δέντρα. Έντονη όμως προσβολή από ψύλλα κυρίως στα ακριανά δένδρα. | | | | Εκτιμώμενη παραγωγή: 6-7 κιλά/δένδρο |

Εικόνα Γ.1.2. Κτήμα Β – Στάδιο καλλιέργειας



Πίνακας Γ.1.3. Κτήμα Γ : ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΧΩΡΑΦΙΟΥ - ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Σύνολο δένδρων: 40 (το σύνολο των δένδρων καθορίστηκε ως πειραματικός αγρός)

| <i>Ψεκασμοί</i> | <i>Λιπάνσεις</i> | <i>Αρδεύσεις</i> | <i>Αναλύσεις</i> | <i>Παρατηρήσεις</i> |
|---|--|------------------|------------------|---|
| 3/5/08 carbaryl + Cu | 2008 1) 20-5-20 4-5 kg/δένδρο 2) 3κιλ/δένδρο θειϊκή αμμωνία | - | - | Γενική κατάσταση φιστικεώνα πολύ κακή, δίπλα στη θάλασσα. Το κτήμα φαινόταν σαν εγκαταλελειμμένο. |
| 18/5/08 deltamethrin+ mancozeb | | | | |
| Παρατηρήσεις: - Πολύ μεγάλη προσβολή από σκώρο και ευρύτομο - Υπήρχε πολύ προσβολή από βρωμούσα | 2007 - | | | Εκτιμώμενη παραγωγή: 3-4 κιλά/δένδρο |
| | 2006 11-15-15 5 κιλ/δένδρο | | | |

Εικόνα Γ.1.3. Κτήμα Γ – Στάδιο καλλιέργειας – Κατάσταση προσβολών



Πίνακας Γ.1.4. Κτήμα Δ : ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΧΩΡΑΦΙΟΥ - ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Σύνολο δένδρων: 125

| ΨΕΚΑΣΜΟΙ | Λιπάνσεις | Αρδεύσεις | Αναλύσεις | Παρατηρήσεις |
|--|---|--------------------------|--|--|
| 10/5/08 carbaryl+mancozeb | 2008 - | 1) 10/7/08 2) 20/7/08 | 2006 εδάφους (Δεν υπάρχουν τα στοιχεία) | Ο αγρός ήταν περιποιημένος. Επιβαρημένος από προσβολές από έντομα. |
| 19/5/08 carbaryl+mancozeb | 2007 20-10-20 | 3) 30/7/08 4) 9/8/08 | | |
| 25/6/08 spinosad+λάδι | 3 κιλ/δένδρο | | | |
| 4/8/08 abamectin | 2006 20-10-20 3 κιλ/δένδρο | 0,7 κ.εκ. / δένδρο | | |
| Παρατηρήσεις: - Σημαντική προσβολή από ψύλλα (κάθε χρόνο πρόβλημα) και ένα μικρό ποσοστό από σκώρο και ευρύτομο. - Βρήκαμε 3 προνύμφες σκώρου την ημέρα της σήμανσης. Υπήρχε πολύ προσβολή από βρωμούσα | | | | Εκτιμώμενη παραγωγή: 5-6 κιλά/δένδρο |

Εικόνα Γ.1.4. Κτήμα Δ – Στάδιο καλλιέργειας



Γ.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΑ ΤΡΙΒΛΙΑ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων μετά την καλλιέργεια και επώαση των κελυφωτών φιστικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC παρουσιάζονται για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες Γ.2.1. έως και Γ.2.12). Οι μετρήσεις αφορούσαν την εμφάνιση ή όχι των ειδών *A.flavus*, *A.niger* και *A.carbonarius* στους καρπούς, οι οποίοι είχαν επωαστεί στα τριβλία.

Γ.2. 1. Αποτελέσματα 1^{ης} δειγματοληψίας – Αρχή Ωρίμανσης

Πίνακας Γ.2.1. 1^η Δειγματοληψία - Αρχή Ωρίμανσης

| Δειγματοληψία: 6-8-08 | | Επώαση: 25oC για 4 ημέρες | | | | |
|--------------------------|---------------|---------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Μόλυνση τριβλίων: 7-8-08 | | | | | | |
| Μέτρηση: 11-8-08 | | | | | | |
| ΚΤΗ ΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛΗ ΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| Α | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 10 | 7 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 10 | 6 | 1 |
| | --> - | 3 | 10 | 10 | 9 | 5 |
| ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 30 | 22 | 6 | |
| Β | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 10 | 9 | 1 |
| | --> - | 2 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 10 | 7 | 0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 30 | 26 | 1 | |
| Γ | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 0 | 2 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 0 | 2 | 0 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 3 | 10 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 2 | 10 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 7 | 10 | 0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 12 | 30 | 0 | |
| Δ | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 0 | 1 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 0 | 1 | 0 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | --> - | 2 | 10 | 8 | 9 | 0 |
| | --> - | 3 | 10 | 8 | 8 | 0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 26 | 27 | 0 | |

Παρατηρήσεις κατά την τοποθέτηση στο υπόστρωμα:

1. Κατά την μόλυνση στα τριβλία των καρπών του Κτήματος Γ, από τους 30 προβληματικούς καρπούς στους 10 βρέθηκε προνύμφη ευρυτόμου και 1 σκώρου.
2. Στα κτήματα Β και Δ υπήρχε σοβαρή προσβολή από ψύλλα ενώ η προσβολή από ευρύτομο και σκώρο περιορίζεται στα ακριανά περιφερειακά δένδρα. Σε αυτά τα κτήματα οι προβληματικοί καρποί ήταν μισοί γεμάτοι (ψίχα) και μισοί άδειοι.
3. Οι καρποί σε αυτό το δείγμα ήταν ανώριμοι και η φλούδα δεν μπορούσε εύκολα να αποκολληθεί.

Παρατηρήσεις κατά την μέτρηση:

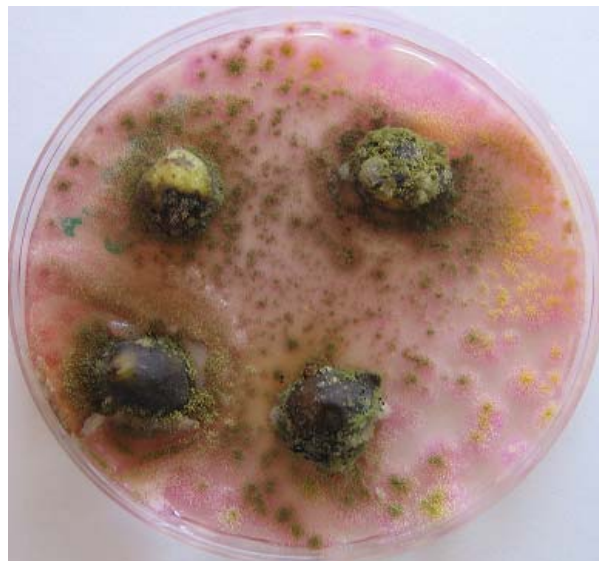
1. Στους υγιείς καρπούς δεν βρέθηκε προσβολή από *A.flavus* ή άλλο ασπέργιλλο σε κανένα κτήμα (Εικόνα Γ.2.1.).
2. Αντίθετα, όλοι οι προβληματικοί καρποί ανέπτυξαν *A.flavus* και *A.niger* (Εικόνα Γ.2.2).
3. Στο κτήμα Α αναπτύχθηκε και ο *A.carbonarius* οπότε μελλοντικές αναλύσεις για ωχρατοξίνη θα είχαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι περιορισμένες για την ύπαρξη *A.carbonarius* σε κελυφωτά φιστίκια και την παραγωγή ωχρατοξίνης^{25,31}.
4. Υπήρχαν διαφορές μεταξύ των Κτημάτων. Στο κτήμα Α και Β επικρατούσε ο *A.flavus*, στο Δ υπήρχε ίση κατανομή *A.flavus* και *A.niger* στο τριβλίο, ενώ στο Γ (το χωράφι με τις περισσότερες προσβολές) επικρατούσε σημαντικά ο *A.niger* (Εικόνα Γ.2.3 α,β).
5. Μέσα στο δείγμα των προβληματικών καρπών υπήρχαν και μαύροι άσπερμοι καρποί στους οποίους φάνηκε να επικρατεί ο *A.niger*. Αυτό συσχετίζεται και με τα αποτελέσματα του Κτήματος Γ στο οποίο υπάρχει μεγάλη προσβολή από έντομα και πολλοί μαύροι κούφιοι καρποί.

Εικόνα Γ.2.1. Υγιείς καρποί μετά την επώαση στο εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC



Σχόλια: Καμία ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Aspergillus*

Εικόνα Γ.2.2. Προβληματικοί καρποί μετά την επώαση στο εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC



Σχόλια: Σοβαρή ανάπτυξη *Aspergillus flavus* στους προβληματικούς (χτυπημένοι, προσβεβλημένοι από έντομα, μαυρισμένοι, κούφιοι) καρπούς.

Γ.2. 2. Αποτελέσματα 2^{ης} δειγματοληψίας – Ωρίμανσης

Πίνακας Γ.2.2. 2^η Δειγματοληψία - Ωρίμανση

| | | Δειγματοληψία: 13-8-08 | | Διατήρηση σε ψυγείο στους 4-6 οC | | | |
|---------------|---------------|---------------------------|---------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---|
| | | Μόλυνση τριβλίων: 18-8-08 | | Επώαση: 25οC για 4 ημέρες | | | |
| | | Μέτρηση: 22-8-08 | | | | | |
| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | | |
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> | |
| A | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 3 | 0 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 2 | 0 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 5 | 0 | 0 | |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 10 | 1 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 0 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 2 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 30 | 3 | 0 | |
| | B | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | | - >> - | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| - >> - | | 3 | 10 | 2 | 0 | 0 | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 2 | 0 | 0 | |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | | 1 | 10 | 7 | 10 | 6 | |
| - >> - | | 2 | 10 | 7 | 7 | 4 | |
| - >> - | | 3 | 10 | 7 | 10 | 9 | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 21 | 27 | 19 | |
| Γ | | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 1 | 5 | 1 |
| | | - >> - | 2 | 10 | 0 | 2 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 2 | 1 | 1 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 3 | 8 | 2 | |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 10 | 1 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 4 | 2 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 8 | 10 | 9 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 28 | 15 | 11 | |
| | Δ | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 4 | 3 | 0 |
| | | - >> - | 2 | 10 | 3 | 1 | 0 |
| - >> - | | 3 | 10 | 1 | 0 | 0 | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 8 | 4 | 0 | |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | | 1 | 10 | 10 | 0 | 0 | |
| - >> - | | 2 | 10 | 8 | 3 | 1 | |
| - >> - | | 3 | 10 | 4 | 4 | 2 | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 22 | 7 | 3 | |

Παρατηρήσεις κατά την τοποθέτηση στο υπόστρωμα:

- 1) Κατά τη 2η δειγματοληψία οι περισσότεροι καρποί ήταν ώριμοι και κάποιοι είχαν αρχίσει να σχίζονται λόγω υπερωρίμανσης. Κάποιοι από αυτούς τους καρπούς (υγείς – Εικόνα Γ.2.4) επιλέχθηκαν σκοπίμως για plating και ανάλυση. Θεωρήθηκαν ως προσβεβλημένοι λόγω των σχισμάτων στη φλούδα και επισημάνθηκαν επάνω στα τριβλία (Εικόνα Γ.2.5).
- 2) Κατά το κόψιμο των καρπών στο Κτήμα Β βρέθηκαν και 2 προνύμφες ευρυτόμου.
- 3) Κατά τη συλλογή του 2ου δείγματος επιλέχθηκαν και καρποί που ήταν κούφιοι - μαύροι και καρποί γεμάτοι με μαύρα στίγματα εξωτερικά.
- 4) Κάποιοι καρποί κυρίως στο Κτήμα Δ & Α από τους υγείς είχαν μία κηλίδα σκούρο-κόκκινη μέσα στην ψίχα. Είχε επισημανθεί και σε προηγούμενη μελέτη²⁴. Στις επόμενες μετρήσεις, οι καρποί που έφεραν την εσωτερική κηλίδα επισημαίνονταν επάνω στο τριβλίο.

Παρατηρήσεις κατά την μέτρηση:

- 1) Σε αυτή την μέτρηση ασπέργιλλοι (*A.flavus* και *A.niger*) αναπτύχθηκαν όχι μόνο στους προβληματικούς καρπούς αλλά και σε ορισμένους φαινομενικά υγείς καρπούς. Σαφώς, στα τριβλία με τους προβληματικούς καρπούς η ανάπτυξη ήταν πολύ μεγαλύτερη (Εικόνα Γ.2.6).
- 2) Στο Κτήμα Δ επικρατούσε κυρίως ο *Aspergillus flavus*. Στους υγείς καρπούς η μόλυνση με τον *A. flavus* φαινόταν να προέρχεται από τη φλούδα και όχι την ψίχα. Σε 3 καρπούς με σχίσμο φάνηκε να υπάρχει *Aspergillus flavus*.
- 3) Στο Κτήμα Γ ενώ στην προηγούμενη μέτρηση φαινόταν να επικρατεί ο *A.niger* τώρα περισσότεροι καρποί εμφάνισαν *A.flavus*. Γενικά σε αυτό το κτήμα ήταν δύσκολο να ξεχωριστούν τελείως υγείς καρποί.
- 4) Στο Κτήμα Β επικρατούσε ο *A.niger* σαν γενική εικόνα αν και υπήρχε ισοκατανομή των προσβολών μεταξύ των δύο γενών αριθμητικά. Επίσης μετρήθηκε και *A.carbonarius*.
- 5) Στο Κτήμα Α επικρατούσε ο *A.flavus* όπως και στην προηγούμενη μέτρηση.
- 6) Γενικά φαίνεται ότι όσο πλησιάζει η ωρίμανση, οι καρποί γίνονται πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις γι'αυτό ακόμα και στους υγείς καρπούς μετρήθηκε *A.flavus*.

Εικόνα Γ.2.4. Δείγμα υγιών καρπών πριν την τοποθέτηση στα τριβλία.



Εικόνα Γ.2.5. Δείγμα προβληματικών καρπών από το Κτήμα Α πριν την τοποθέτηση στα τριβλία.



Σχόλια: Διακρίνονται οι καρποί με σχίσμο στη φλούδα λόγω πρόωρης ωρίμανσης. Αντίστοιχη ήταν και η εικόνα των προσβεβλημένων καρπών από τα υπόλοιπα κτήματα.

Εικόνα Γ.2.6. Ανάπτυξη *A.flavus* στο Δείγμα προβληματικών καρπών από τη δεύτερη δειγματοληψία



Εικόνα Γ.2.7. Καμία ανάπτυξη ασπεργίλλων στο Δείγμα υγιών καρπών από τη δεύτερη δειγματοληψία



Γ.2. 3. Αποτελέσματα 3^{ης} δειγματοληψίας – Συγκομιδή

Πίνακας Γ.2.3. 3^η Δειγματοληψία - Συγκομιδή Κτήμα Α

| | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Δειγματοληψία: 20-8-08 | Διατήρηση σε ψυγείο στους 4-6 οC |
| Μόλυνση τριβλίων: 22-8-08 | Επώαση: 25οC για 4-5 ημέρες |
| Μέτρηση: 27-8-08 | |

| ΚΤΗΜΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | | ΕΠΑΝΑΛ ΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
|-----------------|---------------|-----------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| Α | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 9 | 8 | 5 |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 8 | 6 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 7 | 6 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 29 | 23 | 17 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 10 | 2 | 2 |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 2 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 9 | 8 | 2 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 29 | 12 | 4 |

Παρατηρήσεις κατά την συγκομιδή – συλλογή του δείγματος:

1) Τα ακριανά δένδρα που γειτνιάζαν στο δρόμο είχαν μεγάλο ποσοστό προσβεβλημένων καρπών. Τα υπόλοιπα δένδρα ήταν καλύτερα. Το δείγμα επιλέχθηκε από όλα τα δέντρα τυχαία μέσα από τους σάκους συγκομιδής (Εικόνα Γ.2.8).

2) Από 20 δένδρα συγκομίστηκαν περίπου 250 κιλά και μετά την αποφλοιώση έμειναν περίπου 90-100 κιλά.

Παρατηρήσεις κατά την μέτρηση:

1) Σχεδόν σε όλους τους υγιείς καρπούς αναπτύχθηκε *A. flavus*, *A. niger* και *A. carbonarius*. Όμως στους προβληματικούς καρπούς η ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερη και φαινόταν να επικρατεί ο *A.flavus*. (Εικόνα Γ.2.9.)

2) Επαναλήφθηκε η εικόνα και ο ισχυρισμός ότι όσο πλησιάζει η ωρίμανση οι καρποί γίνονται πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις, οπότε και οι υγιείς εμφανίζουν ασπέργιλλους.

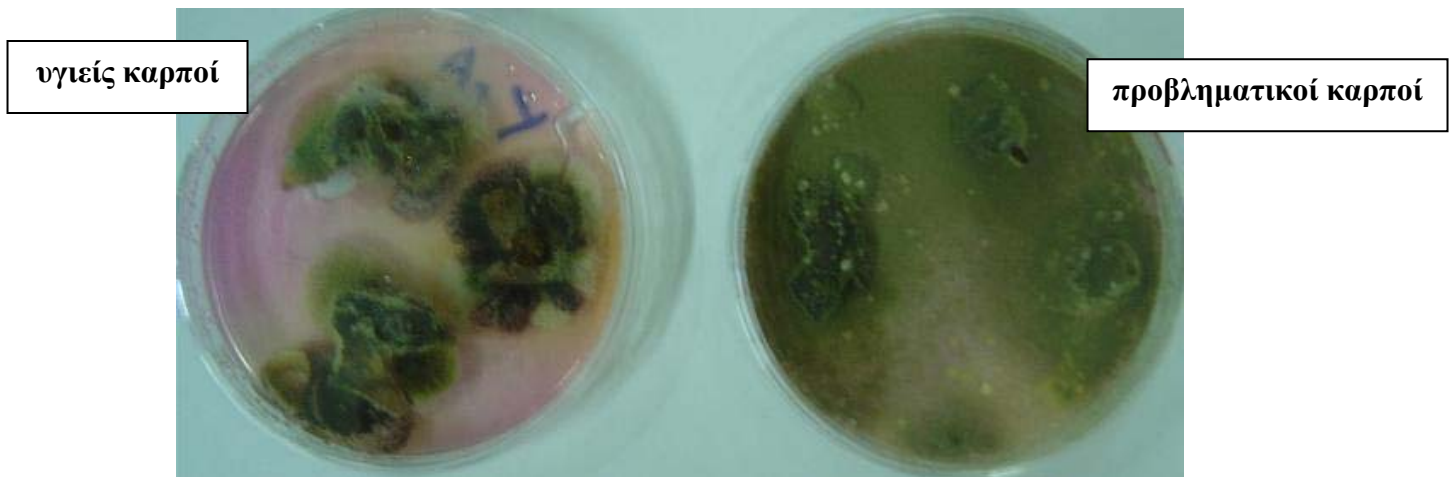
3) Μεταξύ όμως υγιών και προσβεβλημένων υπήρχε ποσοτική διαφορά στη μόλυνση (στους προσβεβλημένους όλο το τριβλίο ήταν καλυμμένο – Εικόνες Γ.2.9. & Γ.2.10.).

- 4) Στους υγιείς καρπούς, οι μολύνσεις φαίνονταν να προέρχονται κυρίως από το εξωκάρπιο (φλούδα) (και στο εσωτερικό της). Όπου η ψίχα είχε ξεχωριστεί δεν αναπτύχθηκε ασπέργιλλος. Αντίθετα, στους προσβεβλημένους και στην ψίχα αναπτύχθηκε *A. flavus*.
- 5) Δημιουργήθηκε προβληματισμός για τη σχέση μεταξύ *A.flavus*, *A.niger* και *A. carbonarius*.

Εικόνα Γ.2.8. Δείγμα Συγκομιδής – Προβληματικοί καρποί Κτήμα Α πριν την τοποθέτηση στα τριβλία.

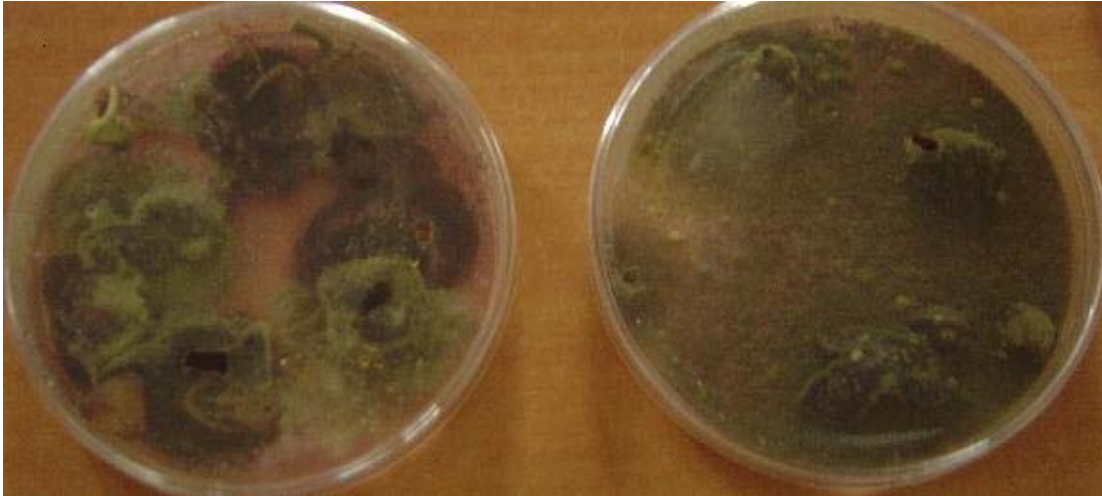


Εικόνα Γ.2.9. Ανάπτυξη *A.flavus* στο Δείγμα Συγκομιδής – Αριστερά: υγιείς καρποί– Δεξιά: προβληματικοί καρποί



Σχόλια: Φαίνεται η διαφορά μεταξύ της ανάπτυξης *A.flavus* για τις ίδιες ημέρες επώασης.

**Εικόνα Γ.2.10. Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στο Δείγμα Συγκομιδής –
Αριστερά: υγιείς καρποί– Δεξιά: προβληματικοί καρποί**



Πίνακας Γ.2.4. 3^η Δειγματοληψία - Συγκομιδή Κτήμα Β

| Δειγματοληψία: 1-9-08 | | Διατήρηση σε ψυγείο στους 4-6 οC | | | | |
|--------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Μόλυνση τριβλίων: 3-9-08 | | Επώαση: 25οC για 4-5 ημέρες | | | | |
| Μέτρηση: 8-9-08 | | | | | | |
| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| B | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 8 | 8 | 6 |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 5 | 2 |
| | - >> - | 3 | 10 | 9 | 6 | 2 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 27 | 19 | 10 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 7 | 7 | 1 |
| | - >> - | 2 | 10 | 5 | 5 | 2 |
| | - >> - | 3 | 10 | 6 | 10 | 1 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 18 | 22 | 4 |

Παρατηρήσεις κατά την συγκομιδή – συλλογή του δείγματος:

- 1) Τα δένδρα συγκομίστηκαν από τον παραγωγό και τους εργάτες και το δείγμα συλλέχθηκε μέσα από τους σάκους συγκομιδής.
- 2) Οι καρποί ήταν ώριμοι και κάποιοι υπερώριμοι, χτυπημένοι και μαυρισμένοι από τη διαδικασία συγκομιδής και δεν ήταν εύκολο να ξεχωριστούν οι απολύτως "υγιείς".

Παρατηρήσεις κατά την τοποθέτηση στο υπόστρωμα:

- Υγιείς καρποί:
 - 1) Βρέθηκαν 8 καρποί με εσωτερική κηλίδα και επισημάνθηκαν επάνω στα τριβλία (Εικόνα Γ.2.12).
 - 2) Γενικά ήταν πολύ καλοί καρποί τόσο εσωτερικά όσο και εξωτερικά σε σχέση με τα υπόλοιπα κτήματα (Εικόνα Γ.2.11).
 - 3) Δεν υπήρχαν υπερώριμοι καρποί με σχισίματα.
- Προβληματικοί καρποί:
 - 1) Υπήρχαν 6 καρποί με εσωτερική κηλίδα και 2 κούφιοι στους οποίους υπήρχε προνύμφη ευρυτόμου.
 - 2) Γενικά η εικόνα των προβληματικών δεν ήταν πολύ κακή, ήταν κυρίως χτυπημένοι από τη συγκομιδή και κούφιοι (Εικόνα Γ.2.11).
 - 3) Δεν υπήρχαν υπερώριμοι καρποί με σχίσσιμο.

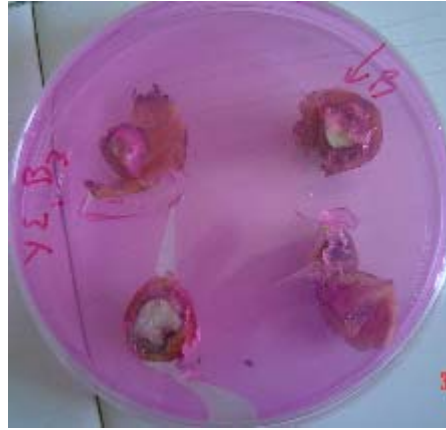
Παρατηρήσεις στην μέτρηση:

- 1) Σε όσους καρπούς αναπτύχθηκε *A.flavus* δεν είχαν απαραίτητα και εσωτερική κηλίδα.
- 2) *A. flavus* σε κάποιους καρπούς αναπτύχθηκε και στην ψίχα.
- 3) Στους υγιείς καρπούς φαινόταν να επικρατεί ο *A.flavus* (27 στους 30) ενώ στους προβληματικούς ο *A.niger* (22 στους 30). Εικόνα Γ.2.13.
- 4) Οι καρποί με προσβολή από ευρύτομο είχαν *A.flavus*.

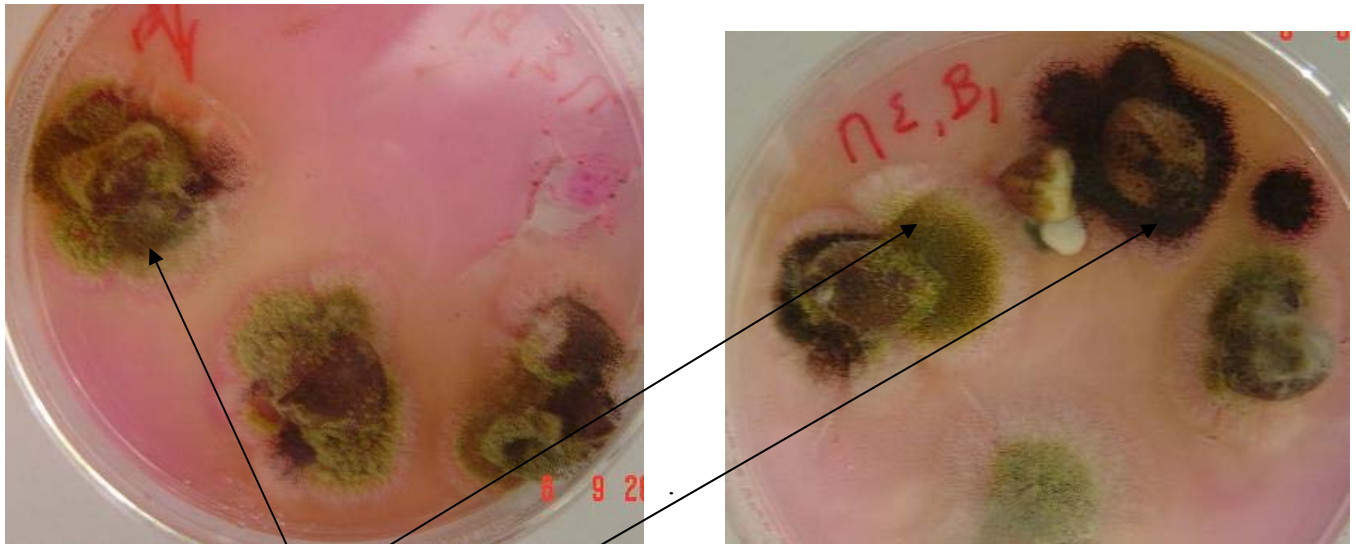
Εικόνα Γ.2.11. Δείγμα Συγκομιδής – Υγιείς (αριστερά) και προβληματικοί (δεξιά) καρποί από το Κτήμα Β πριν την τοποθέτηση στα τριβλία



Εικόνα Γ.2.12. Δείγμα Συγκομιδής από το Κτήμα Β- καρποί με εσωτερική κηλίδα



Εικόνα Γ.2.13. Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* σε προβληματικούς καρπούς από το Κτήμα Β στο Δείγμα Συγκομιδής.



Σχόλια: Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger*

Πίνακας Γ.2.5. 3^η Δειγματοληψία - Συγκομιδή Κτήμα Δ

| | |
|----------------------------------|--|
| Δειγματοληψία: 23-8-08 | Διατήρηση σε ψυγείο στους 4-6 οC Επώαση: 25οC για 4-5 ημέρες |
| Μόλυνση τριβλίων: 27-8-08 | |
| Μέτρηση: 1-9-08 | |

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
|-------|---------------|-------------|---------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| Δ | ΥΓΙΕΙΣ | 1 | 10 | 10 | 4 | 3 |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 5 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 7 | 2 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 30 | 16 | 5 |
| | ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1 | 10 | 7 | 10 | 4 |
| | - >> - | 2 | 10 | 7 | 8 | 4 |
| | - >> - | 3 | 10 | 9 | 8 | 3 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 23 | 26 | 11 |

Παρατηρήσεις κατά την τοποθέτηση στο υπόστρωμα:

- 1) Στο δείγμα υγιών καρπών υπήρχαν 14 καρποί με εσωτερική κηλίδα και 2 με σκώρο οι οποίοι επισημάνθηκαν επάνω στα τριβλία.
- 2) Στο δείγμα με τους προσβεβλημένους υπήρχαν 7 με εσωτερική κηλίδα και 4 άσπερμοι, οι οποίοι επισημάνθηκαν στα τριβλία.
- 3) Το δείγμα μαζεύτηκε από τους σάκους συγκομιδής και επειδή υπήρχε μεγάλο ποσοστό προσβεβλημένων καρπών ήταν δύσκολο να διαχωριστούν εντελώς υγιείς καρποί.
- 4) Γενικά στο Κτήμα Δ υπήρχε μεγάλο % καρπών με πρόβλημα: μαζεύτηκαν περίπου 120 κιλά φιστίκι από 20 δένδρα και μετά την αποφλοιώση έμειναν περίπου 50 κιλά.

Παρατηρήσεις κατά την μέτρηση – υγιείς καρποί (Εικόνα Γ.2.15):

- 1) Σε όλους τους υγιείς καρπούς αναπτύχθηκε *A. flavus*.
- 2) Και στους 14 καρπούς με εσωτερική κηλίδα αναπτύχθηκε *A. flavus* όπως και σε αυτούς με το σκώρο. Το ίδιο και σε αυτούς με σχίσσιμο της φλούδας.
- 3) Οι μισοί από τους υγιείς είχαν ταυτόχρονα και *A.niger* εκ των οποίων οι 5 εμφάνιζαν εσωτερική κηλίδα.
- 4) Στον υγιή καρπό με το σκώρο δεν αναπτύχθηκε *A.niger* ούτε *A.carbonarius*.
- 5) Σε 5 από αυτούς αναπτύχθηκε *A.carbonarius*. Ο ένας καρπός είχε σχίσσιμο στην φλούδα και 3 έφεραν εσωτερική κηλίδα.

Παρατηρήσεις κατά την μέτρηση – προβληματικοί (Εικόνα Γ.2.14):

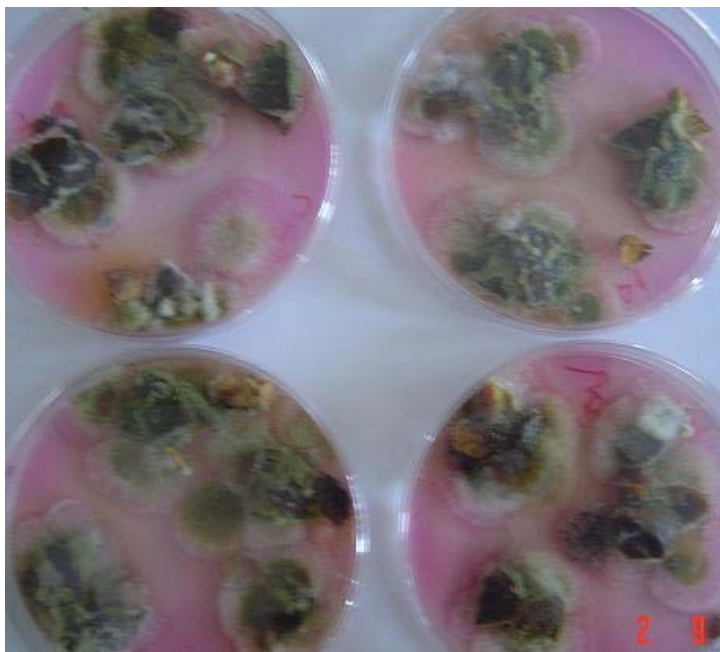
- 1) Σχεδόν σε όλους τους καρπούς (23 από 30) αναπτύχθηκε *A.flavus*.
- 2) Και στους 7 καρπούς με εσωτερική κηλίδα αναπτύχθηκε *A.flavus*, καθώς και στους 2 από τους 4 κούφιους.
- 3) Στους κούφιους καρπούς αναπτύχθηκε κυρίως *A.niger* και *A.carbonarius*.
- 4) Στους περισσότερους καρπούς (26 από 30) αναπτύχθηκε επίσης *A.niger* και περίπου στους μισούς (11 από 30) *A.carbonarius*.

Από τα παραπάνω και σε σχέση με τις προηγούμενες μετρήσεις του Κτήματος Δ φαίνεται ότι όσο ο καρπός πλησιάζει προς την ωρίμανση γίνεται πιο ευάλωτος στον αποικισμό από τους ασπέργιλλους.

Εικόνα Γ.2.14. Δείγμα Συγκομιδής από το Κτήμα Δ- Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στους προβληματικούς καρπούς



Εικόνα Γ.2.15. Δείγμα Συγκομιδής από το Κτήμα Δ- Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στους υγιείς καρπούς.



Γ.2. 4. Αποτελέσματα 4^{ης} δειγματοληψίας – Ξήρανση

Πίνακας Γ.2.6. 4^η Δειγματοληψία - Ξήρανση Κτήμα Α

| | |
|--|--------------|
| Δειγματοληψία: 1-9-08 | |
| Μόλυνση τριβλίων: 3(4) -9-08 | Επώαση: 25οC |
| Μέτρηση: Επέμβαση Κανονικό → 10-9-08 25% και 35% αλάτι → 12-9-08 | |

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
|---------------|------------------|-------------|---------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| Α (ΗΛΙΟΣ) | ΚΑΝΟΝΙΚΟ | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 8 | 1 |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 10 | 2 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 2 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 30 | 28 | 5 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 9 | 9 | 0 |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 9 | 1 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 29 | 28 | 1 |
| | 25% ΑΛΑΤΙ | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 10 | 4 |
| | - >> - | 2 | 10 | 9 | 10 | 1 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 1 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 29 | 30 | 6 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | - >> - | 2 | 10 | 9 | 10 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 9 | 10 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 28 | 30 | 0 |
| | 35% ΑΛΑΤΙ | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 10 | 1 |
| | - >> - | 2 | 10 | 9 | 10 | 1 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 3 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 29 | 30 | 5 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| - >> - | 2 | 10 | 10 | 10 | 0 | |
| - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 0 | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 30 | 30 | 0 | |

Παρατηρήσεις:

1) Δείγμα: ΚΑΝΟΝΙΚΟ

- Καλοί καρποί, καλά γεμάτοι, όλοι ανοιχτοί (Εικόνα Γ.2.16).
- Υπήρχαν 7 με εσωτερική κηλίδα (επισημάνθηκαν επάνω στα τριβλία) και σε όλους μετρήθηκε *A.flavus* και *A.niger*.
- Στο ΚΑΝΟΝΙΚΟ επικρατούσε ο *A.flavus* (Εικόνα Γ.2.17), ενώ στις επεμβάσεις με 25% και 35% αλάτι ήταν περίπου ίσοι αριθμητικά και ποσοτικά με τον *A.niger*.

2) Δείγμα: 25% αλάτι (Εικόνα Γ.2.18 α)

- Όλοι ανοιχτοί και δεν υπήρχαν καρποί με εσωτερική κηλίδα (εξάιρεση ένας).
- Ποσοτικά η ανάπτυξη του *A.flavus* και *A.niger* ήταν ίση.
- Μεμονωμένα, κάποιοι καρποί είχαν κυρίως *A.niger* και άλλοι κυρίως *A.flavus*.

3) 35% αλάτι (Εικόνα Γ.2.18 β)

- Όλοι οι καρποί ήταν ανοιχτοί, μεγάλοι και καλά γεμάτοι (Εικόνα Γ.2.16β)
- Επισημάνθηκαν 2 κλειστοί με κηλίδα και 6 καρποί με κηλίδα.
- Σε όλους αναπτύχθηκε *A.flavus* και *A.niger*.

Εικόνα Γ.2.16. Δείγμα Ξήρανσης Κτήματος Α –Κανονικοί (χωρίς άλας) και με 35% άλας.



(α)



(β)

**Εικόνα Γ.2.17. Ανάπτυξη *A.flavus* στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήματος Α –
Επέμβαση Κανονικοί (χωρίς αλάτι)**



**Εικόνα Γ.2.18. Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στο Δείγμα Ξήρανσης
Κτήματος Α – Επέμβαση 25% αλάτι (α) - Επέμβαση 35% αλάτι (β)**



(α)



(β)

Πίνακας Γ.2.7. 4^η Δειγματοληψία - Ξήρανση Κτήμα Β

| | |
|--|---------------------|
| Δειγματοληψία: 1-9-08 | |
| Μόλυνση τριβλίων: 3(4) -9-08 | Επώαση: 25oC |
| Μέτρηση: 8-9-08 και οι δύο επεμβάσεις | |

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
|---------------------------|-----------------|-------------|---------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Asperillus carbonarius</i> |
| Β (ΞΗΡΑ-ΝΤΗΡΙΟ) | ΚΑΝΟΝΙΚΟ | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 10 | 2 |
| | - >> - | 2 | 11 | 11 | 5 | 1 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 1 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 31 | 31 | 25 | 4 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 10 | 0 | 1 |
| | - >> - | 2 | 11 | 11 | 10 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 31 | 31 | 20 | 1 |
| | ΑΦΡΟΣ* | | | | | |
| | ΟΛΟΚΛΗΡΟ | 1 | 10 | 10 | 5 | 1 |
| | - >> - | 2 | 10 | 9 | 2 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 5 | 3 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 24 | 10 | 1 |

* Αφρός: καρποί που βγαίνουν μαζί με το νερό της αποφλοιώσης ως απορριπτόμενοι (μικροί, άσπερμοι, κλειστοί)

Παρατηρήσεις:Δείγμα : Κανονικό

- Στο δείγμα υπήρχε 1 καρπός με σκώρο και 6 με την εσωτερική κηλίδα, οι οποίοι σημειώθηκαν επάνω στα τριβλία.
- Ήταν πολύ καλοί καρποί γενικά και εύγευστοι αλλά μικροί (Εικόνα Γ.2.19)
- Σε όλους αναπτύχθηκε *A.flavus* και σε μεγάλο ποσοστό ο *A.niger* τόσο στην ψίχα όσο και στο κέλυφος. (Εικόνα Γ.2.21)
- Στον καρπό με το σκώρο αναπτύχθηκε *A.flavus*
- Στους μισούς καρπούς με εσωτερική κηλίδα αναπτύχθηκε *A.flavus* και *A.niger*.
- Σε έναν αναπτύχθηκε και *A.carbonarius*.

Δείγμα : «Αφρός»

- Στο δείγμα του αφρού υπήρχαν πολλά κλειστά ή μαύροι «ντυμένοι» καρποί (Εικόνα Γ.2.20).

- 2 κλειστοί καρποί είχαν εσωτερική κηλίδα εσωτερικά προς το σημείο του μίσχου.

-Υπήρχαν:

15 κούφιοι «ντυμένοι» (στους 9 μετρήθηκε *A.flavus* στους 8 *A.niger* και σε 1 *A. carbonarius*)

12 κλειστοί (Εικόνα Γ.2.22) (στους 11 μετρήθηκε *A.flavus* και σε 1 *A.niger*)

3 κούφιοι κλειστοί (στους 2 μετρήθηκε *A.flavus* και σε 1 *A.niger*)

- στους περισσότερους αναπτύχθηκε *A.flavus* (24 στους 30 καρπούς) και μόνο στους 10 καρπούς *A.niger*.

Εικόνα Γ.2.19. Δείγμα ΚΑΝΟΝΙΚΟ ξήρανσης από το Κτήμα Β πριν την τοποθέτηση στα τριβλία



Εικόνα Γ.2.20. Δείγμα «αφρού» από το Κτήμα Β πριν την τοποθέτηση στα τριβλία



Εικόνα Γ.2.21. Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στο Δείγμα Ξήρασης Κτήμα Β



Εικόνα Γ.2.22. Ανάπτυξη *A.flavus* στο Δείγμα Ξήρασης Κτήμα Β- «Αφρός» σε κλειστούς καρπούς



Πίνακας Γ.2.8. 4^η Δειγματοληψία - Ξήρανση Κτήμα Γ

| | |
|--|----------------------------|
| Δειγματοληψία: 1-9-08 | |
| Μόλυνση τριβλίων: 3(4) -9-08 | Επώαση: 25οC |
| Μέτρηση: Επέμβαση Λευκοί και με Κηλίδα → 10-9-08 | Επέμβαση Σκούροι → 12-9-08 |

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛ ΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | | |
|---------------|-----------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Asperillus carbonarius</i> | |
| Γ ΗΛΙΟΣ | ΑΠΟΞΗΡΑΜ ΛΕΥΚΟΙ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 10 | 1 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 6 | 9 | 1 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 8 | 10 | 4 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 24 | 29 | 6 | |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 6 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 9 | 10 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 25 | 30 | 0 | |
| | ΑΠΟΞΗΡΑΜ ΣΚΟΥΡΟΙ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 6 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 8 | 9 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 5 | 8 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 19 | 27 | 0 | |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 6 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 8 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 3 | 9 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 17 | 29 | 0 | |
| | ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΚΗΛΙΔΑ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 8 | 10 | 4 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 9 | 10 | 2 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 8 | 10 | 1 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 25 | 30 | 7 | |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 8 | 10 | 0 | |
| - >> - | 2 | 10 | 7 | 10 | 0 | | |
| - >> - | 3 | 10 | 8 | 10 | 0 | | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 23 | 30 | 0 | | |

Παρατηρήσεις:

1) Δείγμα : Λευκοί (Εικόνα Γ.2.23)

- Υπήρχαν 8 καρποί με εσωτερική κηλίδα (επισημάνθηκαν επάνω στα τριβλία –) στους 6 αναπτύχθηκε *A.flavus* στην ψίχα, στους 3 *A.niger* στην ψίχα και στο 1 *A.carbonarius*.

- Κυριαρχούσε ο *A.niger* ποσοτικά ειδικά στην 3η επανάληψη αν και αριθμητικά φαινόταν να είναι περίπου ίσοι (Εικόνα Γ.2.25).

- Υπήρχαν μεμονωμένοι καρποί με ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger*. (Εικόνα Γ.2.25)

2) Δείγμα : Σκούροι (ντυμένοι – κλειστοί) Εικόνα Γ.2.23

- Υπήρχαν 16 με εσωτερική κηλίδα ανοιχτοί, 4 «ντυμένοι» ανοιχτοί, 3 κλειστοί με εσωτερική κηλίδα και 1 «ντυμένος» και κλειστός. Όλοι επισημάνθηκαν ιδιαίτερα επάνω στα τριβλία.

- Γενικά σε όλους τους καρπούς τόσο στη ψίχα όσο και στο κέλυφος αναπτύχθηκε *A.niger*. (Εικόνα Γ.2.26)

- Στην 3η επανάληψη αν και φαίνεται αριθμητική υπεροχή του *A.niger*, υπήρχαν όμως μεμονωμένοι καρποί με μεγάλη ανάπτυξη του *A.flavus* (Εικόνα Γ.2.26). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη 2η επανάληψη.

- Στην 2η επανάληψη φαινόταν αριθμητικά και ποσοτικά να υπερισχύει ο *A.niger*.

3) Δείγμα : καρποί με Εσωτερική Κηλίδα (Εικόνα Γ.2.24)

Σχεδόν σε όλους αναπτύχθηκε *A.flavus* ενώ σε όλους αναπτύχθηκε *A.niger* τόσο στο κέλυφος όσο και στην ψίχα. Επίσης ιδιαίτερα στην 1^η επανάληψη αναπτύχθηκε και *A.carbonarius* στην ψίχα. (Εικόνα Γ.2.27)

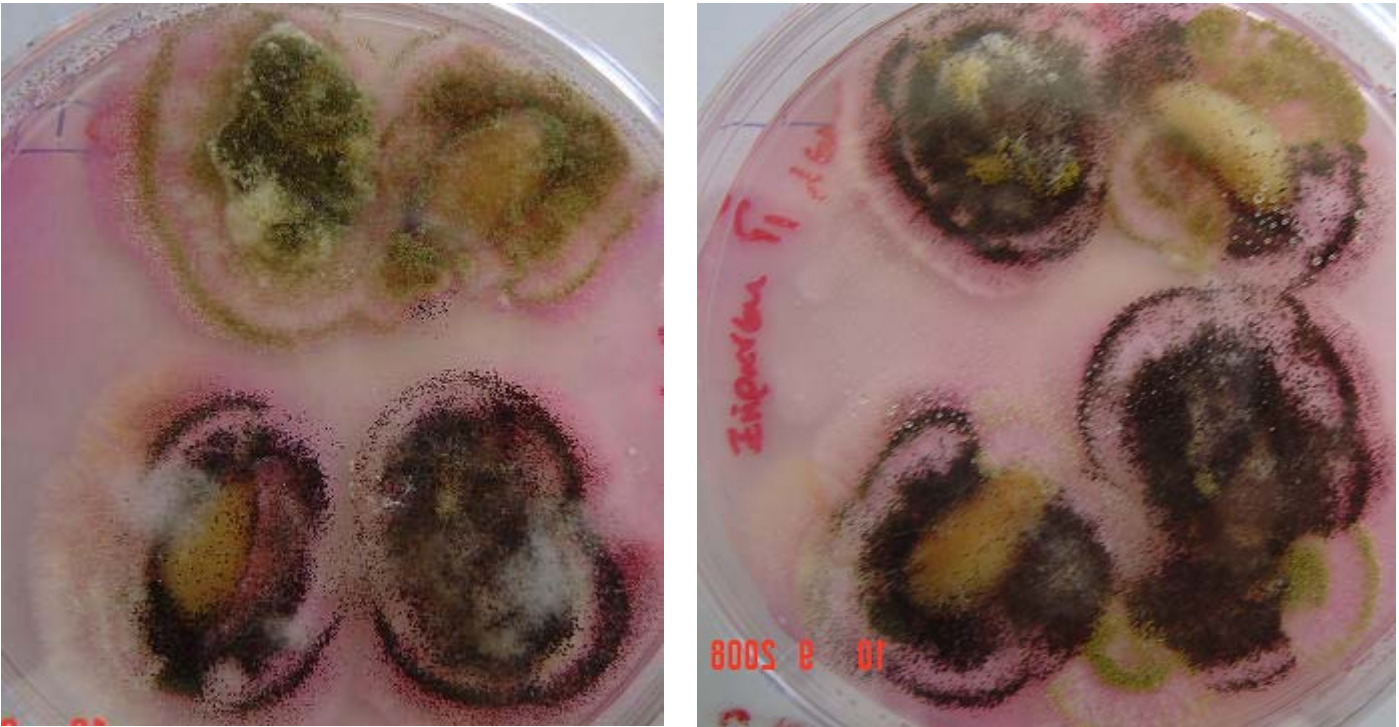
Εικόνα Γ.2.23. Καρποί Λευκοί και Σκούροι και με Κηλίδα από το Δείγμα Ξήρανσης του Κτήματος Γ



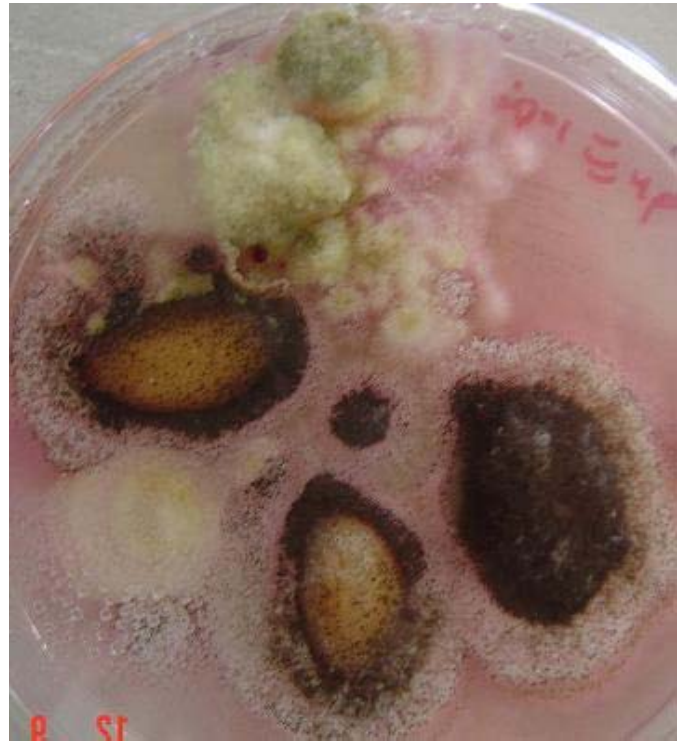
Εικόνα Γ.2.24. Καρποί με εσωτερική κηλίδα στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήμα Γ



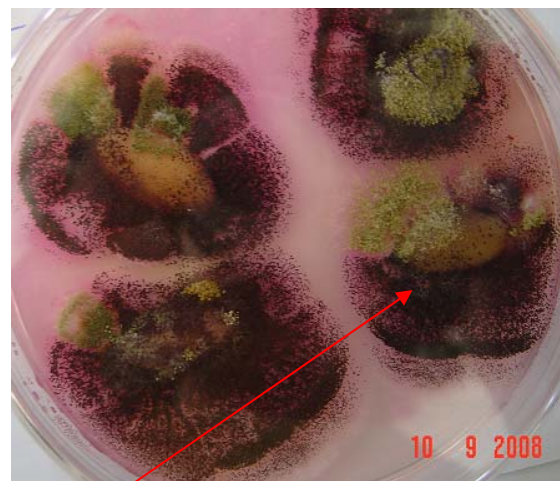
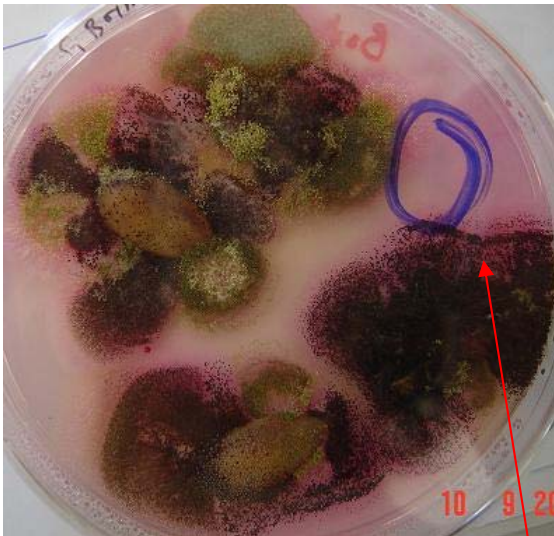
Εικόνα Γ.2.25. Ανάπτυξη *A.niger* και *A.flavus* στο Δείγμα Ξήρανσης-Λευκοί Κτήμα Γ



Εικόνα Γ.2.26. Ανάπτυξη *A.niger* στο Δείγμα Ξήρανσης-Σκούροι Κτήμα Γ



Εικόνα Γ.2.27. Ανάπτυξη *A.niger* και *A.flavus* στο Δείγμα Ξήρανσης- Καρποί με εσωτερική κηλίδα από το Κτήμα Γ



Μετρήθηκε και
A.carbonarius

Πίνακας Γ.2.9. 4^η Δειγματοληψία - Ξήρανση Κτήμα Δ

| | |
|---|---------------------|
| Δειγματοληψία: 1-9-08 | |
| Μόλυνση τριβλίων: 3(4) -9-08 | Επώαση: 25oC |
| Μέτρηση: Επέμβαση Κανονικό → 15-9-08 25% και 35% αλάτι →12-9-08 | |

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑ ΛΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | | |
|-------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Asperillus carbonarius</i> | |
| Δ ΗΛΙΟΣ | ΚΑΝΟΝΙΚΟ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 10 | 10 | 1 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 30 | 30 | 1 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 6 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 8 | 10 | 2 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 7 | 10 | 1 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 21 | 30 | 3 |
| | 25% ΑΛΑΤΙ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 5 | 10 | 4 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 7 | 10 | 3 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 7 | 10 | 6 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 19 | 30 | 13 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 2 | 10 | 1 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 7 | 10 | 2 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 3 | 10 | 1 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 12 | 30 | 4 |
| | 35% ΑΛΑΤΙ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 7 | 10 | 3 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 6 | 10 | 1 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 8 | 10 | 1 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 21 | 30 | 5 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 5 | 10 | 1 | |
| - >> - | 2 | 10 | 5 | 10 | 0 | | |
| - >> - | 3 | 10 | 5 | 10 | 1 | | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 15 | 30 | 2 | |

Παρατηρήσεις:

1) Δείγμα: ΚΑΝΟΝΙΚΟ (χωρίς εμβάπτιση με αλάτι)

- Οι καρποί ήταν πιο σκούροι και πιο μικροί σε σύγκριση με τα άλλα Κτήματα με εξαίρεση τους καρπούς από το Κτήμα Β
- Ήταν όλοι ανοιχτοί
- Υπήρχαν πολλοί καρποί με εσωτερική κηλίδα (19 στους 30) οι οποίοι επισημάνθηκαν ιδιαίτερα επάνω στα τριβλία.
- Η τελική μέτρηση έγινε στις 15/9/08 αλλά δεν είχε διαφορά και με αυτή στις 12/9/08 απλώς ήταν πιο ευδιάκριτη η ταυτοποίηση.
- Σε όλους τους καρπούς αναπτύχθηκε *A.niger* λίγο πιο γρήγορα από τον *A.flavus*.
- Αν και αριθμητικά ο *A.flavus* και *A.niger* ήταν ίσοι, ποσοτικά υπήρχε μια μικρή υπεροχή του *A.niger* ενώ ο *A.flavus* καθυστέρησε να αναπτυχθεί (Εικόνα Γ.2.28).
- Επίσης στην ψίχα φάνηκε να αναπτύσσεται περισσότερο ο *A.flavus*.

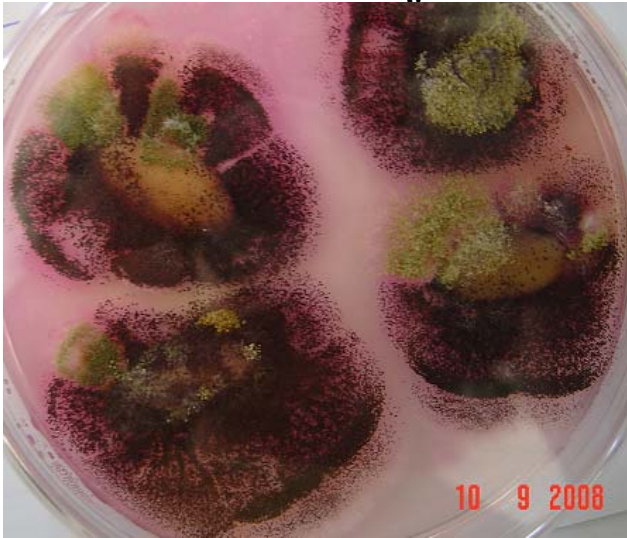
2) Δείγμα: 25% αλάτι

- Ήταν γενικά μικροί και σκούροι οι καρποί
- Στους 17 από 30 υπήρχε εσωτερική κηλίδα και επισημάνθηκαν ξεχωριστά επάνω στα τριβλία.
- Αναπτύχθηκε κυρίως *A.niger* και στους λιγότερο από τους μισούς ο *A.flavus*
- Ο *A.niger* κυριαρχούσε και αναπτύχθηκε γρηγορότερα (Εικόνα Γ.2.29). Μετρήθηκε και *A.carbonarius*.

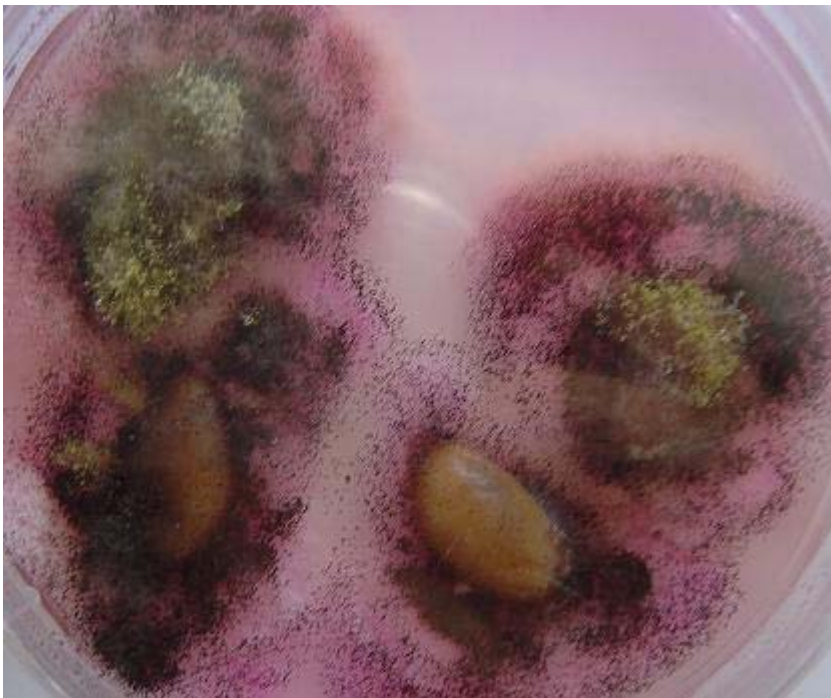
3) Δείγμα: 35% αλάτι

- Γενικά μικροί καρποί και σκούροι
- Υπήρχαν εσωτερικοί μεταχρωματισμοί
- Στους 19 από 30 υπήρχε εσωτερική κηλίδα (επισημάνθηκαν ιδιαίτερα).
- Σχεδόν σε όλους αυτούς που υπήρχε εσωτερική κηλίδα (17) αναπτύχθηκε *A.flavus* και σε όλους *A.niger* (Εικόνα Γ.2.30).
- Ο *A.niger* κυριαρχούσε και αναπτύχθηκε γρηγορότερα

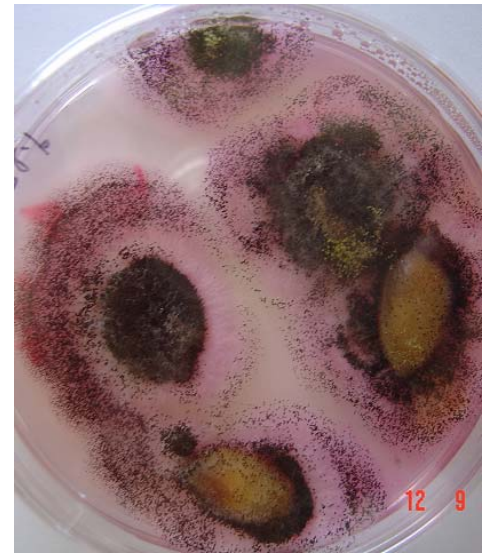
Εικόνα Γ.2.28. Ανάπτυξη *A.niger* και *A.flavus* στο Δείγμα Ξήρανσης-Κανονικοί από το Κτήμα Δ



Εικόνα Γ.2.29. Ανάπτυξη *A.niger* στο Δείγμα Ξήρανσης με 25% αλάτι από το Κτήμα Δ



Εικόνα Γ.2.30. Ανάπτυξη *A.niger* στο Δείγμα Ξήρανσης-35% αλάτι από το Κτήμα Δ



Γ.2. 5. Αποτελέσματα 5^{ης} δειγματοληψίας – Αποθήκευση

Πίνακας Γ.2.10. 5^η Δειγματοληψία - Αποθήκευση Κτήμα Α

| ΚΤΗΜΑ | | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛ ΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
|---------|---------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| | | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| Α | | ΚΑΝΟΝΙΚΟ | | | | | |
| (ΗΛΙΟΣ) | ΨΙΧΑ | | 1 | 10 | 9 | 10 | 3 |
| | - >> - | | 2 | 10 | 10 | 10 | 2 |
| | - >> - | | 3 | 10 | 10 | 9 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 29 | 29 | 5 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | | 1 | 10 | 9 | 10 | 0 |
| | - >> - | | 2 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | - >> - | | 3 | 10 | 10 | 9 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 29 | 29 | 0 |

Παρατηρήσεις:

- Στο Δείγμα Αποθήκευσης μετρήθηκε μόνο η επέμβαση «κανονικό» δηλαδή χωρίς άλας λόγω του ότι κλάπηκαν από την αποθήκη του παραγωγού.
- Το προϊόν ήταν αποθηκευμένο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε χώρο (δωμάτιο) που συνήθως ο παραγωγός αποθηκεύει το αποξηραμένο φιστίκι.
- Κατά την μέτρηση η γενική εικόνα στα τριβλία έδειχνε μια μικρή υπεροχή του *A.flavus* ιδιαίτερα στην 3η επανάληψη (Εικόνες Γ.2.31 & Γ.2.32).
- Υπήρχαν και 4 καρποί με εσωτερική κηλίδα. Σε αυτό το κτήμα δεν υπήρχαν πολλοί καρποί με εσωτερική κηλίδα όπως π.χ. στο Κτήμα Δ.
- *A.flavus* αναπτύχθηκε και από τους κλειστούς καρπούς.

Εικόνα Γ.2.31. Ανάπτυξη *A.flavus* στο Δείγμα Αποθήκευσης Κτήμα Α



Εικόνα Γ.3.32. Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στο Δείγμα Αποθήκευσης Κτήμα Α



Πίνακας Γ.2.11. 5^η Δειγματοληψία - Αποθήκευση Κτήμα Β

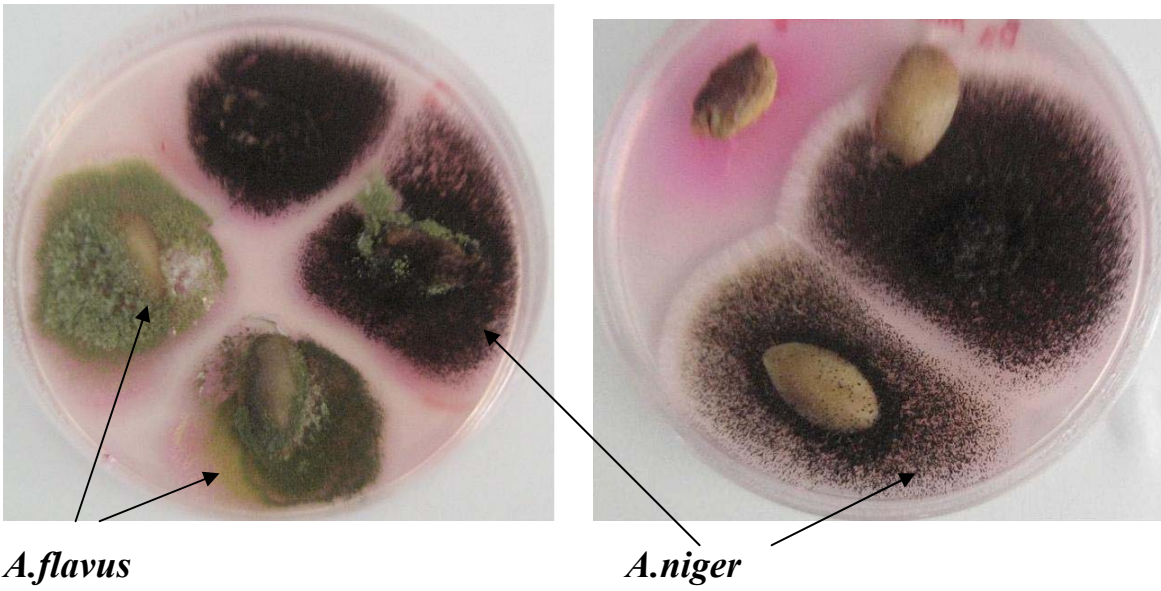
| | |
|--|---------------------|
| Δειγματοληψία: 16-10-08 Μόλυνση τριβλίων: 21-10- 08 Μέτρηση: 30-10-08 | Επώαση: 25oC |
|--|---------------------|

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝ ΑΛΗΨ ΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΠΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΠΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | |
|------------------------------|-----------------|---------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus carbonarius</i> |
| Β (ΞΗΡΑ ΝΤΗΡΙΟ) | ΚΑΝΟΝΙΚΟ | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 5 | 6 | 1 |
| | - >> - | 2 | 10 | 6 | 10 | 3 |
| | - >> - | 3 | 10 | 6 | 9 | 4 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 17 | 25 | 8 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 8 | 5 | 0 |
| | - >> - | 2 | 10 | 7 | 9 | 0 |
| | - >> - | 3 | 10 | 6 | 10 | 0 |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | 30 | 21 | 24 | 0 |

Παρατηρήσεις:

- Το δείγμα αποθήκευσης προήλθε από όλο το χωράφι, όχι μόνο από τα 20 σημασμένα δένδρα, διότι ο παραγωγός το εμπορεύθηκε.
- Η αποθήκευση του αποξηραμένου φιστικιού είχε γίνει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Το φιστίκι ήταν πολύ καλά αποξηραμένο διότι υπήρχε δυσκολία στο διαχωρισμό της ψίχας.
- Υπήρχαν μόνο 2 καρποί με εσωτερική κηλίδα. Επίσης και αυτό το Κτήμα δεν είχε καρπούς με εσωτερικές κηλίδες.
- Στην 1^η επανάληψη υπήρχαν 4 κλειστοί καρποί οι οποίοι τοποθετήθηκαν στα τριβλία. Σε έναν από αυτούς αναπτύχθηκε *A.flavus* στην ψίχα η οποία έφερε και εσωτερική κηλίδα. Επίσης σε 2 κελύφη από τους κλειστούς καρπούς αναπτύχθηκε *A.flavus* και σε 1 *A.niger* (Εικόνα Γ.2.33).

Εικόνα Γ.2.33. Ανάπτυξη *A.flavus* και *A.niger* στο Δείγμα Αποθήκευσης Κτήμα Β



Πίνακας Γ.2.12. 5^η Δειγματοληψία - Αποθήκευσης Κτήμα Δ

| | |
|--|--------------|
| Δειγματοληψία: 16-10-08 Μόλυνση τριβλίων: 30-10- 08 Μέτρηση: 5-11-08 | Επώαση: 25οC |
|--|--------------|

| ΚΤΗΜΑ | ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ | ΕΠΑΝΑΛ ΗΨΕΙΣ | ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΙΩΝ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΡΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΒΟΛΗ | | | |
|---------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| | | | | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Asperillus carbonarius</i> | |
| Δ ΗΛΙΟΣ | ΚΑΝΟΝΙΚΟ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 10 | 10 | 6 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 10 | 10 | 6 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 9 | 10 | 6 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 29 | 30 | 18 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 8 | 10 | 1 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 2 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 7 | 10 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 17 | 30 | 1 |
| | 25% ΑΛΑΤΙ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 8 | 10 | 4 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 5 | 10 | 7 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 7 | 10 | 6 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 20 | 30 | 17 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 4 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 2 | 10 | 0 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 6 | 10 | 0 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 12 | 30 | 0 |
| | 35% ΑΛΑΤΙ | | | | | | |
| | ΨΙΧΑ | 1 | 10 | 6 | 10 | 5 | |
| | - >> - | 2 | 10 | 8 | 10 | 4 | |
| | - >> - | 3 | 10 | 7 | 10 | 5 | |
| | ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 21 | 30 | 14 |
| | ΚΕΛΥΦΟΣ | 1 | 10 | 6 | 10 | 0 | |
| - >> - | 2 | 10 | 6 | 10 | 0 | | |
| - >> - | 3 | 10 | 3 | 10 | 0 | | |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 30 | 15 | 30 | 0 | |

Παρατηρήσεις:

- Τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε χώρο του παραγωγού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- Υπήρχε πολύ μεγάλη προσβολή από σκώρο (περιττώματα και προνύμφες) και άλλα έντομα αποθηκών.

1) ΚΑΝΟΝΙΚΟ

- Από τους 30 καρπούς οι 23 εμφάνιζαν εσωτερική κηλίδα. Δηλαδή σχεδόν όλοι οι καρποί είχαν εσωτερική κηλίδα στην ψίχα.
- Όλοι ήταν ανοιχτοί. Επίσης δεν φαίνονταν να είναι καλά αποξηραμένοι.
- Κατά την μέτρηση επικρατούσε ο *A.niger*. Αναπτύχθηκε και ο *A.flavus* ο οποίος αριθμητικά υπερίσχυε σε αυτή την επέμβαση σε σχέσεις με τις άλλες επεμβάσεις με αλάτι. (Εικόνα Γ.2.34)
- Αναπτύχθηκε και μετρήθηκε *A.carbonarius*.
- Η ύπαρξη και ανάπτυξη του *A.flavus* ήταν ανεξάρτητη με την ύπαρξη της κηλίδας.

2) Επέμβαση με 25% αλάτι

- Από τους 30 καρπούς οι 25 είχαν κηλίδα. Δηλαδή σχεδόν όλοι είχαν εσωτερική κηλίδα στην ψίχα.
- Ήταν όλοι ανοιχτοί.
- Κατά την μέτρηση επικρατούσε ξεκάθαρα ο *A.niger*. (Εικόνα Γ.2.35)
- Αναπτύχθηκε και μετρήθηκε *A.carbonarius*.
- Αναπτύχθηκε και μετρήθηκε *A.flavus* του οποίου η ύπαρξη ήταν ανεξάρτητη με την παρουσία της εσωτερικής κηλίδας.

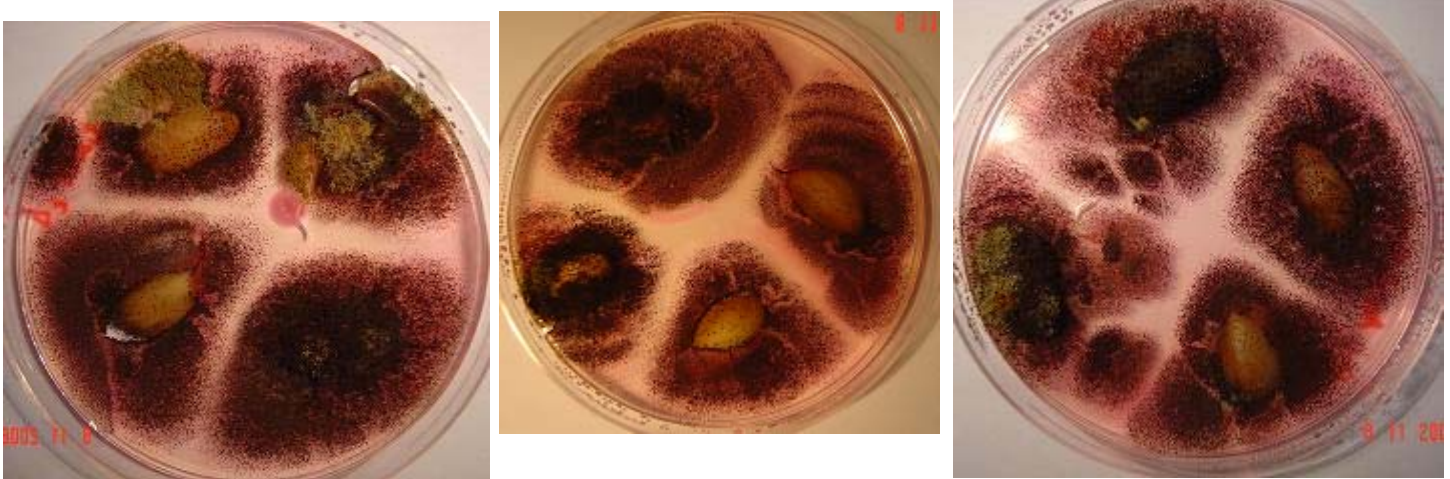
3) Επέμβαση με 35% αλάτι.

- Από τους 30 καρπούς οι 22 εμφάνιζαν εσωτερική κηλίδα.
- Ήταν όλοι ανοιχτοί
- Κατά το άνοιγμα, σε 3 καρπούς παρατηρήθηκαν περιττώματα σκώρου και σε έναν υπήρχε και η προνύμφη.
- Κατά την μέτρηση φαινόταν να επικρατούσε ο *A.niger*. (Εικόνα Γ.2.36)
- Η ύπαρξη του *A.flavus* ήταν ανεξάρτητη με την ύπαρξη της κηλίδας.
- Αναπτύχθηκε και μετρήθηκε *A.carbonarius*.

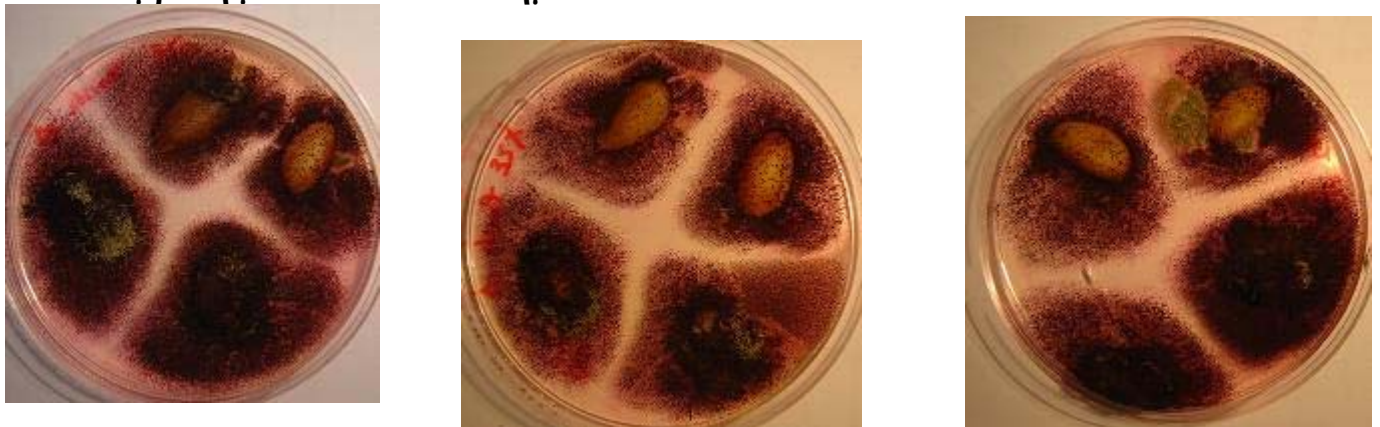
Εικόνα Γ.2.34. Ανάπτυξη *A.niger* και *A.flavus* στο Δείγμα Αποθήκευσης – Κανονικοί (χωρίς επέμβαση με αλάτι)- Κτήμα Δ



Εικόνα Γ.2.35. Ανάπτυξη *A.niger* και *A.flavus* στο Δείγμα Αποθήκευσης – Επέμβαση με 25% αλάτι Κτήμα Δ



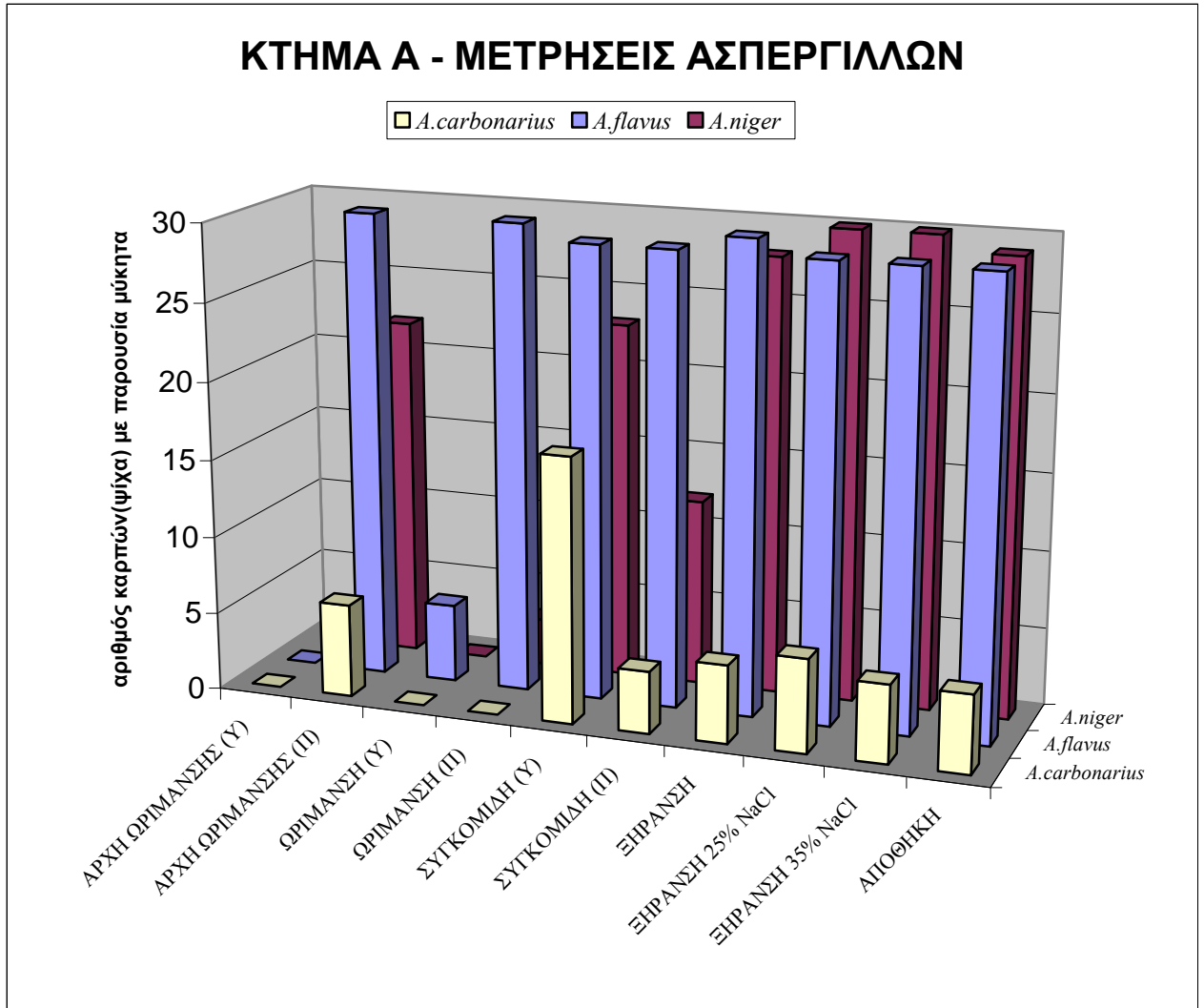
Εικόνα Γ.2.36. Ανάπτυξη *A.niger* και *A.flavus* στο Δείγμα Αποθήκευσης – Επέμβαση με 325% αλάτι Κτήμα Δ



Γ.2.6 Διαγραμματική απεικόνιση μετρήσεων ανα πειραματικό αγρό – Στατιστική ανάλυση

Γ.2.6.1 Κτήμα Α

Διάγραμμα Γ.2.6.1. Αριθμός φιστικιών (ψίχα) με παρουσία ασπεργίλλων στο Δείγμα Ταυτοποίησης-Κτήμα Α μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα



Παρατηρούμε ότι σε όλα τα στάδια γενικά ο *A.flavus* επικρατεί, αν και στη φάση της ξήρανσης υπάρχει στις επεμβάσεις με αλάτι μια μικρή υπεροχή του *A.niger*. Πριν τη συγκομιδή, στα δείγματα με τους προβληματικούς καρπούς φαίνεται να υπάρχει ισχυρή παρουσία του *A.flavus* σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα των υγιών καρπών.

Αυτή η εικόνα όμως αλλοιώνεται όσο πλησιάζει η συγκομιδή όπου η παρουσία του *A.flavus* είναι ισχυρή και στους φαινομενικά υγιείς καρπούς. Επιπλέον, η παρουσία του *A.niger* είναι σημαντική σε κάθε στάδιο.

Η ανάλυση παραλλακτικότητας για αυτό το κτήμα και για τις μετρήσεις του *A.flavus* έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των επεμβάσεων. Με τη δοκιμή Fisher (LSD) φαίνονται ποιοι μέσοι όροι διαφέρουν (Πίνακας Γ.2.6.1.).

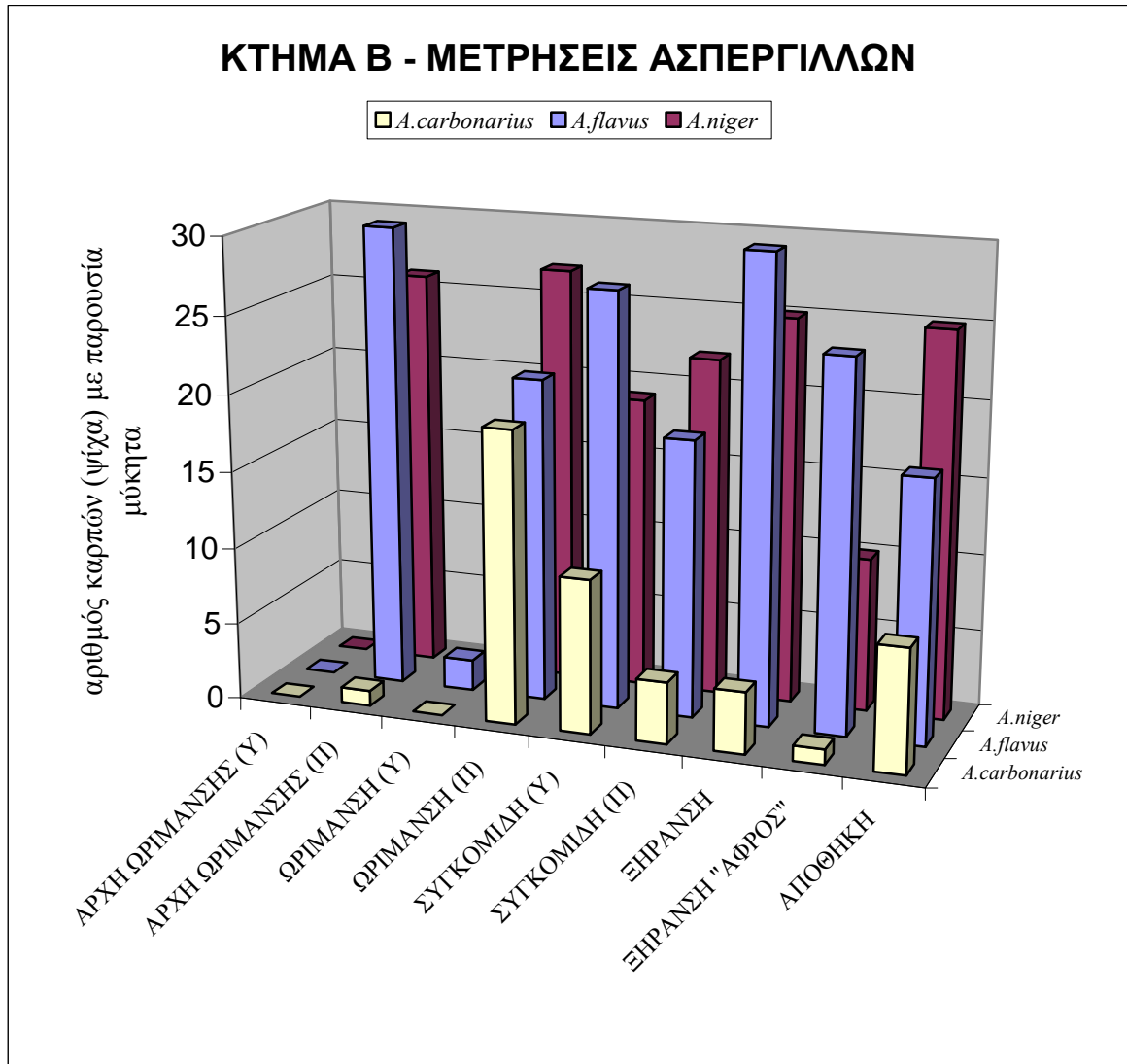
Πίνακας Γ.2.6.1. Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του *A.flavus* στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Α

| Στάδιο | Μέσος όρος | Ομοιογενείς ομάδες |
|--------------------------------|------------|--------------------|
| Αρχή ωρίμανσης (υγιείς) | 0,0 | X |
| Ωρίμανση (υγιείς) | 1,66667 | X |
| Συγκομιδή (προβληματικοί) | 9,66667 | X |
| Ξήρανση 35% NaCl | 9,66667 | X |
| Αποθήκη | 9,66667 | X |
| Συγκομιδή (υγιείς) | 9,66667 | X |
| Ξήρανση 25% NaCl | 9,66667 | X |
| Ξήρανση | 10,0 | X |
| Ωρίμανση (προβληματικοί) | 10,0 | X |
| Αρχή ωρίμανσης (προβληματικοί) | 10,0 | X |

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δείχνει ότι στατιστικά σημαντικά διαφέρουν μόνο τα δείγματα των υγιών καρπών στο στάδιο της αρχής της ωρίμανσης και στην ωρίμανση. Ακόμα και οι υγιείς καρποί στη συγκομιδή δεν διαφέρουν από τους προβληματικούς ή τους αποξηραμένους καρπούς. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι στο στάδιο της ξήρανσης ο *A.flavus* άργησε να εμφανιστεί στα τριβλία σε σχέση με τα στάδια πριν τη συγκομιδή. Αυτό υποθέτει είτε πολύ μικρό πληθυσμό είτε ότι τα κύτταρα του μύκητα είχαν υποστεί ζημιά.

Γ.2.6.2 Κτήμα Β

Διάγραμμα Γ.2.6.2. Αριθμός φιστικιών (ψίχα) με παρουσία ασπεργίλλων στο Δείγμα Ταυτοποίησης του Κτήματος Β μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα



Και σε αυτό τον πειραματικό αγρό παρατηρούμε μία κυριαρχία του *A.flavus* σε κάθε στάδιο. Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά της παρουσίας του *A.flavus* όσο και του *A.niger* στους προβληματικούς καρπούς σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα των υγιών καρπών πριν τη συγκομιδή. Η διαφορά αυτή όμως φαίνεται να εκμηδενίζεται όσο πλησιάζει η συγκομιδή. Παρόμοια ήταν εικόνα αυτή και στον προηγούμενο

πειραματικό αγρό. Επίσης σημαντική είναι η παρουσία του *A.flavus* και στα στάδια μετά τη συγκομιδή (ξήρανση – αποθήκευση).

Πίνακας Γ.2.6.2. Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του *A.flavus* στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Β

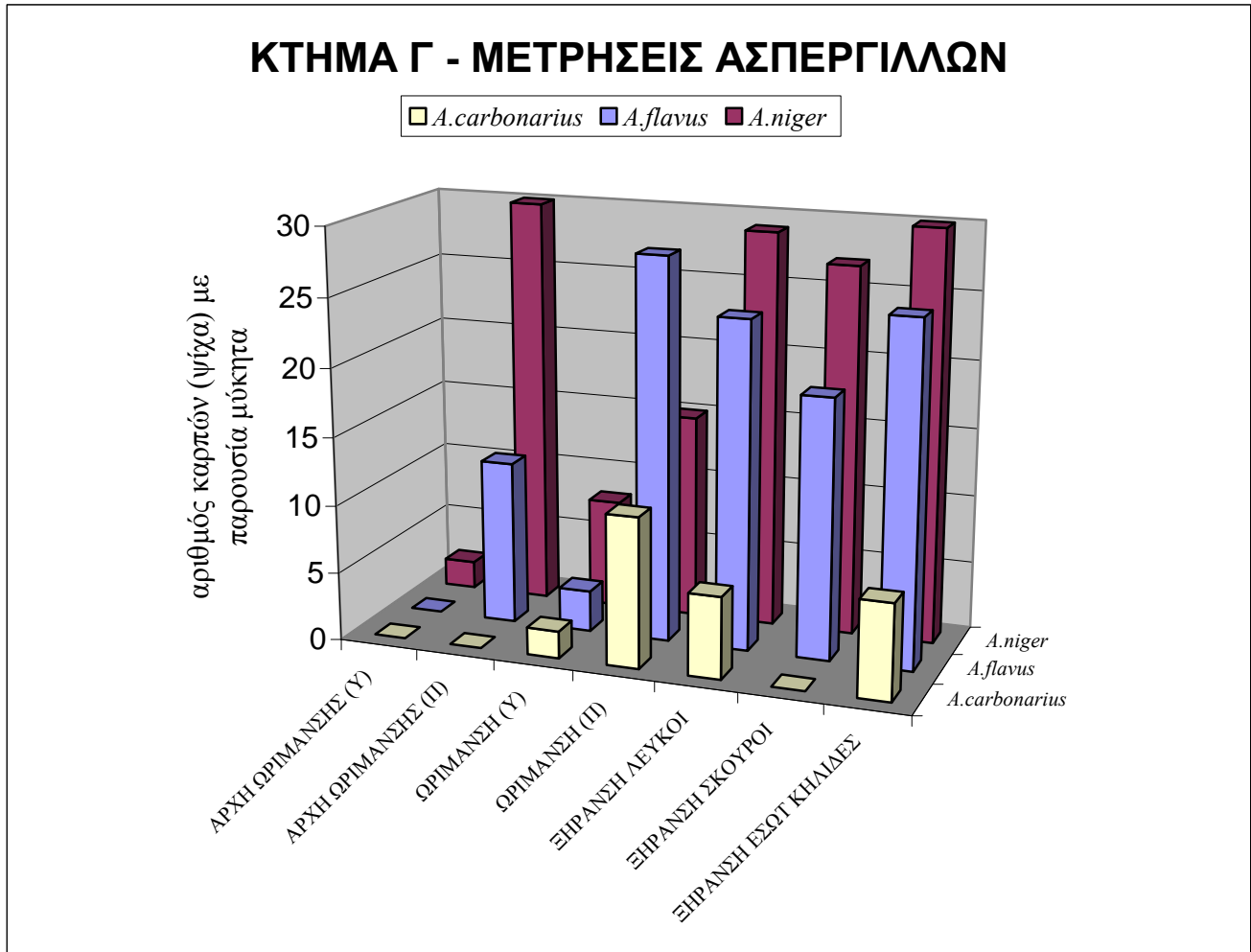
| <i>Στάδια</i> | <i>Μέσος Όρος</i> | <i>Ομοιογενείς ομάδες</i> |
|--------------------------------|-------------------|---------------------------|
| Αρχή ωρίμανσης (υγιείς) | 0,0 | X |
| Ωρίμανση (υγιείς) | 0,666667 | X |
| Αποθήκη | 5,66667 | X |
| Συγκομιδή (προβληματικοί) | 6,0 | X |
| Ωρίμανση (προβληματικοί) | 7,0 | XX |
| Ξήρανση «αφρός» | 8,0 | XX |
| Συγκομιδή (υγιείς) | 9,0 | XX |
| Ξήρανση | 10,0 | X |
| Αρχή ωρίμανσης (προβληματικοί) | 10,0 | X |

Γ.2.6.3 Κτήμα Γ

Και σε αυτό τον πειραματικό αγρό φαίνεται ότι στα πρώτα στάδια ωρίμανσης ο *A.flavus* αλλά και οι άλλοι ασπέργιλλοι βρίσκονται στους προβληματικούς καρπούς. Όσο πλησιάζει η συγκομιδή τους βρίσκουμε και στους υγιείς καρπούς αλλά όχι στον ίδιο βαθμό όσο στους προσβεβλημένους. Υπάρχει επίσης στους καρπούς και μετά την ξήρανση, Βέβαια, η μέτρηση έγινε πολύ αργότερα (10 ημέρες μετά την τοποθέτηση στα τριβλία) διότι η ανάπτυξή τους καθυστέρησε σημαντικά σε σχέση με τα άλλα στάδια. Επίσης, η παρουσία του *A.niger* ακολουθεί παρόμοια πορεία με αυτή του *A.flavus*.

Στα παραπάνω δεδομένα έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA για τον *A.flavus* στα διάφορα στάδια. Η στατιστική αυτή επεξεργασία έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στους μέσους όρους και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας Γ.2.6.3) φαίνεται ποια στάδια διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς την παρουσία του *A.flavus*.

Διάγραμμα Γ.2.6.3. Αριθμός φιστικιών (ψίγα) με παρουσία ασπεργίλλων στο Δείγμα Ταυτοποίησης- ΚτήμαΓ μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα



Πίνακας Γ.2.6.3. Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του *A. flavus* στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Γ

| ΣΤΑΔΙΑ | Μέσος όρος | Ομοιογενείς ομάδες |
|----------------------------------|------------|--------------------|
| Αρχή ωρίμανσης (υγιείς) | 0,0 | X |
| Ωρίμανση(υγιείς) | 1,0 | X |
| Αρχή ωρίμανσης (προβληματικοί) | 4,0 | X |
| Ξήρανση «σκούροι» | 6,33333 | XX |
| Ξήρανση «λευκοί» | 8,0 | XX |
| Αποξηραμένοι με εσωτερική κηλίδα | 8,33333 | XX |
| Ωρίμανση προβληματικοί | 9,33333 | X |

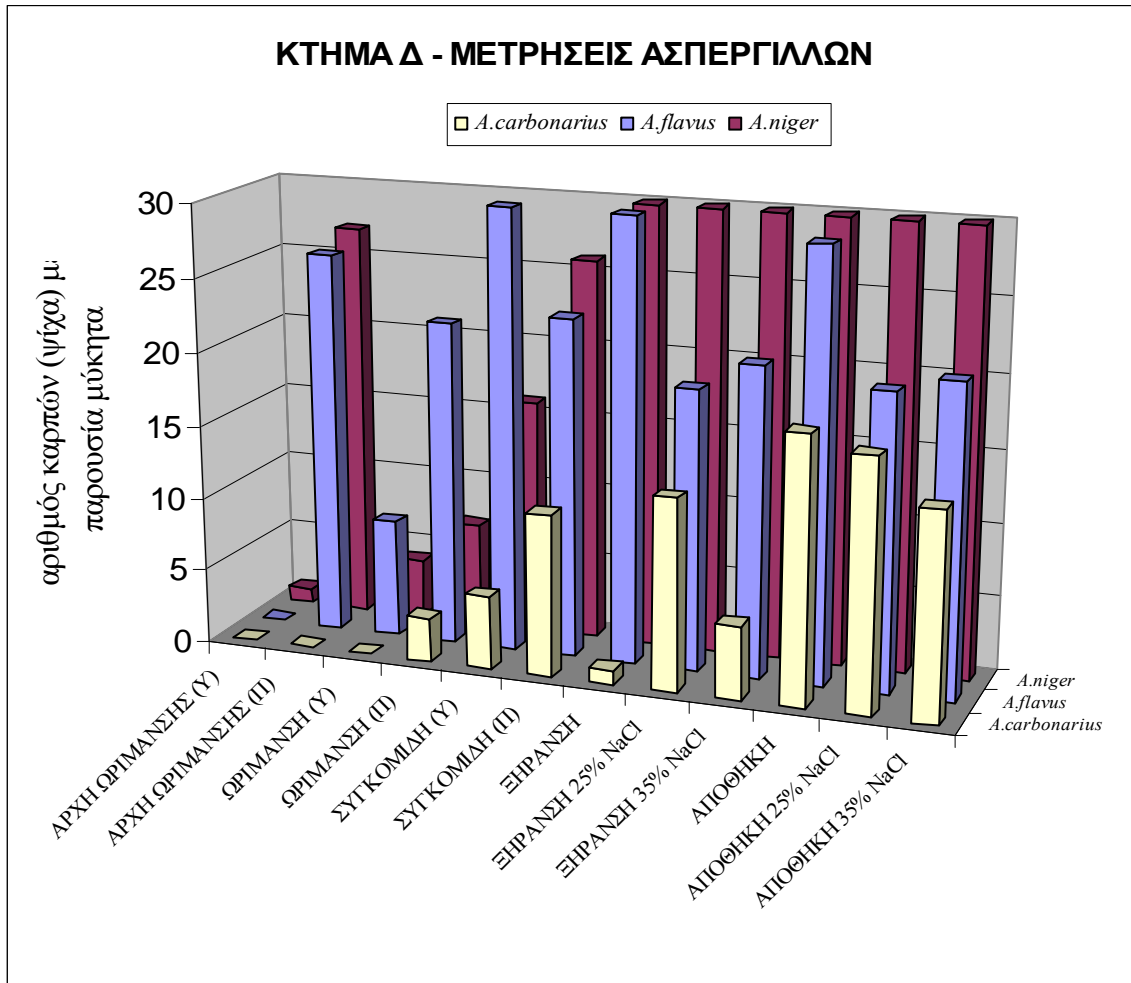
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι μόνο οι υγιείς καρποί στα στάδια «αρχή ωρίμανσης» και «ωρίμανση» διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τα υπόλοιπα στάδια. Οι διάφοροι τύποι αποξηραμένων φιστικιών «σκούρου», «λευκοί» και με εσωτερικές κηλίδες δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Επίσης, σημαντική είναι η παρουσία του *A.flavus* στους αποξηραμένους καρπούς με εσωτερική κηλίδα, ασθένεια η οποία αναφέρεται ως στιγματομύκωση²² και η οποία οφείλεται στον μύκητα *Nematospora colryli* και φαίνεται να συνδέεται με προσβολές από έντομα της τάξης Hemiptera^{22,29}. Το ίδιο ισχύει και για την παρουσία του *A.niger* στους καρπούς αυτούς.

Γ.2.6.4 Κτήμα Δ

Σε αυτό τον πειραματικό αγρό η παρουσία του *A.flavus* αλλά και του *A.niger* είναι επίσης σημαντική, ιδιαίτερα στους προβληματικούς καρπούς. Η ανάλυση παραλλακτικότητα (ANOVA) έδειξε ότι υπάρχει διαφορά στους μέσους των διαφόρων σταδίων, οπότε με τη δοκιμή Fisher (Πίνακας Γ.2.6.4) φαίνεται ποιες επεμβάσεις διαφέρουν. Το δείγμα του σταδίου της συγκομιδής δεν διαφέρει από το στάδιο της ξήρανσης και της αποθήκης ως προς την παρουσία του *A.flavus*. Βέβαια η παρουσία του *A.flavus* είχε σημαντική καθυστέρηση σε σχέση με το στάδιο της συγκομιδής. Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν υπάρχουν μεταξύ των επεμβάσεων με 25% και 35% σε NaCl τόσο κατά την ξήρανση όσο και κατά την αποθήκευση. Αντίθετα φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της επέμβασης με NaCl και του δείγματος της ξήρανσης χωρίς την επέμβαση με NaCl. Δεν ισχύει το ίδιο για την αποθήκευση.

Γενικά η παρουσία του *A.flavus* όσο και του *A.niger* είναι σημαντική σε όλα τα στάδια παραγωγής και μεταποίησης του φιστικιού.

Διάγραμμα Γ.2.6.4. Αριθμός φιστικιών (ψίχα) ασπεργίλλων στο Δείγμα Ταυτοποίησης- Κτήμα Δ μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα



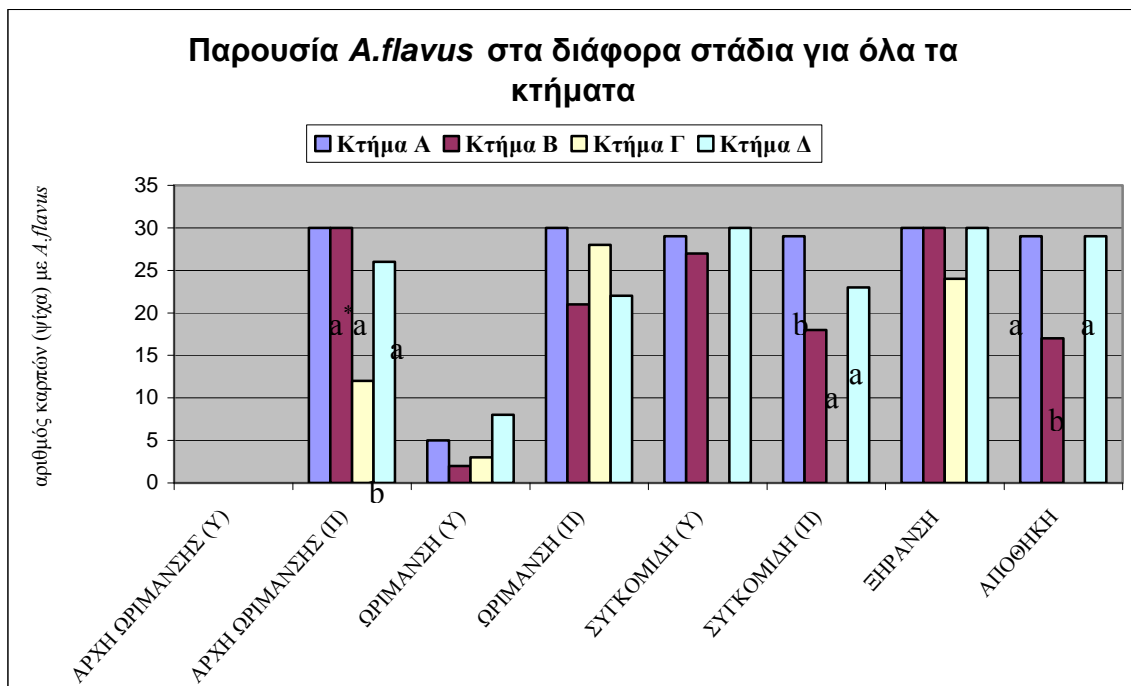
Πίνακας Γ.2.6.4. Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του A.flavus στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Δ

| ΣΤΑΔΙΑ | Μέσοι όροι | Ομοιογενείς ομάδες |
|--------------------------------|------------|--------------------|
| Αρχή ωρίμανσης (υγιείς) | 0,0 | X |
| Ωρίμανση (υγιείς) | 2,66667 | X |
| Ξήρανση 25% NaCl | 6,33333 | X |
| Αποθήκη 25% | 6,66667 | XX |
| Αποθήκη 35% | 7,0 | XX |
| Ξήρανση 35% NaCl | 7,0 | XX |
| Ωρίμανση (προβληματικοί) | 7,33333 | XX |
| Συγκομιδή (προβληματικοί) | 7,66667 | XXX |
| Αρχή ωρίμανσης (προβληματικοί) | 8,66667 | XXX |
| Αποθήκη | 9,66667 | XX |
| Ξήρανση | 10,0 | X |
| Συγκομιδή (υγιείς) | 10,0 | X |

Γ.2.6.5 Όλα τα Κτήματα

Στο παρακάτω διάγραμμα (Γ.2.6.5) φαίνεται η παρουσία του *A.flavus* σε όλα τα στάδια (δειγματοληψίες) από όλα τους πειραματικούς αγρούς για να γίνουν τυχόν συγκρίσεις.

Διάγραμμα Γ.2.6.5. Αριθμός φιστικιών (ψίχα) με παρουσία *A.flavus* στα Δείγματα Ταυτοποίησης σε κάθε δειγματοληψία – Σύγκριση όλων των κτημάτων



* Στατιστική επεξεργασία ANOVA. Όπου τα γράμματα είναι τα ίδια δεν υπάρχει μεταξύ των κτημάτων στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τον αριθμό των καρπών (ψίχα) που εμφανίστηκε *A.flavus*. Στο δείγμα ωρίμανσης υγιείς και προβληματικοί, στο συγκομιδής υγιείς και ξήρανση δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όπως φαίνεται, στο πρώτο στάδιο «αρχή ωρίμανσης» σε κανένα πειραματικό αγρό δεν υπήρχε *A.flavus* στο δείγμα των υγιών καρπών, ενώ στους προβληματικούς καρπούς σε όλα τα κτήματα η παρουσία του ήταν ισχυρή. Μεταξύ των κτημάτων υπήρχε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στο Κτήμα Γ όπου η παρουσία του ήταν μικρότερη. Αν και σε αυτό το Κτήμα (Γ) η εικόνα του ως προς το ποσοστό προβληματικών καρπών ήταν πολύ άσχημη (πολλοί καρποί χτυπημένοι από το

έντομο *Eurytomus plotnikovi*, εγκαταλελειμένος αγρός, δεν ποτιζόταν) σε αυτό το στάδιο, η παρουσία του *A.flavus* ήταν μικρότερη σε σχέση με τα άλλα κτήματα. Αντίθετα, η παρουσία του *A.niger* ήταν πολύ υψηλή όπως φαίνεται στο διάγραμμα Γ.2.6.3. Βέβαια, η διαφορά αυτή του Κτήματος Γ στα υπόλοιπα στάδια δεν υφίσταται.

Στο στάδιο της ωρίμανσης σε όλα τα κτήματα στο δείγμα των υγιών καρπών αρχίζει να εμφανίζεται ο *A.flavus* χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κτημάτων. Στο δείγμα των προβληματικών, η παρουσία σε όλα τα κτήματα η παρουσία του *A.flavus* είναι σημαντική και μεγαλύτερη από το δείγμα των υγιών. Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κτημάτων δεν υπάρχει.

Στο στάδιο της συγκομιδής, η παρουσία του *A.flavus* είναι ίση τόσο στους υγιείς όσο και στους προβληματικούς. Στο στάδιο αυτό το Κτήμα Α και Δ διαφέρει ως προς το Κτήμα Α κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στο στάδιο της ξήρανσης, ενώ στο στάδιο της αποθήκευσης η παρουσία του *A.flavus* στο Κτήμα Β είναι σημαντικά χαμηλότερη. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι καρποί του Κτήματος Β είχαν αποθηκευθεί σε ψυγείο-αποθήκη σε θερμοκρασία 5-7°C και 45-60% υγρασία. Στα υπόλοιπα κτήματα (Α και Δ) είχαν αποθηκευθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ιδιωτικό αποθηκευτικό χώρο.

Επίσης, στο στάδιο της ξήρανσης σε όλα τα κτήματα, η παρουσία του *A.flavus* μετρήθηκε 7-12 ημέρες περίπου μετά την τοποθέτηση των καρπών στο θρεπτικό υπόστρωμα διότι υπήρχε μία καθυστέρηση στην εμφάνισή τους. Τελικά όμως, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των κτημάτων. Επιπλέον, φαίνεται να μην υπάρχει διαφορά ως προς την παρουσία του μύκητα με βάση τη μέθοδο ξήρανσης δεδομένου ότι τα φιστίκια από το Κτήμα Β αποξηράνθηκαν σε ξηραντήριο.

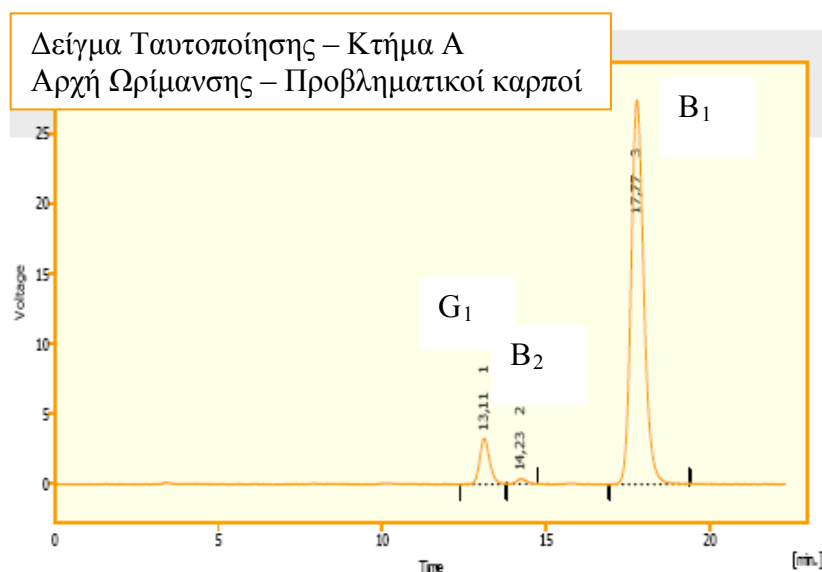
Γ.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΕ HPLC ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ

Τα υπόλοιπα μισά από τους καρπούς που τοποθετήθηκαν στα τριβλία κρατήθηκαν στην κατάψυξη και ελέγχθηκαν ως προς την ύπαρξη αφλατοξίνης. Στόχος αυτής της ανάλυσης ήταν να συνδεθεί η μικροβιολογική εικόνα με την ποσότητα σε αφλατοξίνη. Οι αναλύσεις έγιναν με HPLC με τη μεθοδολογία που παρουσιάστηκε στην Ενότητα Β. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας Γ.3.1 έως Γ.3.4), αντίστοιχα διαγράμματα (Διάγραμμα Γ.3.1 έως και Γ.3.4) και χρωματογραφήματα για κάθε πειραματικό αγρό ξεχωριστά. Στο Παράρτημα 5 επισυνάπτονται όλα τα χρωματογραφήματα όλων των αναλύσεων για κάθε δείγμα και κάθε επανάληψη.

3.1. Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Α

Το χρωματογράφημα από το Κτήμα Α - Δείγμα Ταυτοποίησης από την 1^η Δειγματοληψία (Αρχή Ωρίμανσης) από τους προβληματικούς καρπούς. Υπάρχει πολύ καλός διαχωρισμός των αφλατοξινών με την B₁ ποσοτικά να κυριαρχεί.

Εικόνα Γ.3.1 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος Ταυτοποίησης από το Κτήμα Α – 1^η Δειγματοληψία (Αρχή ωρίμανσης : 31-7-08) προβληματικοί καρποί

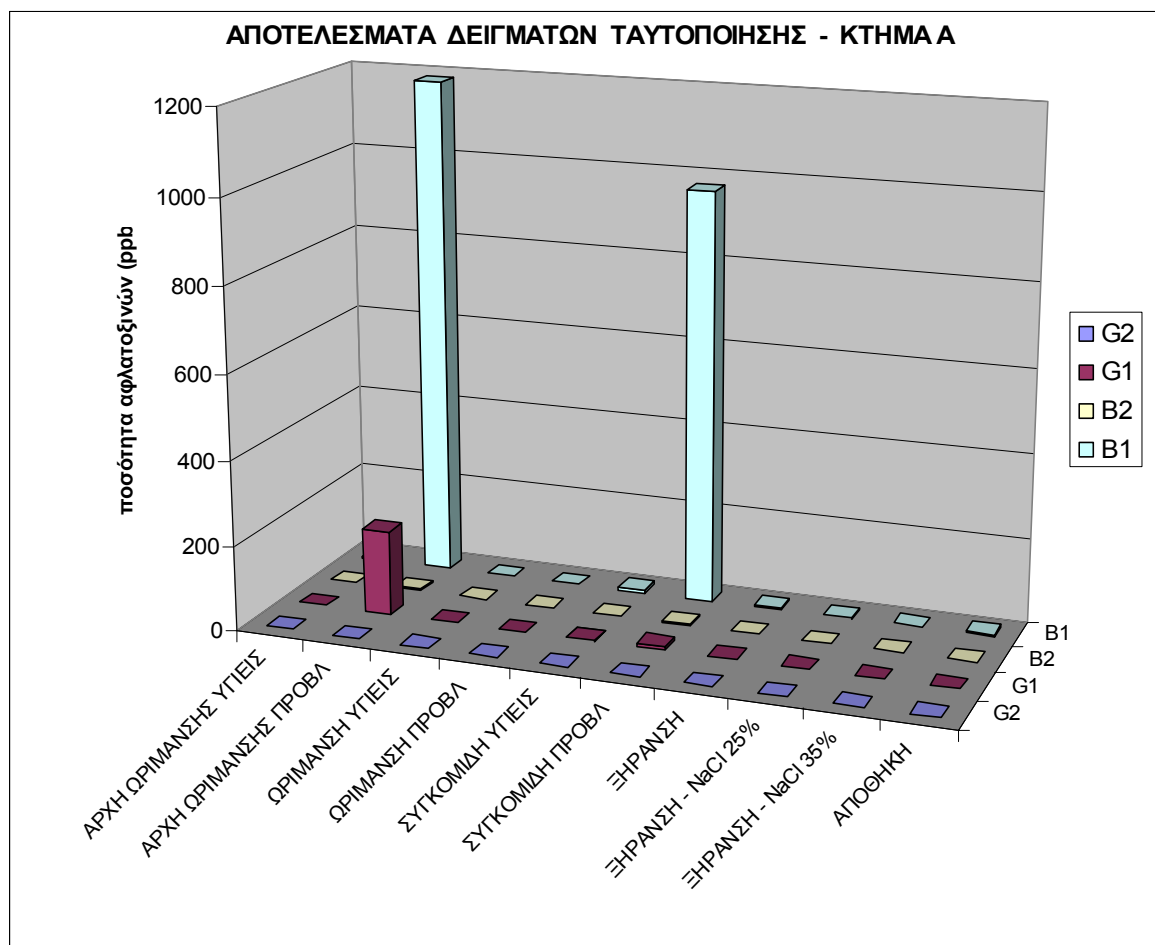


Πίνακας Γ.3.1.Α Κτήμα Α - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Α | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,69 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,78 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,74 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,06</i> |
| RSDr | | | | <i>3,47</i> |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ* | 0,00 | 196,77 | 4,18 | 1187,31 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 200,53 | 4,18 | 1176,79 |
| M.O. | 0,00 | 198,65 | 4,18 | 1182,05 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>2,65</i> | <i>0,00</i> | <i>7,44</i> |
| RSDr | | <i>1,34</i> | <i>0,09</i> | <i>0,63</i> |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 2,29 | 0,76 | 7,85 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 1,56 | 0,59 | 8,64 |
| M.O. | 0,00 | 1,92 | 0,68 | 8,24 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,52</i> | <i>0,12</i> | <i>0,56</i> |
| RSDr | | <i>26,97</i> | <i>18,13</i> | <i>6,83</i> |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 8,82 | 2,16 | 964,86 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 10,18 | 2,05 | 982,53 |
| M.O. | 0,00 | 9,50 | 2,11 | 973,70 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,96</i> | <i>0,07</i> | <i>12,50</i> |
| RSDr | | <i>10,07</i> | <i>3,46</i> | <i>1,28</i> |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,00 | 1,34 | 0,57 | 5,02 |
| | 0,00 | 0,87 | 0,55 | 5,03 |
| M.O. | 0,00 | 1,11 | 0,56 | 5,03 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,33</i> | <i>0,01</i> | <i>0,01</i> |
| RSDr | | <i>29,96</i> | <i>1,57</i> | <i>0,11</i> |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25%* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,71 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,64 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,67 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,05</i> |
| RSDr | | | | <i>1,79</i> |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,99 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,56 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,77 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,30</i> |
| RSDr | | | | <i>16,88</i> |
| ΑΠΟΘΗΚΗ* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,93 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,18 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,56 |
| Sr | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,00</i> | <i>0,53</i> |
| RSDr | | | | <i>11,65</i> |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

Διάγραμμα Γ.3.1. Κτήμα Α - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης



Πίνακας Γ.3.1.Β. Κτήμα Α – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη *A.flavus* και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Α | Αριθμός φιστικιών με παρουσία <i>A.flavus</i> (σύνολο καρπών:30) | B1 αφλατοξίνη (ppb) | συνολική αφλατοξίνη (ppb) |
|--------------------|--|---------------------|---------------------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ (Υ) | 0 | 1,74 | 1,74 |
| - >> - (Π) | 30 | 1182,05 | 1384,88 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ (Υ) | 5 | 0,00 | 0,00 |
| - >> - (Π) | 30 | 0,00 | 0,00 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ (Υ) | 29 | 8,24 | 10,84 |
| - >> - (Π) | 29 | 973,70 | 985,30 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 30 | 5,03 | 6,69 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% | 29 | 2,67 | 2,67 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% | 29 | 1,77 | 1,77 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 29 | 4,56 | 4,56 |

Γ.3.1.1 Συζήτηση - Κτήμα Α Δείγματα Ταυτοποίησης

Από το παραπάνω διάγραμμα και τους πίνακες φαίνεται ότι πριν τη συγκομιδή η μεγαλύτερη ποσότητα αφλατοξίνης βρέθηκε στα δείγματα των προβληματικών καρπών στο στάδιο αρχή ωρίμανσης και συγκομιδής (Εικόνα Γ.2.8). Βέβαια και το δείγμα συγκομιδής με τους υγιείς καρπούς είχε αφλατοξίνη πάνω από το νομοθετικά θεσπισμένο όριο των 2ppb για την Β₁ και 4ppb για το σύνολο των αφλατοξινών αλλά συγκριτικά πολύ χαμηλότερο από το αντίστοιχο δείγμα των προβληματικών καρπών στο οποίο ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη 500-600 φορές πάνω από το όριο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με την εικόνα της ανάπτυξης του *A.flavus* στο εκλεκτικό υπόστρωμα (Εικόνες Γ.2.1, Γ.2.2) όπου στους υγιείς καρπούς δεν αναπτύχθηκε καθόλου *A.flavus* (αρχή ωρίμανσης). Αν και στο δείγμα συγκομιδής εμφανίστηκε *A.flavus* αριθμητικά ίσος με το αντίστοιχο δείγμα των προβληματικών καρπών δεν αναπτύχθηκε αφλατοξίνη. Βέβαια η ανάπτυξη του *A.flavus* στους προβληματικούς καρπούς ήταν μεγαλύτερη (Εικόνες Γ.2.9. και Γ.2.10).

Μετά τη συγκομιδή, τόσο στην ξήρανση όσο και στην αποθήκη ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη στους καρπούς των δειγμάτων ταυτοποίησης. Στην ξήρανση, όσον αφορά την εφαρμογή με το αλάτι, αφλατοξίνη ανιχνεύθηκε και στα δείγματα με 25% και 35% αλλά φαίνεται να υπάρχει μια διαφορά σε σχέση με το κανονικό. Κατά την μέτρηση της εμφάνισης του *A.flavus* στα τριβλία φαινόταν να επικρατεί στο κανονικό δείγμα σε σχέση με αυτά των 25% και 35% με αλάτι.

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι σε όλα τα δείγματα της ξήρανσης αλλά και της αποθήκης υπήρχε μία μεγάλη καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ασπεργίλλων σε σχέση με την ανάπτυξή τους στο δείγμα συγκομιδής (Πίνακας Γ.2.6., Γ.2.10). Αυτό υποδεικνύει ότι μετά την ξήρανση είτε υπάρχει μία κατάσταση μη ευνοϊκή για την ανάπτυξη του μύκητα είτε ο αριθμός τους είναι πολύ μικρός ή έχει υποστεί ζημιά.

Γενικότερα, από τις 4 αφλατοξίνες επικρατεί η Β₁ με σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες.

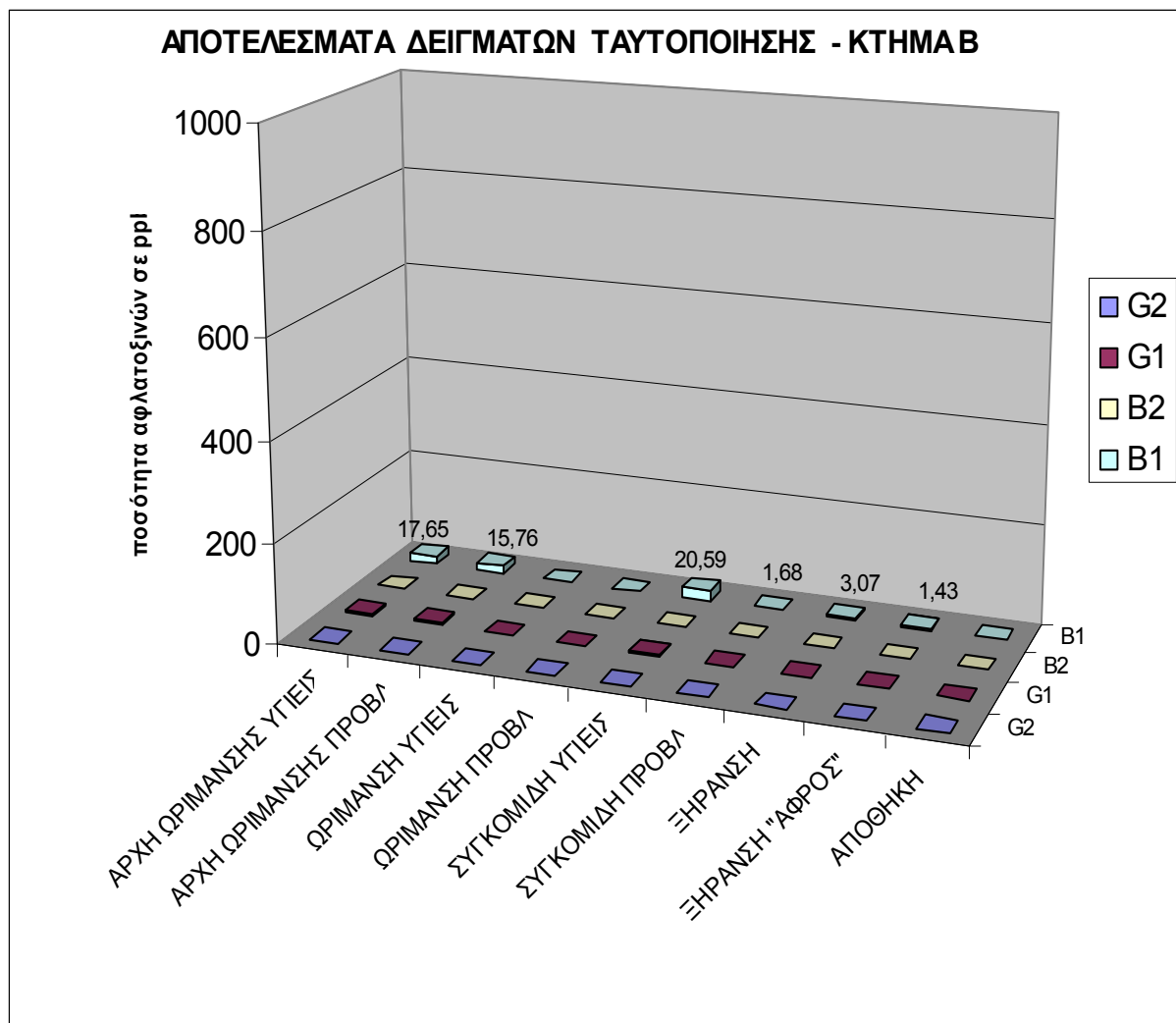
Γ.3.2. Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Β

Πίνακας Γ.3.2.Α. Κτήμα Β - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης Δειγμάτων Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Β | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ* | 0,00 | 2,70 | 0,00 | 18,51 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 2,94 | 0,00 | 16,78 |
| M.O. | 0,00 | 2,82 | 0,00 | 17,65 |
| Sr | 0,00 | 0,17 | 0,00 | 1,22 |
| RSDr | | 6,03 | | 6,92 |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ* | 0,00 | 6,04 | 0,68 | 15,53 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 7,85 | 0,32 | 15,98 |
| M.O. | 0,00 | 6,94 | 0,50 | 15,76 |
| Sr | 0,00 | 1,28 | 0,26 | 0,32 |
| RSDr | | 18,44 | 51,18 | 2,03 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 3,49 | 1,24 | 21,61 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 3,60 | 1,09 | 19,58 |
| M.O. | 0,00 | 3,55 | 1,17 | 20,59 |
| Sr | 0,00 | 0,07 | 0,11 | 1,43 |
| RSDr | | 2,09 | 9,07 | 6,96 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,62 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,73 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,68 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,08 |
| RSDr | | | | 4,60 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,21 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,92 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,07 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,20 |
| RSDr | | | | 6,61 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,66 |
| "ΑΦΡΟΣ" | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,20 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,43 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 |
| RSDr | | | | 22,84 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| RSDr | | | | |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

Διάγραμμα Γ.3.2. Κτήμα Β - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης Δειγμάτων Ταυτοποίησης



Πίνακας Γ.3.2.Β. Κτήμα Β – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη *A.flavus* και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Β | Αριθμός φιστικιών με παρουσία <i>A.flavus</i> (σύνολο καρπών:30) | B1 αφλατοξίνη (ppb) | συνολική αφλατοξίνη (ppb) |
|--------------------|--|---------------------|---------------------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ (Υ) | 0 | 17,65 | 20,47 |
| - >> - (ΙΙ) | 30 | 15,76 | 23,20 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ (Υ) | 2 | 0,00 | 0,00 |
| - >> - (ΙΙ) | 21 | 0,00 | 0,00 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ (Υ) | 27 | 20,59 | 25,31 |
| - >> - (ΙΙ) | 18 | 1,68 | 1,68 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 30 | 3,07 | 3,07 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ "ΑΦΡΟΣ" | 24 | 1,43 | 1,43 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 17 | 0,00 | 0,00 |

Γ.3.2.1 Συζήτηση - Κτήμα Β Δείγματα Ταυτοποίησης

Σε αυτό τον πειραματικό αγρό, οι καρποί του δείγματος ταυτοποίησης από το στάδιο «αρχή ωρίμανσης, συγκομιδής και ξήρανσης περιείχαν αφλατοξίνη πάνω από το όριο. Συνολικά όμως σε αυτό το κτήμα δεν ανιχνεύθηκαν πολύ υψηλά επίπεδα αφλατοξινών σε κανένα στάδιο. Θα πρέπει να ληφθεί υπ'όψιν ότι αυτός ο πειραματικός αγρός ήταν σε πολύ καλή κατάσταση γενικά από πλευράς τόσο προσβολών όσο και καλλιέργειας (Πίνακας Γ.1.2).

Από τον πίνακα και το διάγραμμα φαίνεται ότι στο δείγμα του σταδίου «αρχή ωρίμανσης» αφλατοξίνη ανιχνεύθηκε τόσο στους προβληματικούς όσο και στους υγιείς καρπούς, αν και στο τελευταίο δεν μετρήθηκε *A.flavus* κατά την τοποθέτηση των καρπών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Αυτή η αντιφατική εικόνα μπορεί να οφείλεται α) στο ότι η μέτρηση των τριβλίων έγινε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή (4 ημέρες μετά το plating) και η εικόνα των τριβλίων σε μεταγενέστερο χρόνο είναι άγνωστη για τους υγιείς καρπούς (μπορεί να αναπτύχθηκε αργότερα *A.flavus*) β) σε πιθανή επιμόλυνσή τους με τους προβληματικούς κατά την περίοδο αποθήκευσης μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση γ) σε διαχειριστικό λάθος των δειγμάτων κατά την ανάλυση. Η β) περίπτωση μπορεί να θεωρηθεί μάλλον απίθανη λόγω του ότι το κάθε δείγμα αποθηκευόταν ξεχωριστά σε κατάψυξη στους -18°C και έβγαине από εκεί την ημέρα της ανάλυσης. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να επαναληφθεί και διερευνηθεί περαιτέρω.

Στους καρπούς του δείγματος ταυτοποίησης από τη συγκομιδή προσδιορίστηκε αφλατοξίνη στους υγιείς καρπούς. Βέβαια, κατά τη συλλογή του δείγματος συγκομιδής έχει αναφερθεί ότι ο διαχωρισμός των υγιών από προβληματικούς ήταν δύσκολος σε αυτό το στάδιο, λόγω του ότι όλοι οι καρποί είχαν υποστεί τραυματισμούς από τη συγκομιδή. Επιπλέον, από τον Πίνακα Γ.3.2.Β φαίνεται ότι και στην μέτρηση στα τριβλία, ο *A.flavus* κυριαρχούσε στους υγιείς καρπούς σε σχέση με τους προβληματικούς όπου επικρατούσε κυρίως ο *A.niger*. (Παρατηρήσεις στην μέτρηση Πίνακας Γ.2.4., Εικόνες Γ.2.12. και Γ.2.13). Επιπλέον, θα πρέπει να αξιολογηθεί και το είδος των καρπών που υπήρχε στο δείγμα των προβληματικών καρπών (Εικόνα Γ.2.11) Και στα δύο δείγματα υπήρχαν καρποί χτυπημένοι από τη συγκομιδή αλλά στους προβληματικούς υπήρχαν και άσπερμοι (κούφιοι), οι οποίοι εξαιρούνταν από την ανάλυση λόγω του ότι δεν υπήρχε ψίχα. Από κάθε δείγμα οι

άσπερμοι καρποί έχουν διαχωριστεί και κρατηθεί στην κατάψυξη για περαιτέρω μελέτη και ανάλυση.

Μετά τη συγκομιδή, στη ξήρανση ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη αλλά πολύ λιγότερη από αυτό του δείγματος στη συγκομιδή (ξήρανση σε ξηραντήριο). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το δείγμα της ξήρανσης όσο και της αποφλοίωσης δεν προήλθε από τα 20 δένδρα του πειραματικού αγρού, αλλά από το σύνολο του κτήματος λόγω αδυναμίας του παραγωγού να διαχωρίσει στον ξηραντήρα τη συγκομισμένη παραγωγή των 20 δένδρων.

Στο δείγμα «αφρού» (αποξηραμένοι καρποί σε ξηραντήριο από τον «αφρό» της αποφλοίωσης) (Εικόνα Γ.2.20) όπου οι περισσότεροι καρποί ήταν είτε κλειστοί είτε άσπερμοι δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από το όριο. Άλλωστε και αριθμητικά ο *A.flavus* κατά την μέτρηση ήταν λιγότερος στο δείγμα του «αφρού» από αυτό της ξήρανσης. Στην αποθήκη δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη αλλά και η ανάπτυξη του *A.flavus* στους καρπούς φαίνεται να είναι περιορισμένη (Πίνακας Γ.3.2.B). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παραγωγή αυτού του κτήματος φυλασσόταν σε αποθήκη-ψυγείο σε θερμοκρασία 5-7°C και 45-60% σχετική υγρασία.

Γενικότερα και σε αυτό το κτήμα, από τις 4 αφλατοξίνες επικρατεί η B₁ με σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες.

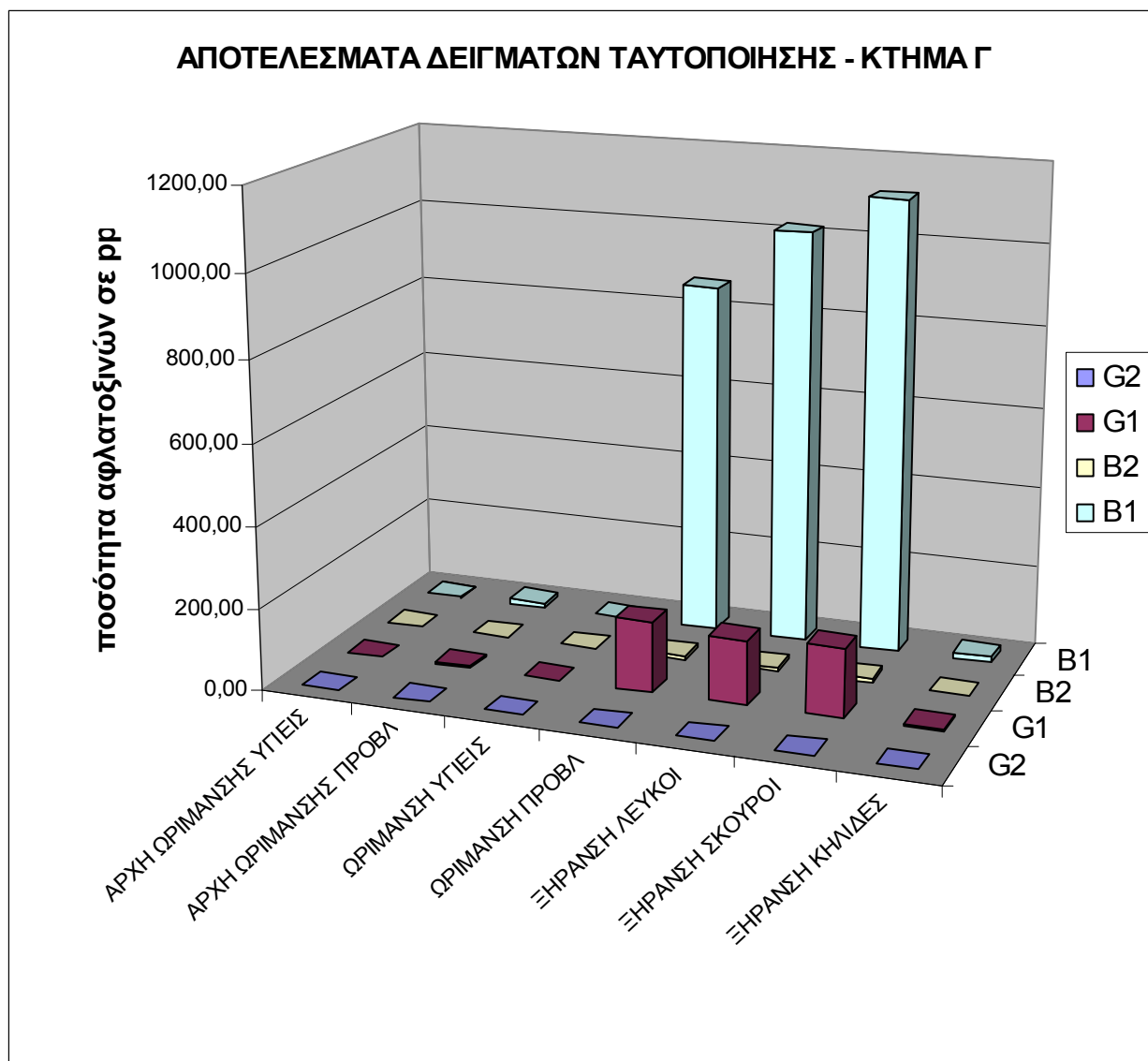
Γ.3.3. Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Γ

Πίνακας Γ.3.3.Α. Κτήμα Γ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης Δειγμάτων Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Γ | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,73 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,79 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,76 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,04 |
| RSDr | | | | 5,74 |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ* | 0,00 | 3,35 | 0,39 | 12,74 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 5,69 | 0,31 | 12,61 |
| M.O. | 0,00 | 4,52 | 0,35 | 12,67 |
| Sr | 0,00 | 1,66 | 0,05 | 0,09 |
| RSDr | | 36,68 | 14,72 | 0,73 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 167,85 | 8,80 | 870,88 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ* | 0,00 | 178,27 | 8,95 | 866,00 |
| M.O. | 0,00 | 173,06 | 8,88 | 868,44 |
| Sr | 0,00 | 7,37 | 0,10 | 3,45 |
| RSDr | | 4,26 | 1,16 | 0,40 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,00 | 158,22 | 9,41 | 1019,88 |
| ΛΕΥΚΟΙ | 0,00 | 156,49 | 9,32 | 1022,04 |
| M.O. | 0,00 | 157,36 | 9,37 | 1020,96 |
| Sr | 0,00 | 1,22 | 0,07 | 1,53 |
| RSDr | | 0,78 | 0,74 | 0,15 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,00 | 168,30 | 11,39 | 1134,60 |
| ΣΚΟΥΡΟΙ | 0,00 | 165,48 | 10,97 | 1098,17 |
| M.O. | 0,00 | 166,89 | 11,18 | 1116,39 |
| Sr | 0,00 | 1,99 | 0,30 | 25,76 |
| RSDr | | 1,19 | 2,69 | 2,31 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,95 | 5,67 | 1,07 | 14,76 |
| ΚΗΛΙΔΕΣ | 0,45 | 5,85 | 1,21 | 14,37 |
| | 0,64 | 5,68 | 0,80 | 13,34 |
| M.O. | 0,55 | 5,76 | 1,01 | 13,85 |
| Sr | 0,13 | 0,12 | 0,29 | 0,73 |
| RSDr | 24,21 | 2,00 | 29,08 | 5,24 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

Διάγραμμα Γ.3.3. Κτήμα Γ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης Δειγμάτων Ταυτοποίησης



Πίνακας Γ.3.3.Β. Κτήμα Γ – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη *A.flavus* και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Γ | Αριθμός φιστικιών με παρουσία <i>A.flavus</i> (σύνολο καρπών:30) | B1 αφλατοξίνη (ppb) | συνολική αφλατοξίνη (ppb) |
|--------------------|--|---------------------|---------------------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ (Υ) | 0 | 0,76 | 0,76 |
| - >> - (Π) | 12 | 12,67 | 17,54 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ (Υ) | 3 | 0,00 | 0,00 |
| - >> - (Π) | 28 | 868,44 | 1050,38 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ ΛΕΥΚΟΙ | 24 | 1020,96 | 1187,69 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ ΣΚΟΥΡΟΙ | 19 | 1116,39 | 1294,45 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ ΚΗΛΙΔΕΣ | 25 | 13,85 | 21,17 |

Γ.3.3.1 Συζήτηση - Κτήμα Γ Δείγματα Ταυτοποίησης

Σε αυτό τον πειραματικό αγρό, οι καρποί από τα δείγματα ταυτοποίησης είχαν πολύ υψηλό ποσό αφλατοξίνης σε όλα τα δείγματα με εξαίρεση αυτά των υγιών καρπών των πρώτων σταδίων (αρχή ωρίμανσης, ωρίμανση). Αυτό έρχεται σε αντιστοιχία με τη γενικότερη προβληματική κατάσταση του φιστικεώνα όσον αφορά τις έντονες προσβολές και την εγκατάλειψη της καλλιέργειας (Πίνακας Γ.1.3) Και εδώ είναι σαφής η εικόνα ότι τα υψηλά ποσά αφλατοξίνης συνδέονται με τους προβληματικούς καρπούς πριν τη συγκομιδή.

Στο στάδιο «αρχή ωρίμανσης» η παρουσία του *A.flavus* είναι υποδεέστερη αυτή του *A.niger* (Πίνακας Γ.2.1, Εικόνα Γ.2.3) ενώ στο στάδιο «ωρίμανση» έχει σημαντική παρουσία ο *A.flavus*, ο οποίος και επικρατεί. Σε αντιστοιχία, η αφλατοξίνη που ανιχνεύθηκε από το δείγμα του σταδίου ωρίμανσης ήταν πολύ περισσότερη, 400 φορές περίπου πάνω από το όριο.

Στο δείγμα της ξήρανσης έγινε ένας διαχωρισμός όσον αφορά το εξωτερικό χρώμα των αποξηραμένων στον ήλιο καρπών (Εικόνα Γ.2.23). Το ποσό της αφλατοξίνης που προσδιορίστηκε ήταν πολύ υψηλό και στα δύο. Σε αντιστοιχία, η παρουσία του *A.flavus* ήταν σημαντική και στα δύο δείγματα αν και στους πιο σκούρους φάνηκε μια υπεροχή στην ανάπτυξη του *A.niger* (Εικόνες Γ.2.25 και Γ.2.26).

Στο δείγμα ταυτοποίησης των καρπών με εσωτερική κηλίδα (Εικόνα Γ.2.24), η παρουσία του *A.flavus* ήταν σημαντική (Εικόνα Γ.2.27) και το ποσό αφλατοξίνης που ανιχνεύθηκε ήταν περίπου 20ppb. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι καρποί αυτοί όπως και οι υπόλοιποι της ξήρανσης εξωτερικά φαίνονταν υγιείς.

Γενικότερα και σε αυτό το κτήμα, από τις 4 αφλατοξίνες επικρατεί η B₁ με σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες.

Γ.3.4 Αποτελέσματα αναλύσεων – Κτήμα Δ

Πίνακας Γ.3.4.Α. Κτήμα Δ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης Δειγμάτων Ταυτοποίησης

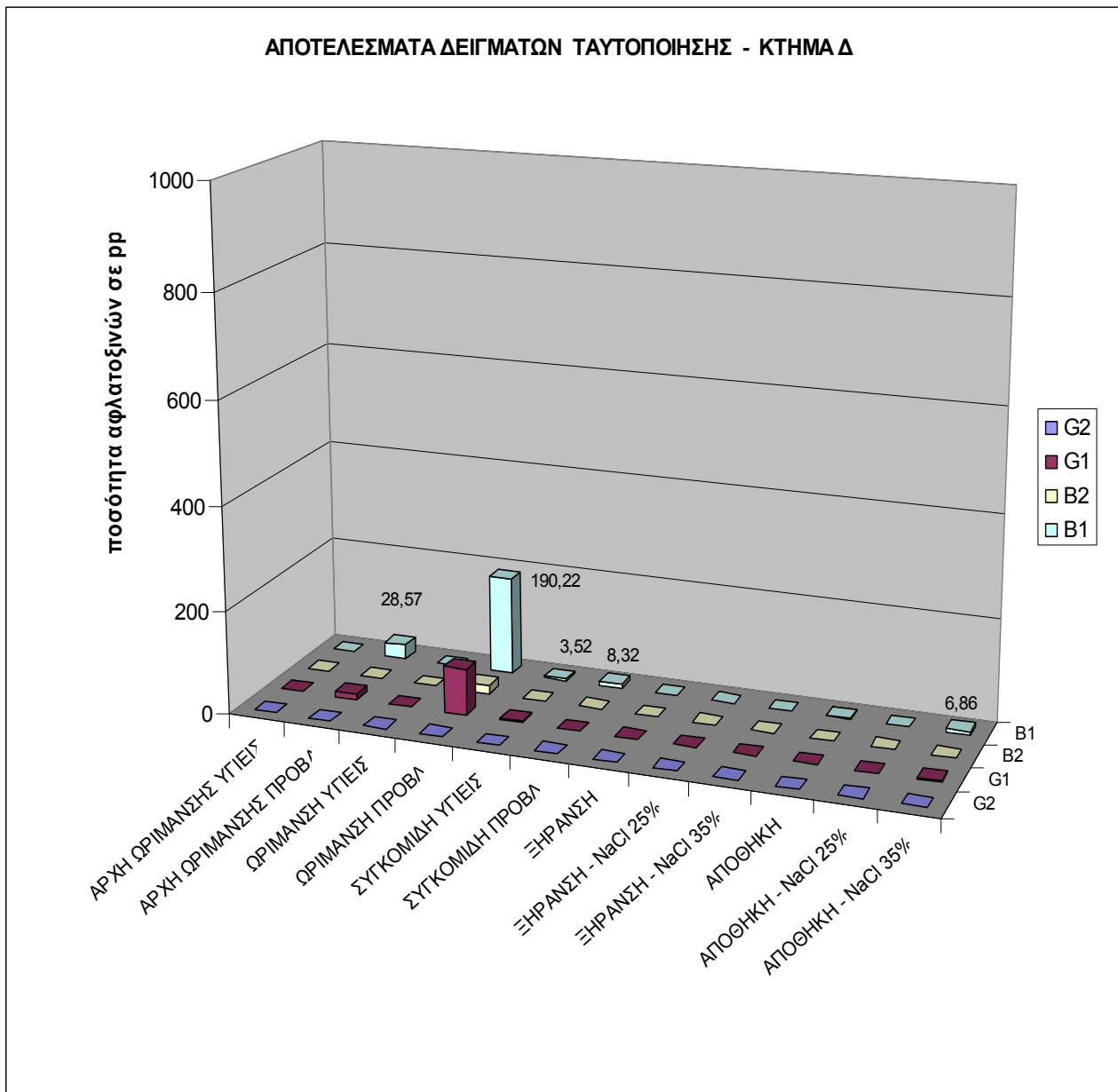
| ΚΤΗΜΑ Δ | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,89 | 0,00 | 0,00 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,44 | 0,00 | 0,00 |
| Sr | 0,00 | 0,63 | 0,00 | 0,00 |
| RSDr | | 141,42 | | |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ* | 0,44 | 9,08 | 0,53 | 28,67 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 13,66 | 1,10 | 28,46 |
| M.O. | 0,22 | 11,37 | 0,82 | 28,57 |
| Sr | 0,31 | 3,24 | 0,40 | 0,15 |
| RSDr | 141,42 | 28,54 | 48,94 | 0,53 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ* | 1,16 | 90,18 | 16,73 | 191,40 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 1,81 | 89,38 | 16,94 | 189,04 |
| M.O. | 1,49 | 89,78 | 16,83 | 190,22 |
| Sr | 0,45 | 0,56 | 0,15 | 1,67 |
| RSDr | 30,54 | 0,63 | 0,89 | 0,88 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 4,21 | 0,16 | 3,41 |
| ΥΓΙΕΙΣ | 0,00 | 3,51 | 0,14 | 3,64 |
| M.O. | 0,00 | 3,86 | 0,15 | 3,52 |
| Sr | 0,00 | 0,49 | 0,02 | 0,16 |
| RSDr | | 12,73 | 11,05 | 4,60 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,10 |
| ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΙ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,54 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,32 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,31 |
| RSDr | | | | 3,70 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,42 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,71 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 |
| RSDr | | | | 141,42 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

| ΚΤΗΜΑ Δ | G2 | G1 | B2 | B1 |
|----------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| ΑΠΟΘΗΚΗ 25% | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 35% | 0,00 | 3,22 | 0,32 | 6,14 |
| | 0,00 | 3,38 | 0,11 | 7,59 |
| M.O. | 0,00 | 3,30 | 0,22 | 6,86 |
| Sr | 0,00 | 0,11 | 0,15 | 1,02 |
| RSDr | | 3,33 | 69,98 | 14,93 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

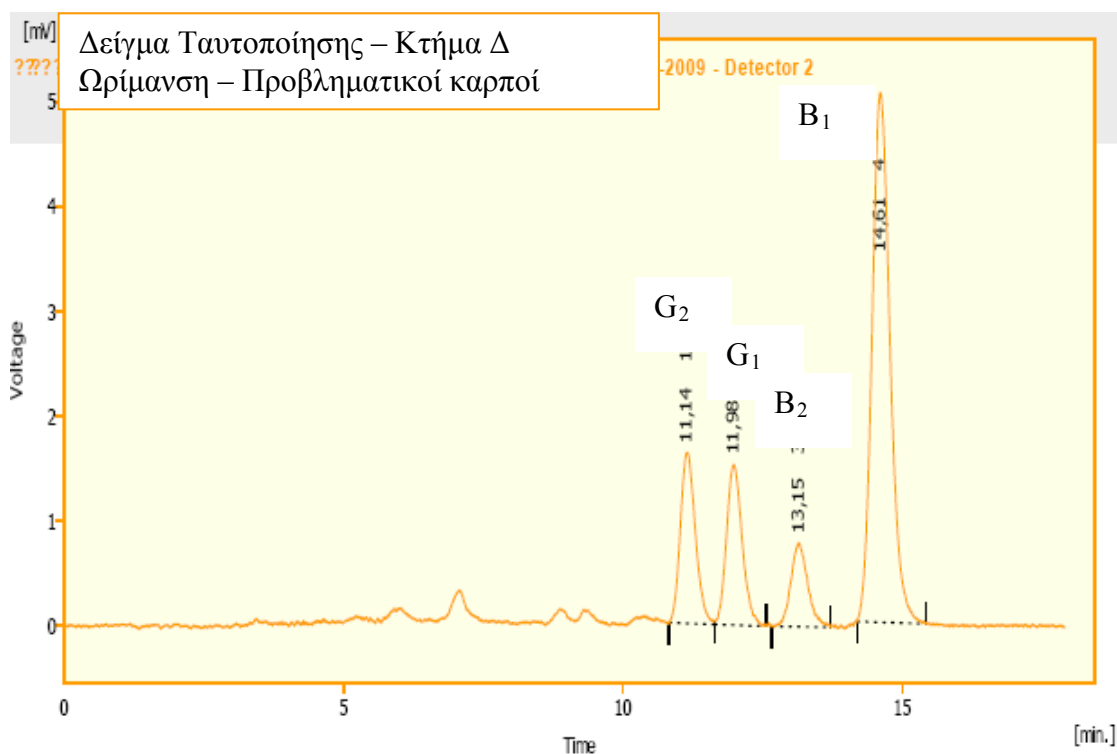
Διάγραμμα Γ.3.4. Κτήμα Δ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης Δειγμάτων Ταυτοποίησης



Πίνακας Γ.3.4.B. Κτήμα Δ- Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη *A.flavus* και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης

| ΚΤΗΜΑ Δ | Αριθμός φιστικιών με παρουσία <i>A.flavus</i> (σύνολο καρπών:30) | B1 αφλατοξίνη (ppb) | συνολική αφλατοξίνη (ppb) |
|--------------------|---|----------------------------|----------------------------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ (Υ) | 0 | 0,00 | 0,44 |
| - >> - (Π) | 26 | 28,57 | 40,97 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ (Υ) | 8 | 0,00 | 0,00 |
| - >> - (Π) | 22 | 190,22 | 298,32 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ (Υ) | 30 | 3,52 | 7,53 |
| - >> - (Π) | 23 | 8,32 | 8,32 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 30 | 0,00 | 0,00 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% | 19 | 0,00 | 0,00 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% | 21 | 0,00 | 0,00 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 17 | 0,71 | 0,71 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 25% | 20 | 0,00 | 0,00 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 35% | 21 | 6,86 | 10,38 |

Εικόνα Γ.3.2 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος Ταυτοποίησης από το Κτήμα Δ – 2^η Δειγματοληψία (Ωρίμανση : 13-8-08) προβληματικοί καρποί



Γ.3.4.1 Συζήτηση - Κτήμα Δ Δείγματα Ταυτοποίησης

Στο κτήμα αυτό, οι καρποί των δειγμάτων ταυτοποίησης που βρέθηκαν με αφλατοξίνη αφορούν τους προβληματικούς καρπούς των σταδίων «αρχή ωρίμανσης» και «ωρίμανση». Αυτό έρχεται σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα των μετρήσεων του μύκητα, όπου όπως φαίνεται και από τον Πίνακα Γ.3.4.Β η παρουσία του μύκητα είναι εντονότερη στους προβληματικούς καρπούς (Εικόνες Γ.2.3 και Γ.2.6)

Βέβαια, πάνω από το όριο για αφλατοξίνη βρέθηκαν και τα δείγματα των καρπών του σταδίου συγκομιδής (υγιείς και προβληματικοί) στο οποίο περιλαμβάνονταν καρποί με εντομολογική προσβολή από σκώρο, με εσωτερικές κηλίδες και χτυπημένοι από τους χειρισμούς κατά τη συγκομιδή.

Στο στάδιο της ξήρανσης δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη ούτε στο κανονικό δείγμα ούτε σε αυτά με την εφαρμογή άλατος. Δεδομένου ότι και στις μετρήσεις εμφάνισης του μύκητα αναφέρεται ότι υπήρχε μεγάλη καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ασπεργίλλων αλλά τελικά επικρατεί ο *A.niger* και κυρίως στις επεμβάσεις με το αλάτι μπορεί να θεωρηθεί το αποτέλεσμα αναμενόμενο.

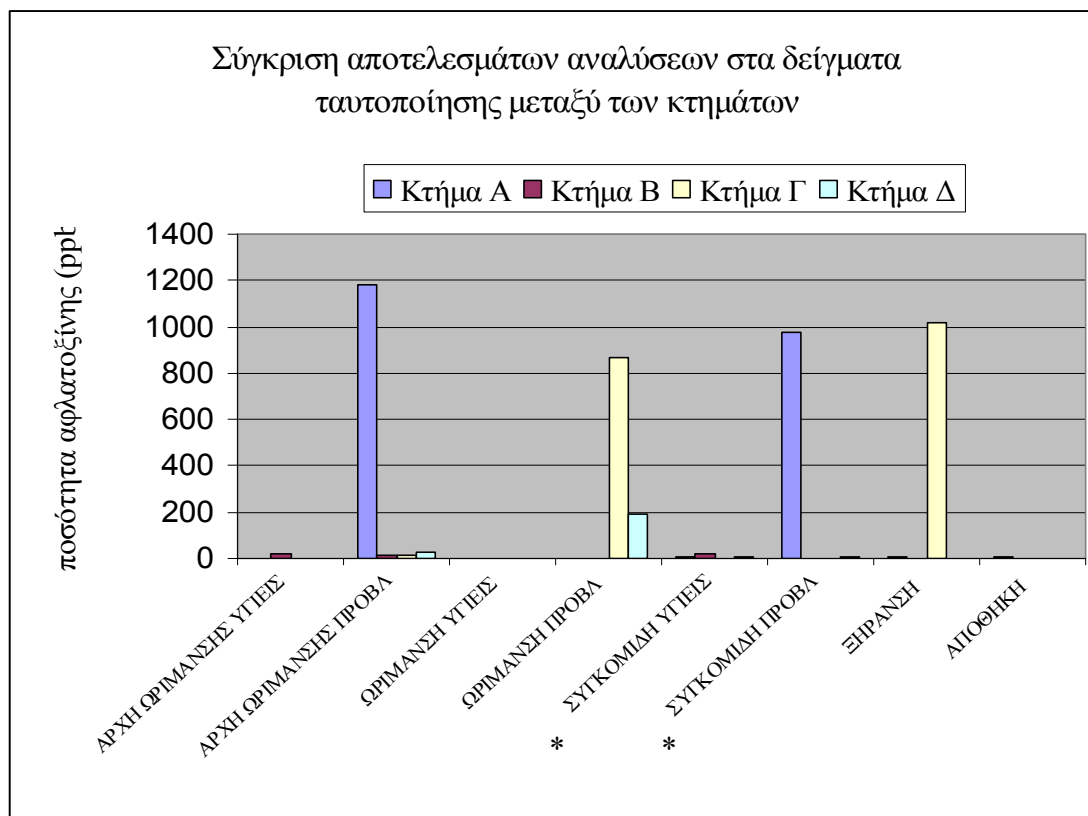
Στα δείγματα αποθήκευσης μόνο στο δείγμα με την εφαρμογή 35% άλατος ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη. Και στα τρία δείγματα υπήρχαν πολλοί καρποί με εσωτερική κηλίδα αλλά στο δείγμα 35% αλάτι υπήρχε έντονη προσβολή από σκώρο. Όμως, η παρουσία του *A.flavus* και στα 3 δείγματα ήταν παρόμοια, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Πίνακας Γ.2.6.4).

Γενικότερα και σε αυτό το κτήμα, από τις 4 αφλατοξίνες επικρατεί η Β₁ με σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες.

Γ.3.5. Σύγκριση αποτελεσμάτων αναλύσεων μεταξύ των κτημάτων

Από τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες φαίνεται ότι από τις 4 αφλατοξίνες η B₁ είναι αυτή που κυριαρχεί. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων για την B₁ αφλατοξίνη από τα δείγματα ταυτοποίησης για όλους τους πειραματικούς αγρούς για κάθε στάδιο ξεχωριστά. Στη συνέχεια περιγράφονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA), βάσει της οποίας έγινε σύγκριση των κτημάτων ως προς τα επίπεδα αφλατοξίνης σε κάθε στάδιο ξεχωριστά. Όπου η ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στους μέσους έγινε η δοκιμή Fisher ώστε να φανεί ποια κτήματα διέφεραν στατιστικώς σημαντικά.

Διάγραμμα Γ.3.5. Σύγκριση αποτελεσμάτων αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης B₁ στα Δείγματα Ταυτοποίησης μεταξύ των πειραματικών αγρών



* Δεν συλλέχθηκε δείγμα συγκομιδής από το Κτήμα Γ ούτε και δείγμα αποθήκης.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται σαφώς ότι τα υψηλότερα επίπεδα αφλατοξίνης προσδιορίστηκαν στους προβληματικούς καρπούς στα δείγματα πριν τη συγκομιδή. Στο Κτήμα Α και Γ ανιχνεύθηκαν οι υψηλότερες ποσότητες σε σχέση με τα υπόλοιπα κτήματα. Στο Κτήμα Β προσδιορίστηκαν οι μικρότερες ποσότητες αφλατοξίνης σε

κάθε στάδιο. Οι διαφορές στα επίπεδα αφλατοξίνης ανάμεσα στα κτήματα σχετίζεται με την κατάσταση του φιστικεώνα. Έτσι για παράδειγμα, ανάμεσα στο Κτήμα Β και Γ υπήρχαν μεγάλες διαφορές όσον αφορά την κατάσταση των προσβολών από ευρύτομο, την άρδευση και τις λοιπές καλλιεργητικές φροντίδες.

Στην ξήρανση φαίνεται ότι οι καρποί του δείγματος ταυτοποίησης από το Κτήμα Γ είχαν το υψηλότερο ποσοστό. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη πολλών εντομολογικών προσβολών πριν τη συγκομιδή με αποτέλεσμα το προϊόν ήδη να είναι μολυσμένο σε υψηλά επίπεδα από το στάδιο της ωρίμανσης, με αποτέλεσμα η ποσότητα αυτή να μεταφέρεται και μετά την ξήρανση.

Η στατιστική επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων έδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα (Πίνακες 3.5.1. έως και 3.5.5).

Πίνακας 3.5.1 Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: “Αρχή ωρίμανσης προβληματικοί”

| ΚΤΗΜΑΤΑ | Μ.Ο. | Ομοιογενείς ομάδες |
|----------------|-------------|---------------------------|
| Γ | 12,675 | X |
| B | 15,755 | X |
| Δ | 28,565 | X |
| A | 1182,05 | X |

Τα κτήματα Α & Δ με τα υψηλότερα ποσοστά αφλατοξίνης Β₁ διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τα Β & Γ.

Η ανάλυση παραλλακτικότητας για το στάδιο της ωρίμανσης στο δείγμα των υγιών καρπών έδειξε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των κτημάτων. Αντίθετα, στο δείγμα των προβληματικών καρπών φαίνεται ότι το Κτήμα Γ διαφέρει σε σχέση με τα υπόλοιπα κτήματα.

Πίνακας 3.5.2 Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: «Ωρίμανση προβληματικοί»

| ΚΤΗΜΑΤΑ | Μ.Ο. | Ομοιογενείς ομάδες |
|----------------|-------------|---------------------------|
| B | 0,0 | X |
| A | 0,0 | X |
| Δ | 97,405 | X |
| Γ | 868,44 | X |

Στα δείγματα της συγκομιδής φαίνεται ότι το Κτήμα Β διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το Α και το Δ στους υγείς καρπούς ενώ στους προβληματικούς το Α με πολύ υψηλά ποσοστά αφλατοξίνης Β₁. Το κτήμα Γ δεν αναφέρεται διότι δεν έγινε δειγματοληψία σε αυτό κατά τη συγκομιδή.

Πίνακας 3.5.3 Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: «Συγκομιδή υγείς»

| <i>ΚΤΗΜΑΤΑ</i> | <i>Μ.Ο.</i> | <i>Ομοιογενείς ομάδες</i> |
|----------------|-------------|---------------------------|
| Δ | 3,525 | X |
| A | 8,245 | X |
| B | 20,595 | X |

Πίνακας 3.5.4 Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: «Συγκομιδή προβληματικοί»

| <i>ΚΤΗΜΑΤΑ</i> | <i>Μ.Ο.</i> | <i>Ομοιογενείς ομάδες</i> |
|----------------|-------------|---------------------------|
| B | 1,675 | X |
| Δ | 8,32 | X |
| A | 973,695 | X |

Στο δείγμα ταυτοποίησης με τους αποξηραμένους καρπούς το Κτήμα Γ διαφέρει στατιστικά σημαντικά με πολύ υψηλά ποσοστά αφλατοξίνης παρόμοια με αυτά του προηγούμενου δείγματος στην ωρίμανση. Η Β₁ αφλατοξίνη στο Κτήμα Α είναι περίπου στα ίδια επίπεδα με αυτό του δείγματος της συγκομιδής με τους υγείς καρπούς. Αυτό σημαίνει ότι κατά την αποφλοιώση από το συνολικό δείγμα αποχωρίζονται οι προβληματικοί καρποί.

Πίνακας 3.5.5 Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: «Ξήρανση»

| <i>ΚΤΗΜΑΤΑ</i> | <i>Μ.Ο.</i> | <i>Ομοιογενείς ομάδες</i> |
|----------------|-------------|---------------------------|
| Δ | 0,0 | X |
| B | 3,065 | X |
| A | 5,025 | X |
| Γ | 1020,96 | X |

Η εικόνα των καρπών κατά την αποθήκευση ως προς την ύπαρξη Β₁ αφλατοξίνης είναι παρόμοια με αυτή της ξήρανσης.

Πίνακας 3.5.5 Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: «Αποθήκη»

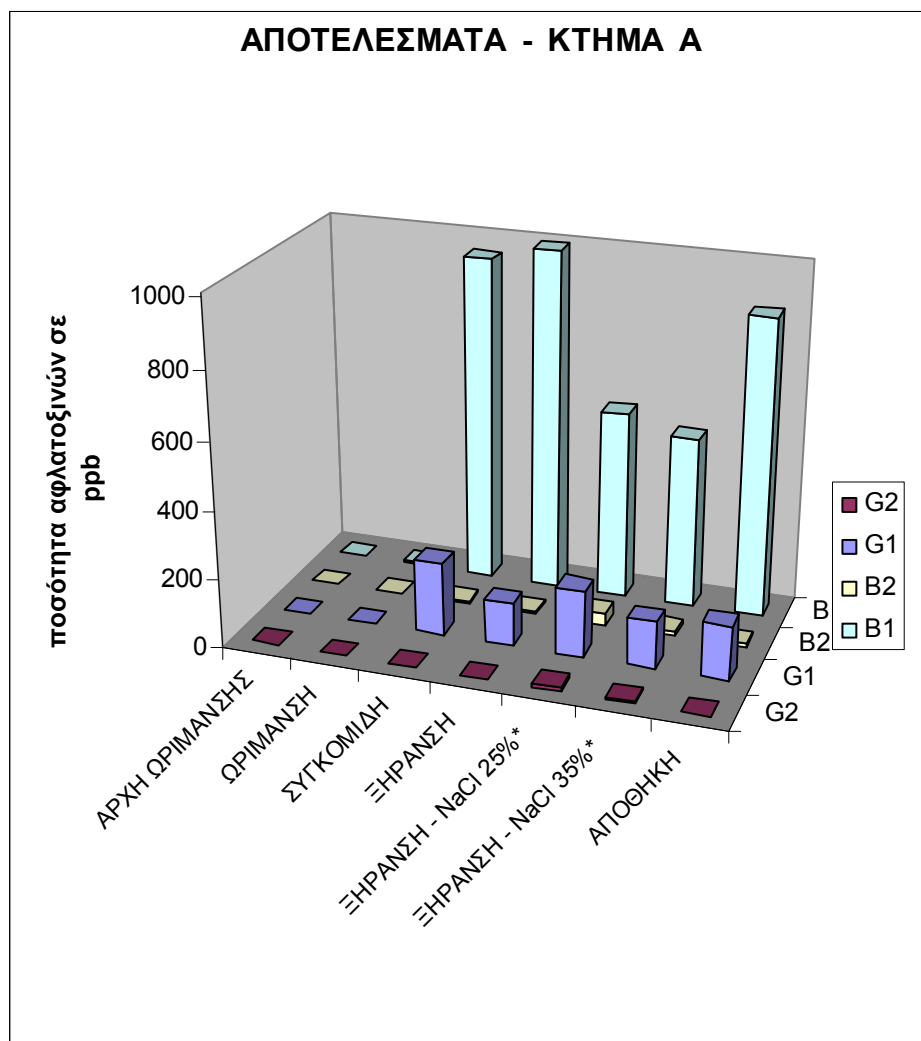
| <i>ΚΤΗΜΑΤΑ</i> | <i>Μ.Ο.</i> | <i>Ομοιογενείς ομάδες</i> |
|----------------|-------------|---------------------------|
| B | 0,0 | X |
| Δ | 0,71 | X |
| A | 4,555 | X |

Γ.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΓΡΟΥ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ – ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΕ HPLC ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ

Τα αποτελέσματα από τα Δείγματα Ανάλυσης των φιστικιών για ανίχνευση αφλατοξίνης περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας Γ.4.1 έως και Γ.4.4) και στα αντίστοιχα διαγράμματα (Διάγραμμα Γ.4.1 έως και Γ.4.4) για κάθε αγρό και δειγματοληψία ξεχωριστά. Τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων στην HPLC επισυνάπτονται στο Παράρτημα 6 για κάθε επανάληψη.

Γ.4.1. Αποτελέσματα αναλύσεων - Κτήμα Α

Διάγραμμα Γ.4.1 Κτήμα Α - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια

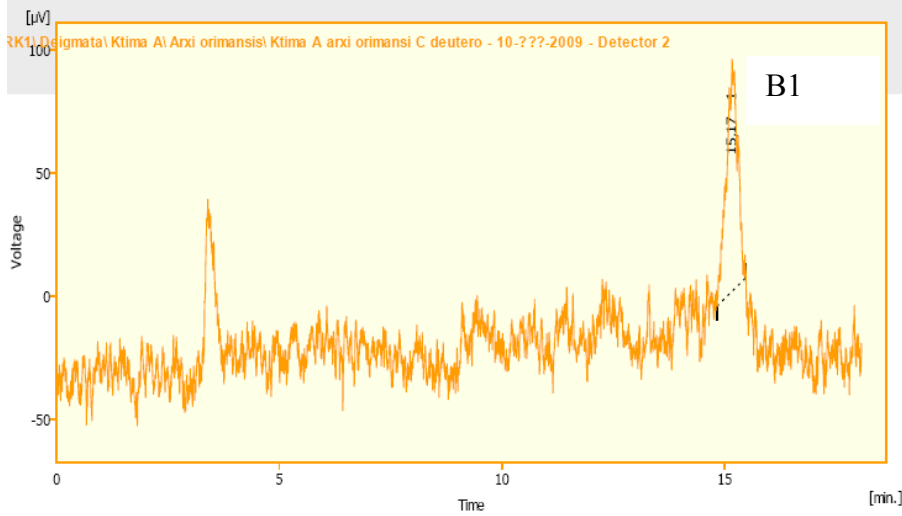


Πίνακας Γ.4.1 Κτήμα Α - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια

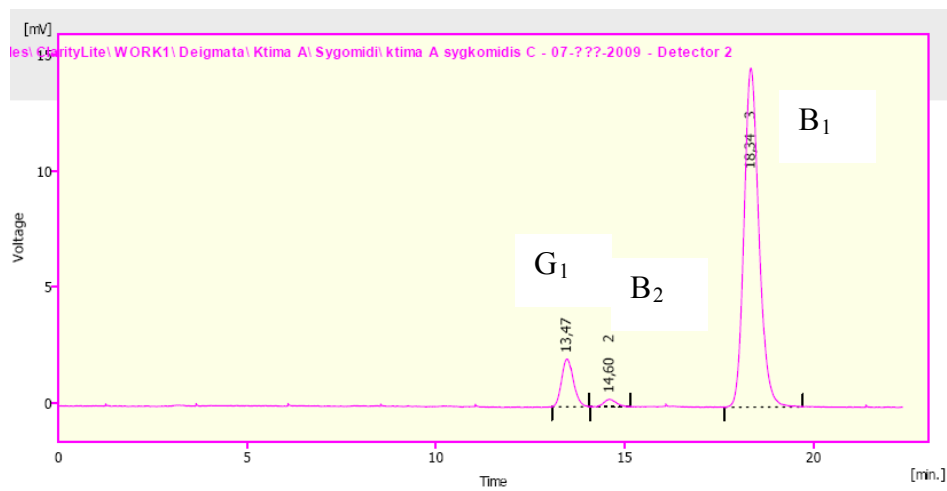
| ΚΤΗΜΑ Α | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,96 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,53 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,88 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,79 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,19 |
| RSDr | | | | 10,35 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ* | 0,00 | 5,41 | 0,51 | 6,40 |
| | 0,00 | 2,43 | 0,31 | 5,55 |
| | 0,00 | 1,02 | 0,00 | 2,88 |
| M.O. | 0,00 | 2,95 | 0,27 | 4,94 |
| Sr | 0,00 | 1,83 | 0,21 | 1,50 |
| RSDr | | 62,06 | 76,65 | 30,30 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 275,54 | 8,07 | 1031,78 |
| | 0,00 | 194,02 | 7,77 | 943,84 |
| | 0,00 | 178,06 | 5,65 | 908,21 |
| M.O. | 0,00 | 215,87 | 7,17 | 961,28 |
| Sr | 0,00 | 42,69 | 1,08 | 51,93 |
| RSDr | | 19,78 | 15,02 | 5,40 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,00 | 155,64 | 8,84 | 965,71 |
| | 0,00 | 107,06 | 13,95 | 1036,30 |
| | 0,00 | 119,51 | 9,90 | 1013,10 |
| M.O. | 0,00 | 127,41 | 10,90 | 1005,03 |
| Sr | 0,00 | 20,60 | 2,20 | 29,38 |
| RSDr | | 16,17 | 20,19 | 2,92 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25%* | 15,99 | 143,71 | 30,31 | 343,10 |
| | 2,56 | 202,19 | 20,89 | 678,73 |
| | 11,03 | 245,94 | 49,04 | 640,08 |
| M.O. | 9,86 | 197,28 | 33,41 | 553,97 |
| Sr | 5,55 | 41,88 | 11,70 | 149,94 |
| RSDr | 56,26 | 21,23 | 35,01 | 27,07 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35%* | 9,10 | 217,73 | 23,26 | 380,17 |
| | 0,00 | 125,54 | 6,07 | 860,64 |
| | 4,52 | 72,44 | 13,58 | 271,62 |
| M.O. | 4,54 | 138,57 | 14,30 | 504,14 |
| Sr | 3,72 | 60,03 | 7,04 | 255,95 |
| RSDr | 81,82 | 43,32 | 49,19 | 50,77 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ* | 0,00 | 197,85 | 10,16 | 874,49 |
| | 0,00 | 162,88 | 9,84 | 787,71 |
| | 0,00 | 114,19 | 9,06 | 976,23 |
| M.O. | 0,00 | 158,31 | 9,68 | 879,48 |
| Sr | 0,00 | 34,31 | 0,46 | 77,04 |
| RSDr | | 21,67 | 4,77 | 8,76 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

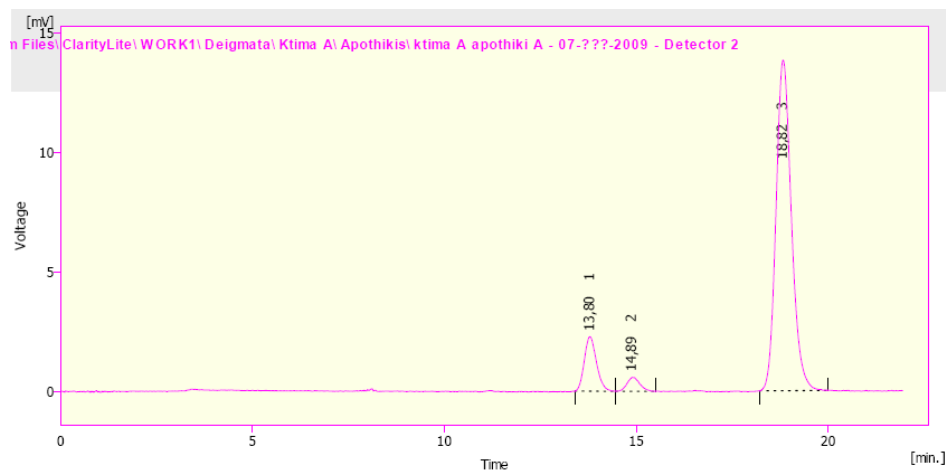
Εικόνα Γ.4.1 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: Κτήμα Α – 1^η Δειγματοληψία (Αρχή ωρίμανσης – 31/7/08)



Εικόνα Γ.4.2 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: Κτήμα Α – 3^η Δειγματοληψία (Συγκομιδή – 20/8/08)



Εικόνα Γ.4.3 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: Κτήμα Α – 5^η Δειγματοληψία (Αποθήκη – 16/10/08)



Γ.4.1.1 Στατιστική επεξεργασία - Κτήμα Α Δείγματα Αγρού

Η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική ποσότητα αφλατοξίνης (total aflatoxin). Συνεπώς, με τη Μέθοδο Fisher (LSD) προσδιορίστηκαν ποια στάδια διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας Γ.4.1.1) και για τις δύο παραμέτρους.

Πίνακας Γ.4.1.1 Κτήμα Α – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων: από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη.

| | <i>B₁ αφλατοξίνη</i> | |
|------------------|---------------------------------|---------------------------|
| <i>ΣΤΑΔΙΑ</i> | <i>Μ.Ο.</i> | <i>ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΣ ΟΜΑΔΕΣ</i> |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 1,79 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 4,94333 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% NaCl | 504,143 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% NaCl | 553,97 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 879,477 | X |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 961,277 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 1005,04 | X |
| | <i>Συνολική αφλατοξίνη</i> | |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 1,79 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 8,17 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% NaCl | 661,557 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% NaCl | 794,523 | XX |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 1047,47 | XX |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 1143,34 | X |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 1184,31 | X |

Από τη στατιστικά επεξεργασία προκύπτει ότι τόσο για τη B₁ όσο και το σύνολο δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πρώτων σταδίων (αρχή ωρίμανσης, ωρίμανση), αλλά υπάρχει διαφορά με το στάδιο της συγκομιδής. Ως προς τη B₁ δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων με αλάτι, υπάρχει διαφορά με το δείγμα χωρίς αλάτι, με την αποθήκη και τη συγκομιδή. Βέβαια η ποσότητα αφλατοξίνης τόσο στο κανονικό δείγμα ξήρανσης όσο και σε αυτά με την επέμβαση με αλάτι είναι πολύ υψηλή για να έχει κάποια σημασία η διαφορά. Επίσης, ως προς τη B₁ δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ του σταδίου της συγκομιδής, της ξήρανσης και της αποθήκευσης. Όσον αφορά τη συνολική αφλατοξίνη η εικόνα διαφοροποιείται ελαφρώς (4 ομάδες) διότι φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του δείγματος της αποθήκης με αυτό της ξήρανσης με 25% αλάτι.

Γ.4.1.2 Συζήτηση - Κτήμα Α Δείγματα Αγρού

Οι αναλύσεις στα δείγματα αγρού από αυτόν τον πειραματικό αγρό δείχνουν ότι σε όλα τα στάδια εκτός από το 1ο (αρχή ωρίμανσης) ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Ιδιαίτερα από το στάδιο της συγκομιδής και μετά οι ποσότητες είναι πολύ υψηλές. Μεταξύ των σταδίων συγκομιδής, ξήρανσης και αποθήκευσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα αποτελέσματα των δειγμάτων ταυτοποίησης, τα οποία έδειξαν ότι πριν τη συγκομιδή τα υψηλά ποσοστά αφλατοξίνης προέρχονται από προβληματικούς καρπούς (Πίνακας Γ.3.1.Α, Γ.3.1.Β και Διάγραμμα Γ.3.1) και το γεγονός ότι κατά την αποφλοιώση αφαιρούνται εκτός από το εξωκάρπιο (φλούδα) ένα πολύ μεγάλο μέρος προβληματικών καρπών (άσπερμοι, προσβεβλημένοι από ευρύτομο, μαυρισμένοι κ.α.) φαίνεται ότι:

1. Ένα ποσοστό αφλατοξίνης προέρχεται από τη συγκομιδή και μεταφέρεται στην ξήρανση και ακολούθως στην αποθήκευση.
2. Το τόσο υψηλό ποσοστό αφλατοξίνης δεν μπορεί να συσχετιστεί μόνο με την ποσότητα που προέρχεται από τη συγκομιδή, άρα είναι πιθανό να υπάρχει επιμόλυνση στην αποφλοιώση με το νερό και κάποια ποσότητα αφλατοξίνης να παράχθηκε κατά την ξήρανση.
3. Η ανάπτυξη των μυκήτων μετά την ξήρανση δεν αναστέλλεται πλήρως (Πίνακας Γ.2.6) αλλά φάνηκε απλώς να καθυστερεί, οπότε είναι πιθανή και η ανάπτυξη αφλατοξίνης σε αυτό το στάδιο.
4. Λόγω του ότι η ξήρανση έγινε σε ανοικτό χώρο στον ήλιο είναι πιθανή η επιμόλυνση των φιστικιών λόγω μη υγιεινής του χώρου που απλώθηκαν είτε λόγω προσβολής από έντομα.
5. Η παρουσία πολύ υψηλών ποσοτήτων αφλατοξίνης στην αποθήκευση μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενη λόγω της πολύ υψηλής ποσότητας που ανιχνεύθηκε κατά την ξήρανση και δεδομένου ότι από το στάδιο της ξήρανσης μέχρι την αποθήκευση δεν υπάρχει άλλο ενδιάμεσο στάδιο πρόληψης ή μείωσης της αφλατοξίνης.
6. Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρξε μεταξύ της ποσότητας αφλατοξίνης στην ξήρανση και στην αποθήκευση αν και η αποθήκευση έγινε σε ιδιόκτητη αποθήκη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Βέβαια, λόγω του ότι οι ποσότητες αφλατοξινών στα τρία τελευταία στάδια είναι τόσο υψηλές, ο τρόπος αποθήκευσης για το συγκεκριμένο κτήμα μπορεί να θεωρηθεί δευτερεύουσας σημασίας.

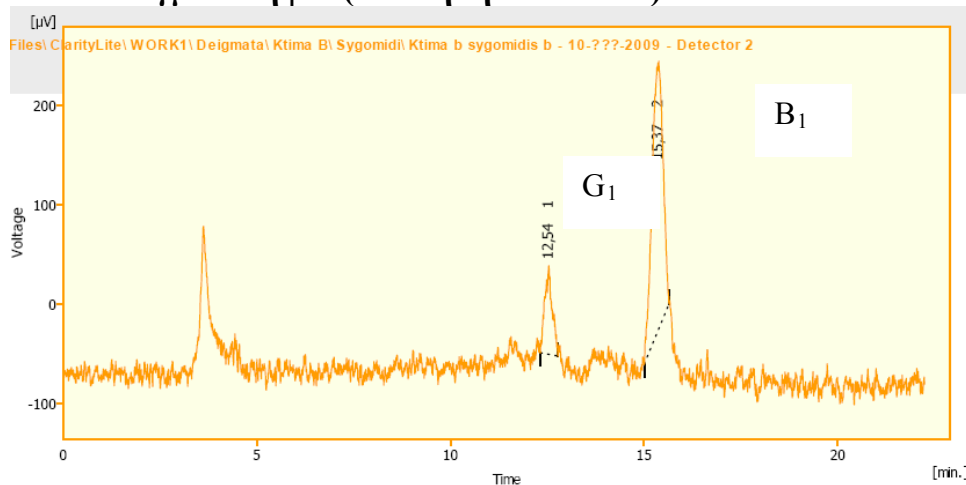
Γ.4.2. Αποτελέσματα αναλύσεων - Κτήμα Β

Πίνακας Γ.4.2 Κτήμα Β - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια

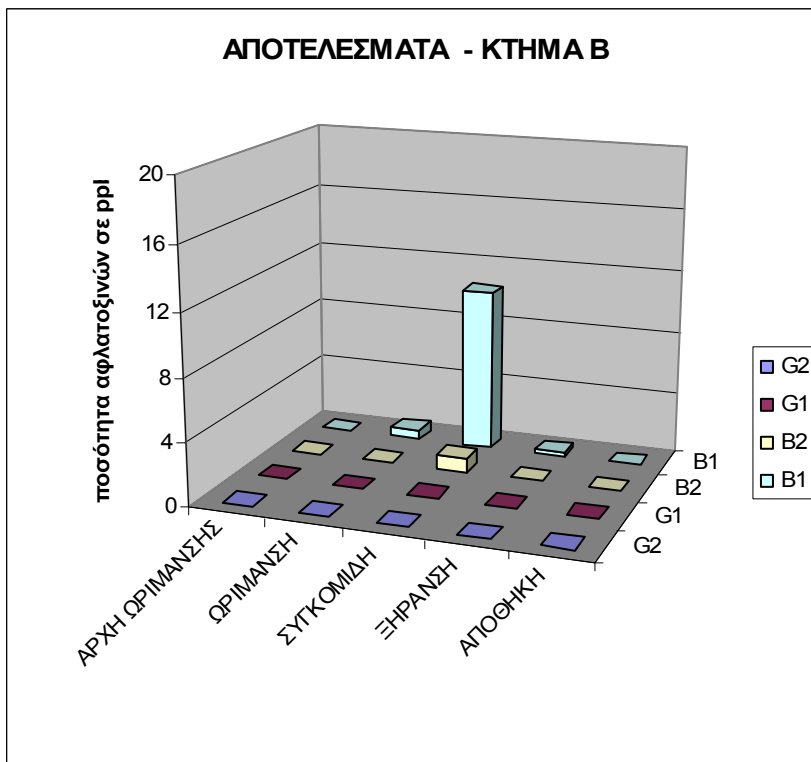
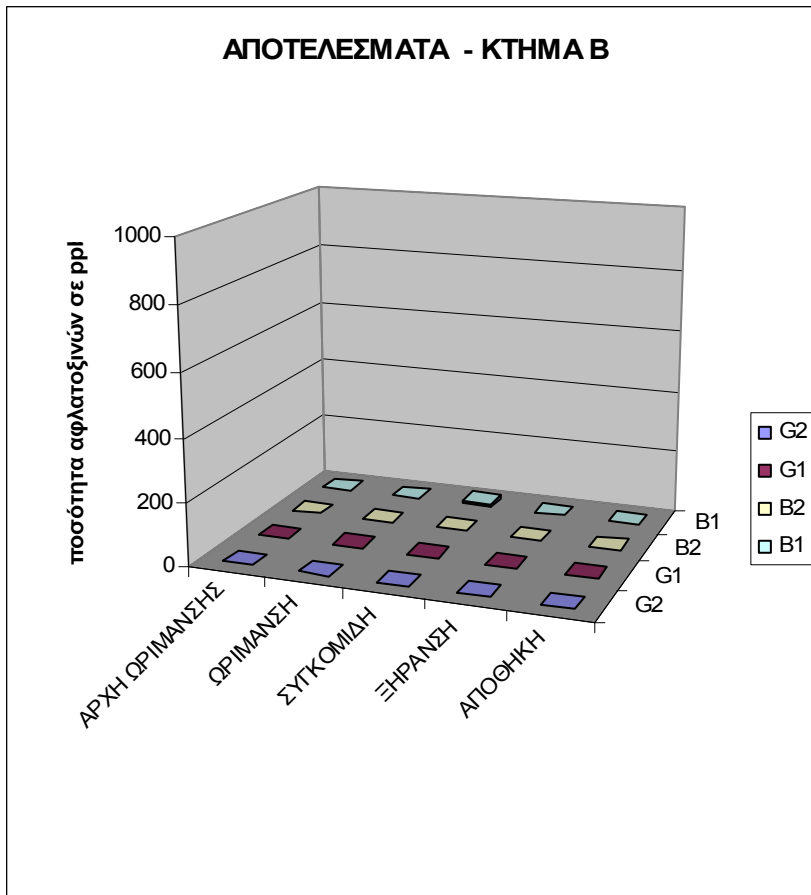
| ΚΤΗΜΑ Β | G2 | G1 | B2 | B1 |
|-------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| ΑΡΧΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,81 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,60 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,85 |
| RSDr | | | | 141,42 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 0,00 | 1,47 | 11,72 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,88 | 12,10 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,41 | 7,44 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,92 | 10,42 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,43 | 2,11 |
| RSDr | | | 47,07 | 20,28 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,28 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,39 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,22 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,16 |
| RSDr | | | | 73,34 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

Εικόνα Γ.4.4 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: **Κτήμα Β – 5^η Δειγματοληψία (Αποθήκη – 16/10/08)**



Διάγραμμα Γ.4.2 Κτήμα Β - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια



Γ.4.2.1 Στατιστική επεξεργασία - Κτήμα Β Δείγματα Αγρού

Η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική ποσότητα αφλατοξίνης (total aflatoxin). Συνεπώς, με τη Μέθοδο Fisher (LSD) προσδιορίστηκαν ποια στάδια διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας Γ.4.2.1) και για τις δύο παραμέτρους.

Πίνακας Γ.4.2.1 Κτήμα Β – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων: από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη.

| | <i>B₁ αφλατοξίνη</i> | |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|
| <i>ΣΤΑΔΙΑ</i> | <i>Μ.Ο.</i> | <i>ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΣ ΟΜΑΔΕΣ</i> |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,0 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 0,0 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 0,223333 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,603333 | X |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 10,42 | X |
| | <i>Συνολική αφλατοξίνη</i> | |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,0 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 0,0 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 0,223333 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 0,603333 | X |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 11,34 | X |

Από τη στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι τόσο η B₁ όσο και το σύνολο αφλατοξινών διαφέρει στατιστικά σημαντικά μόνο στο στάδιο της συγκομιδής. Στα υπόλοιπα στάδια δεν υπάρχει διαφορά.

Γ.4.2.2 Συζήτηση - Κτήμα Β Δείγματα Αγρού

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τους πίνακες φαίνεται ότι μόνο στο στάδιο της συγκομιδής ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε ποσότητα πάνω από το όριο. Επίσης, αυτή η ποσότητα είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή των υπόλοιπων πειραματικών αγρών. Το τελευταίο είναι πιθανό να οφείλεται στην γενικότερα καλή εικόνα του αγρού όσον αφορά τις προσβολές από έντομα και ιδιαίτερα το ευρύτομο και το σκώρο, αλλά και τις καλλιεργητικές φροντίδες. Το αποτέλεσμα είναι ότι στην ξήρανση η ποσότητα

αυτή μειώθηκε και κάτω από το όριο. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι κατά την αποφλοιώση αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό προβληματικών καρπών (άσπερμοι, χτυπημένοι από ευρύτομο, μαυρισμένοι κ.α.) και επιπλέον η ξήρανση έγινε σε ξηραντήριο άμεσα (την επομένη της συγκομιδής) σε ελεγχόμενες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας σε καθαρό και υγιεινό χώρο.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μετά την ξήρανση ολόκληρη η παραγωγή του αγρού παραδόθηκε στον Αγροτικό Συνεταιρισμό Φιστικοπαραγωγών όπου έγινε χειροδιαλογή και απορρίφθηκαν οι «ύποπτοι» εξωτερικά καρποί και η αποθήκευση έγινε σε ψυγείο σε θερμοκρασία 5-7°C και 45-60% σχετική υγρασία. Με αυτούς τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη στο δείγμα της αποθήκευσης.

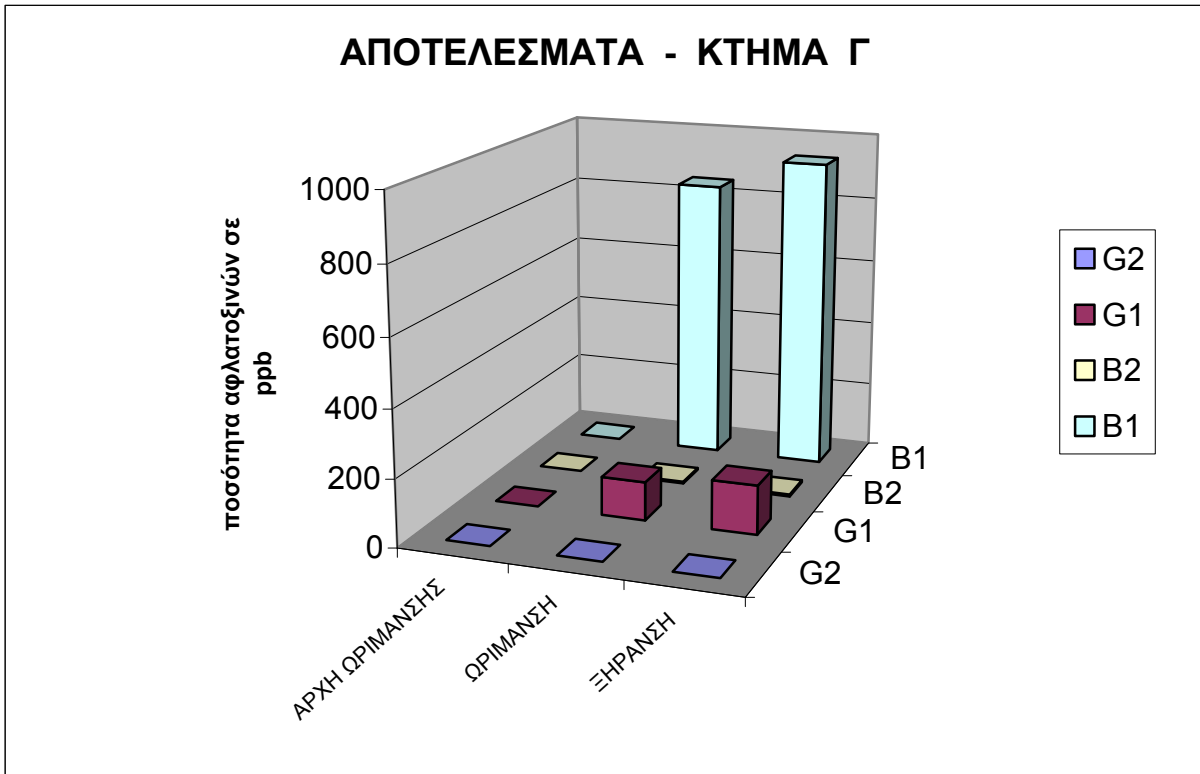
Γ.4.3. Αποτελέσματα αναλύσεων - Κτήμα Γ

Πίνακας Γ.4.3 Κτήμα Γ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια

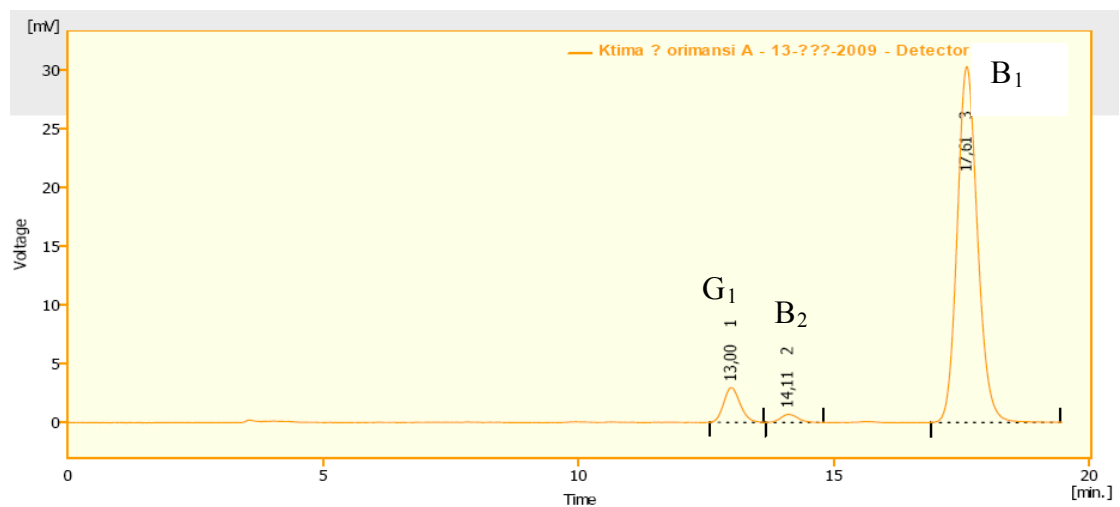
| ΚΤΗΜΑ Γ | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ* | 0,00 | 131,14 | 6,23 | 951,71 |
| | 0,00 | 128,44 | 5,84 | 848,91 |
| | 0,00 | 85,24 | 4,42 | 740,79 |
| M.O. | 0,00 | 114,94 | 5,50 | 847,14 |
| Sr | 0,00 | 21,03 | 0,78 | 86,12 |
| RSDr | | 18,30 | 14,12 | 10,17 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 0,00 | 157,05 | 6,56 | 1013,99 |
| | 0,00 | 172,73 | 6,99 | 970,63 |
| | 0,00 | 108,42 | 4,76 | 824,80 |
| M.O. | 0,00 | 146,07 | 6,10 | 936,47 |
| Sr | 0,00 | 27,38 | 0,97 | 80,92 |
| RSDr | | 18,74 | 15,83 | 8,64 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

Διάγραμμα Γ.4.3 Κτήμα Γ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια



Εικόνα Γ.4.5 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: Κτήμα Γ – 2^η Δειγματοληψία (Ωρίμανση – 13/08/08)



Γ.4.3.1 Στατιστική επεξεργασία - Κτήμα Γ Δείγματα Αγρού

Η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική ποσότητα αφλατοξίνης (total aflatoxin). Συνεπώς, με τη Μέθοδο Fisher (LSD) προσδιορίστηκαν ποια στάδια διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας Γ.4.3.1) και για τις δύο παραμέτρους.

Πίνακας Γ.4.3.1 Κτήμα Γ – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων: από την αρχή ωρίμανσης μέχρι την ξήρανση ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη.

| | B₁ αφλατοξίνη | |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|
| ΣΤΑΔΙΑ | Μ.Ο. | ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΣ ΟΜΑΔΕΣ |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,0 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 847,137 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 936,473 | X |
| | Συνολική αφλατοξίνη | |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,0 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 967,573 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 1088,64 | X |

Από τη στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι στην παράμετρο «στάδια», η οποία εκφράζει τις δειγματοληψίες, υπάρχουν δύο ομάδες που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Τόσο η B₁ όσο και το σύνολο αφλατοξινών δεν διαφέρει στο στάδιο της ωρίμανσης και της ξήρανσης, ενώ υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά με την ποσότητα στην αρχή της ωρίμανσης.

Γ.4.3.2 Συζήτηση - Κτήμα Γ Δείγματα Αγρού

Σε αυτόν τον πειραματικό αγρό ανιχνεύθηκε υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης από το στάδιο της ωρίμανσης (δειγματοληψία: 13-8-09). Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των δειγμάτων ταυτοποίησης (Πίνακας Γ.3.3.A, Γ.3.3.B και Διάγραμμα Γ.3.3) όπου τόσο η παρουσία του *A.flavus* όσο και της αφλατοξίνης είναι πολύ υψηλή ιδιαίτερα στους προσβεβλημένους καρπούς. Με δεδομένο το πολύ υψηλό ποσοστό προσβεβλημένων καρπών στο χωράφι από διάφορα έντομα της φιστικιάς και η ακαλλιεργησία μπορεί να εξηγηθεί η υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης που ανιχνεύθηκε σε αυτό το στάδιο. Στο στάδιο της ξήρανσης ανιχνεύθηκε επίσης πολύ μεγάλη ποσότητα αφλατοξίνης παρά το στάδιο της αποφλοίωσης όπου ένα

μεγάλο μέρος των προβληματικών καρπών αφαιρείται άρα και ένα μεγάλο ποσοστό αφλατοξίνης. Με τόσο υψηλές ποσότητες αφλατοξίνης κατά την ωρίμανση είναι πολύ πιθανή η μόλυνση και των υγιών καρπών οι οποίοι απομένουν για ξήρανση ακόμα και στο στάδιο της αποφλοιώσης. Το ίδιο πιθανή είναι και η επιμόλυνση στο στάδιο της ξήρανσης δεδομένου ότι η παρουσία του *A.flavus* κατά την ξήρανση δεν αναστέλλεται πλήρως (Πίνακας Γ.2.8, Εικόνα Γ.2.25, Γ.2.26). Επιπροσθέτως, η ξήρανση σε αυτόν τον πειραματικό αγρό έγινε σε ανοιχτό χώρο στον ήλιο.

Γ.4.4. Αποτελέσματα αναλύσεων - Κτήμα Δ

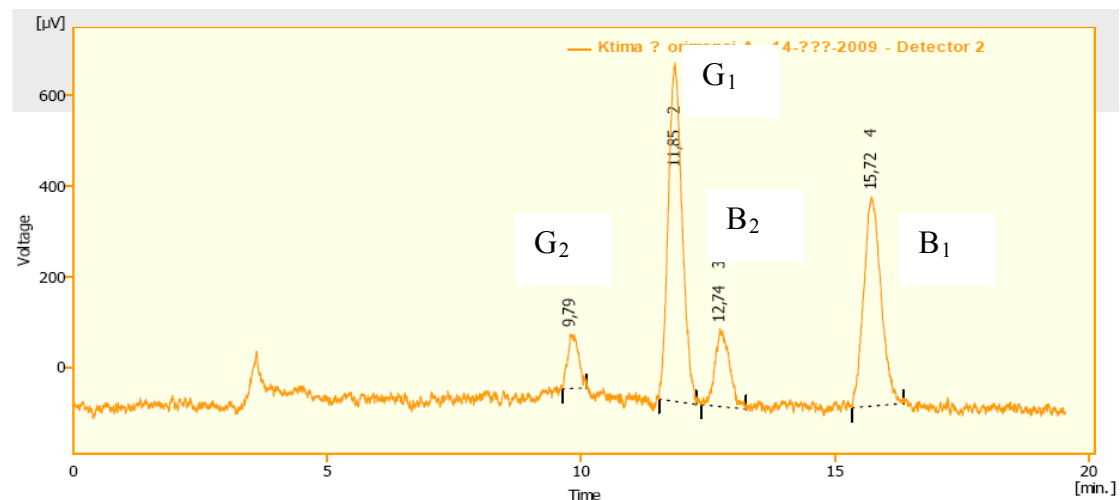
Πίνακας Γ.4.4 Κτήμα Δ – Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια

| ΚΤΗΜΑ Δ | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΑΡΧΗ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ* | 1,88 | 27,91 | 1,27 | 12,43 |
| | 0,82 | 8,97 | 0,75 | 7,86 |
| | 0,91 | 13,81 | 0,52 | 7,04 |
| M.O. | 1,21 | 16,89 | 0,85 | 9,11 |
| Sr | 0,48 | 8,03 | 0,31 | 2,37 |
| RSDr | 39,72 | 47,55 | 36,82 | 26,05 |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ* | 0,00 | 0,00 | 0,94 | 10,17 |
| | 0,00 | 0,00 | 1,28 | 14,55 |
| | 0,00 | 0,00 | 3,43 | 49,83 |
| M.O. | 0,00 | 0,00 | 1,88 | 24,85 |
| Sr | 0,00 | 0,00 | 1,10 | 17,76 |
| RSDr | | | 58,43 | 71,46 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ* | 1,48 | 15,99 | 1,69 | 23,68 |
| | 1,72 | 12,38 | 1,40 | 19,31 |
| | 1,30 | 9,64 | 1,13 | 24,17 |
| M.O. | 1,50 | 12,67 | 1,41 | 22,39 |
| Sr | 0,17 | 2,60 | 0,23 | 2,18 |
| RSDr | 11,66 | 20,53 | 16,26 | 9,76 |

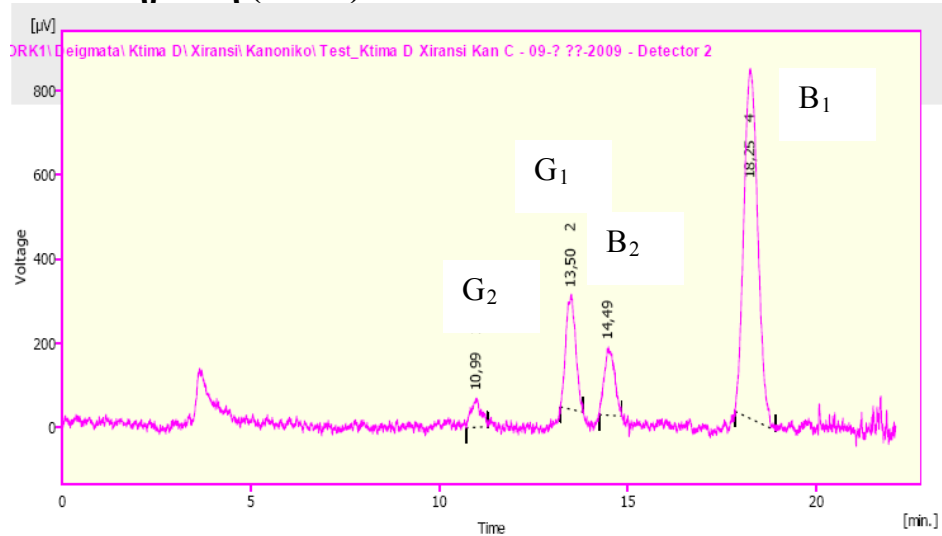
| ΚΤΗΜΑ Δ | G2(ppb) | G1(ppb) | B2(ppb) | B1(ppb) |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% | 0,00 | 6,92 | 0,47 | 8,44 |
| | 0,51 | 7,22 | 0,39 | 9,90 |
| | 0,56 | 6,60 | 0,38 | 7,84 |
| M.O. | 0,36 | 6,91 | 0,41 | 8,73 |
| Sr | 0,25 | 0,25 | 0,04 | 0,86 |
| RSDr | 70,94 | 3,68 | 10,07 | 9,88 |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% | 1,81 | 343,42 | 11,63 | 649,27 |
| | 1,46 | 373,29 | 12,89 | 618,64 |
| | 13,21 | 244,39 | 13,15 | 210,55 |
| M.O. | 5,49 | 320,37 | 12,56 | 492,82 |
| Sr | 5,46 | 55,09 | 0,66 | 199,99 |
| RSDr | 99,35 | 17,20 | 5,27 | 40,58 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 12,04 | 192,75 | 24,59 | 335,18 |
| | 10,47 | 182,05 | 22,31 | 321,37 |
| | 7,85 | 247,40 | 23,49 | 401,55 |
| M.O. | 10,12 | 207,40 | 23,46 | 352,70 |
| Sr | 1,73 | 28,62 | 0,93 | 35,00 |
| RSDr | 17,09 | 13,80 | 3,96 | 9,92 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 25% | 8,43 | 197,67 | 13,12 | 453,25 |
| | 10,10 | 202,65 | 12,99 | 440,87 |
| | 4,77 | 140,21 | 10,23 | 376,56 |
| M.O. | 7,76 | 180,18 | 12,12 | 423,56 |
| Sr | 2,23 | 28,33 | 1,33 | 33,62 |
| RSDr | 28,67 | 15,72 | 11,00 | 7,94 |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 35% | 1,64 | 48,11 | 23,33 | 248,58 |
| | 0,00 | 0,90 | 16,49 | 1268,80 |
| | 8,84 | 175,93 | 33,07 | 496,94 |
| M.O. | 3,49 | 74,98 | 24,30 | 671,44 |
| Sr | 3,84 | 73,93 | 6,80 | 434,39 |
| RSDr | 109,90 | 98,61 | 28,00 | 64,70 |

* Δείγμα με ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο Καν.1881/2006

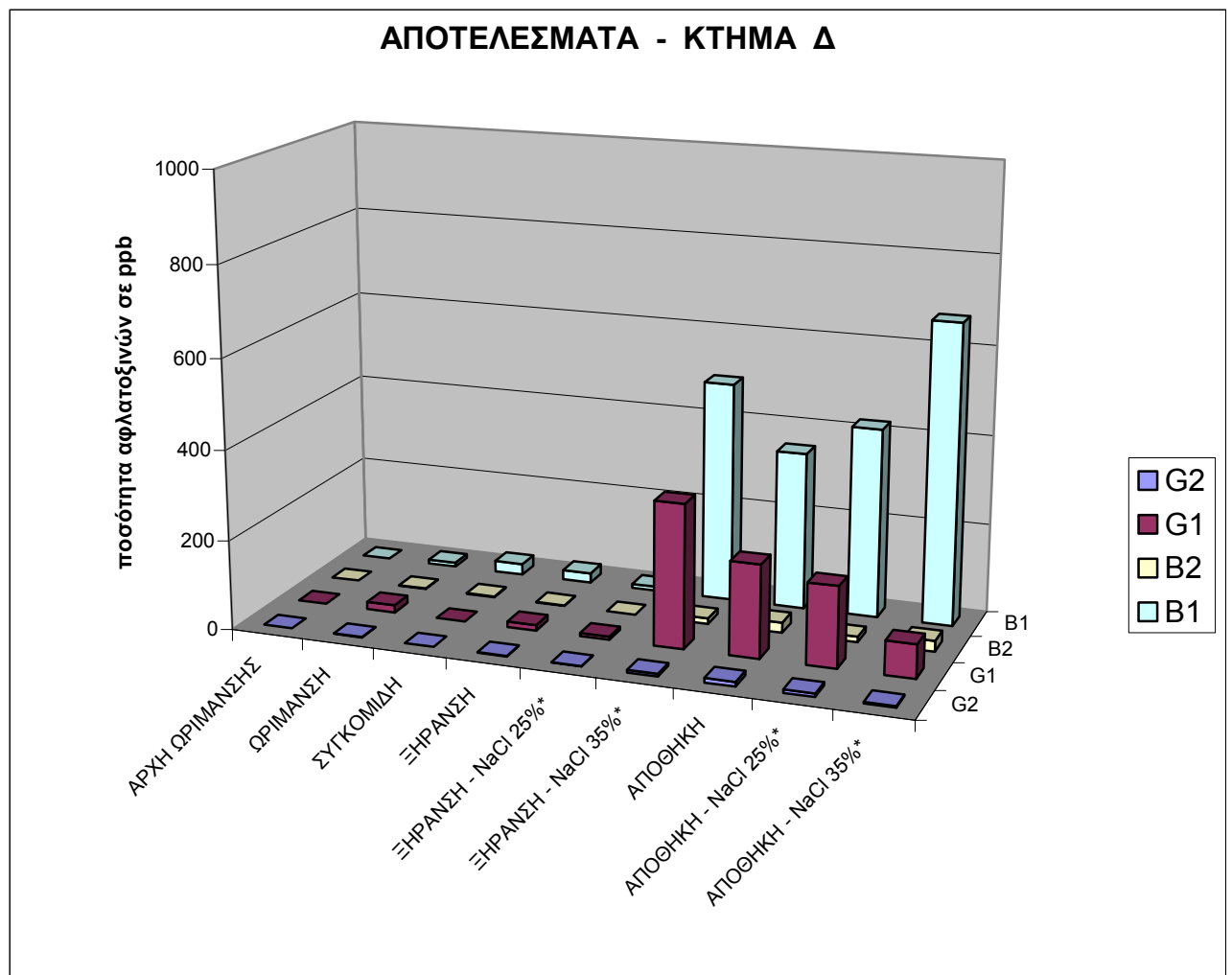
Εικόνα Γ.4.6 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: Κτήμα Δ – 2^η Δειγματοληψία (Ωρίμανση – 13/08/08)



Εικόνα Γ.4.6 Χρωματογράφημα από την ανάλυση του Δείγματος: Κτήμα Δ – 4^η Ξήρανση (1/9/08)



Διάγραμμα Γ.4.4 Κτήμα Δ - Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια



Γ.4.4.1 Στατιστική επεξεργασία - Κτήμα Δ Δείγματα Αγρού

Η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική ποσότητα αφλατοξίνης (total aflatoxin). Συνεπώς, με τη Μέθοδο Fisher (LSD) προσδιορίστηκαν ποια στάδια διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας Γ.4.4.1) και για τις δύο παραμέτρους.

Πίνακας Γ.4.4.1 Κτήμα Δ – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων: από την αρχή ωρίμανσης μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε B₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη.

| ΣΤΑΔΙΑ | B ₁ αφλατοξίνη | |
|------------------|---------------------------|------------------|
| | M.O. | ΟΜΟΓΕΝΕΙΣ ΟΜΑΔΕΣ |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,0 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% NaCl | 8,72667 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 9,11 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 22,3867 | XX |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 24,85 | XX |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 352,7 | XX |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 25% NaCl | 423,56 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% NaCl | 492,82 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 35% NaCl | 671,44 | X |
| | Συνολική αφλατοξίνη | |
| ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ | 0,0 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 25% NaCl | 16,41 | X |
| ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ | 26,7333 | X |
| ΩΡΙΜΑΝΣΗ | 28,0567 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ | 37,9633 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ | 616,937 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 25% NaCl | 623,617 | X |
| ΑΠΟΘΗΚΗ 35% NaCl | 774,21 | X |
| ΞΗΡΑΝΣΗ 35% NaCl | 831,237 | X |

Από τη στατιστική επεξεργασία φαίνεται ότι όσον αφορά το σύνολο των αφλατοξινών υπάρχουν δύο ομοιογενείς ομάδες. Τα στάδια της αποθήκευσης με ή χωρίς αλάτι φαίνεται να μην έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά, όπως και το στάδιο της ξήρανσης με την εφαρμογή 25% αλάτι. Όσον αφορά τη B₁ (3 ομοιογενείς ομάδες) φαίνεται ότι η ποσότητα στην αποθήκη να μην διαφέρει σημαντικά με την ποσότητα στη συγκομιδή και την ξήρανση, ενώ μεταξύ των επεμβάσεων με αλάτι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Γ.4.4.2 Συζήτηση - Κτήμα Δ Δείγματα Αγρού

Οι αναλύσεις των δειγμάτων αυτού του πειραματικού αγρού έδειξαν ότι σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από τα επιτρεπτά όρια με εξαίρεση την 1^η δειγματοληψία στο στάδιο «αρχή ωρίμανσης». Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα στο στάδιο της αποθήκευσης υπήρξε μια δραματική αύξηση της ποσότητας αφλατοξίνης τόσο στο κανονικό δείγμα όσο και σε αυτά όπου είχε εφαρμοστεί η εμφύσηση αλάτος πριν τη ξήρανση. Αυτή η μεγάλη αύξηση είναι πιθανό να οφείλεται στον τρόπο αποθήκευσης η οποία έγινε σε ιδιόκτητη αποθήκη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χωρίς καμία μέριμνα ως προς την υγιεινή του χώρου. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το δείγμα αποθήκευσης (ιδιαίτερα αυτό με 35% αλάτι) είχε πολύ μεγάλη προσβολή από προνύμφες σκώρου, οι οποίες έκαναν και τον καθαρισμό του δείγματος ιδιαίτερος δύσκολο.

Πριν τη συγκομιδή, ανιχνεύθηκε ποσότητα αφλατοξίνης πάνω από το όριο από το στάδιο της ωρίμανσης, η οποία όπως φαίνεται και από τα δείγματα ταυτοποίησης (Διάγραμμα Γ.3.4, Πίνακας Γ.3.4.A και Γ.3.4.B) βρίσκεται κυρίως στους προβληματικούς καρπούς. Μετά την αποφλοιώση και ξήρανση αν και ένα μεγάλο ποσοστό προβληματικών καρπών αφαιρέθηκε η ποσότητα αφλατοξίνης που ανιχνεύθηκε ήταν περίπου ίση με αυτή της συγκομιδής. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε επιμόλυνση κατά την ξήρανση η οποία έγινε στον ήλιο και σε ανοικτό χώρο είτε κατά την αποφλοιώση με το νερό της αποφλοιώσης είτε σε μόλυνση των υγιών καρπών από το στάδιο της συγκομιδής όπου οι καρποί ωριμάζοντας γίνονται πιο ευάλωτοι. Αυτό φάνηκε και στα δείγματα ταυτοποίησης (Πίνακας Γ.3.4.B, Διάγραμμα Γ.3.4.) της συγκομιδής όπου και στους υγιείς καρπούς ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη αλλά και η παρουσία του *A.flavus* ήταν αριθμητικά σημαντική.

Όσον αφορά την εφαρμογή αλάτος πριν τη ξήρανση δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ του κανονικού δείγματος ξήρανσης και αυτού με 25% αλάτι ως προς τη ποσότητα αφλατοξίνης. Αντίθετα, στο δείγμα ξήρανσης με 35% αλάτι ανιχνεύθηκε πολύ υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης ίση με των δειγμάτων αποθήκευσης. Επιπλέον, στα αντίστοιχα δείγματα ταυτοποίησης δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε κανένα από το στάδιο της ξήρανσης (Πίνακας Γ.3.4.B) ούτε ως προς την παρουσία του *A.flavus* υπήρχε διαφορά. Επίσης, δεν υπήρξε καμία διαφοροποίηση στους χειρισμούς αυτού του δείγματος κατά την ξήρανση και την αποθήκευση διότι όλα τα δείγματα ήταν στον ίδιο χώρο. Η μοναδική διαφορά που σημειολογήθηκε αφορά την ύπαρξη πολλών

προνομφών σκόρου σε αυτό το δείγμα χωρίς να υπάρχουν μετρήσεις σε σχέση με το κανονικό δείγμα ξήρανσης και αυτό με 25% αλάτι. Παρατήρηση η οποία έγινε και μεταξύ των δειγμάτων αποθήκευσης. Γενικότερα, πιθανόν αυτό να είναι ένα παράδειγμα της έντονης ανομοιογένειας που υπάρχει στη μόλυνση των καρπών από αφλατοξίνες³², όπου η ύπαρξη ελάχιστων μεμονωμένων καρπών (1 στους 10^4 - 10^6) με πολύ υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης μπορεί να θέσει εκτός επιτρεπτών ορίων το συνολικό δείγμα^{32,50}.

Γ.4.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων όλων πειραματικών αγρών

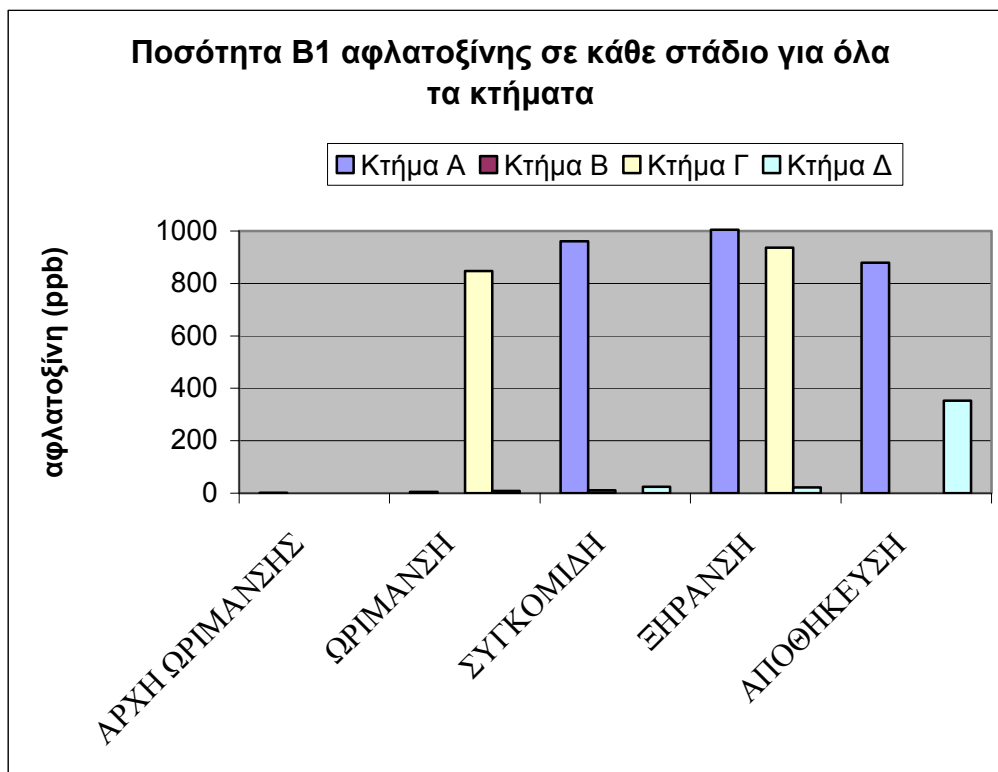
Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας Γ.4.5.1 έως και Γ.4.5.5) και το διάγραμμα Γ.4.5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων των αναλύσεων των δειγμάτων αγρού ως προς την ύπαρξη αφλατοξινών (B1 και σύνολο αφλατοξινών) σε κάθε στάδιο παραγωγής για όλα τα κτήματα. Η ανάλυση παραλλακτικότητας αυτών των δεδομένων έδειξε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των αγρών εφαρμόζοντας τη δοκιμή Fisher (LSD) φαίνεται σε κάθε στάδιο ποιος πειραματικός αγρός διαφέρει.

Πίνακας Γ.4.5.1 Στάδιο «αρχή ωρίμανσης» – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών

| B₁ αφλατοξίνη | | |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,0 | X |
| Γ | 0,0 | X |
| Δ | 0,0 | X |
| A | 1,79 | X |
| Συνολική αφλατοξίνη | | |
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,0 | X |
| Γ | 0,0 | X |
| Δ | 0,0 | X |
| A | 1,79 | X |

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι στο στάδιο «αρχή ωρίμανσης» δηλαδή στην 1^η δειγματοληψία διαφέρει το Κτήμα A τόσο ως προς την B₁ όσο και ως προς τη συνολική αφλατοξίνη.

Διάγραμμα Γ.4.5.2. Αναλύσεις δειγμάτων αγρού ως προς B₁ αφλατοξίνη σε κάθε στάδιο για όλους τους πειραματικούς αγρούς



Πίνακας Γ.4.5.2 Στάδιο «ωρίμανση» – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών

| B ₁ αφλατοξίνη | | |
|---------------------------|----------|--------------------|
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,603333 | X |
| A | 4,94333 | X |
| Δ | 9,11 | X |
| Γ | 847,137 | X |
| Συνολική αφλατοξίνη | | |
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,603333 | X |
| A | 8,17 | X |
| Δ | 28,0567 | X |
| Γ | 967,573 | X |

Στη 2^η δειγματοληψία, στο στάδιο «ωρίμανση», σε όλα τα κτήματα ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από τα επιτρεπτά όρια με εξαίρεση το Κτήμα Β. Στατιστικά σημαντικά διαφέρει μόνο το Κτήμα Γ λόγω της πολύ υψηλής ποσότητας αφλατοξινών. Αυτή η έντονη διαφορά δείχνει να σχετίζεται άμεσα με τη γενικότερη

εικόνα του Κτήματος Γ ως προς την κατάσταση των προσβολών από έντομα (μεγάλο ποσοστό προσβεβλημένων καρπών από ευρύτομο) και τη γενικότερη εικόνα εγκατάλειψης (Πίνακας Γ.1.3, Εικόνα Γ.1.3). Στο άλλο άκρο, στο Κτήμα Β όπου υπήρχε προσβολή σε λίγα μεμονωμένα δένδρα και το κτήμα ήταν γενικά περιποιημένο, αρδεύονταν κανονικά και έγιναν επεμβάσεις με φυτοπροστατευτικά προϊόντα για την καταπολέμηση της ψύλλας της φιστικιάς ανιχνεύθηκε πολύ μικρή ποσότητα αφλατοξίνης, κάτω από τα επιτρεπτά όρια (Πίνακας Γ.1.2, Εικόνα Γ.1.2). Αντίστοιχα, τα κτήματα Α και Δ ήταν περιποιημένα, αρδεύονταν κανονικά και υπήρχε μέτρια προσβολή από ευρύτομο, σκώρο και άλλα έντομα της φιστικιάς (Πίνακας Γ.1.1, Γ.1.4) ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από τα επιτρεπτά όρια, αλλά όχι στα επίπεδα του Κτήματος Γ.

Πίνακας Γ.4.5.3 Στάδιο «συγκομιδή» – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών

| Β₁ αφλατοξίνη | | |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|
| Κτήματα | Μ.Ο. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 10,42 | X |
| Δ | 24,85 | X |
| A | 961,277 | X |
| Συνολική αφλατοξίνη | | |
| Κτήματα | Μ.Ο. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 11,34 | X |
| Δ | 26,7333 | X |
| A | 1184,31 | X |

Στο στάδιο της συγκομιδής δεν συλλέχθηκε δείγμα από το Κτήμα Γ λόγω μικρής παραγωγής αλλά και λόγω του ότι ο παραγωγός συγκόμισε πολύ κοντά στη 2^η δειγματοληψία (1 εβδομάδα μετά). Όσον αφορά τα υπόλοιπα κτήματα, σε όλα ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από το όριο. Στατιστικά σημαντική διαφορά έχει το Κτήμα Α με πολύ υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης αν και εμφάνιζε μέτρια εικόνα ως προς τις προσβολές. Βέβαια μεμονωμένα δένδρα κυρίως ακριανά είχαν πολύ υψηλά ποσοστά προσβολής κυρίως από ευρύτομο.

Πίνακας Γ.4.5.4 Στάδιο «ξήρανση» – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών

| B₁ αφλατοξίνη | | |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,223333 | X |
| Δ | 22,3867 | X |
| Γ | 936,473 | X |
| A | 1005,04 | X |
| Συνολική αφλατοξίνη | | |
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,223333 | X |
| Δ | 37,9633 | X |
| Γ | 1088,64 | X |
| A | 1143,34 | X |

Στο στάδιο της ξήρανσης στατιστικά σημαντικά διαφέρουν το Κτήμα Γ και Α στα οποία ανιχνεύθηκε πολύ υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης. Στην παραπάνω στατιστική επεξεργασία δεν λήφθηκαν υπ' όψιν τα αποτελέσματα αναλύσεων των δειγμάτων στα οποία είχε εφαρμοστεί εμβάπτιση σε 25% και 35% αλάτι, αλλά μόνο τα κανονικά της ξήρανσης. Στο Κτήμα Β ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε όρια κάτω από το επιτρεπτό. Αυτός είναι και ο μοναδικός πειραματικός αγρός όπου η ξήρανση δεν έγινε στον ήλιο αλλά σε ξηραντήριο.

Πίνακας Γ.4.5.5 Στάδιο «αποθήκη» – Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών

| B₁ αφλατοξίνη | | |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,0 | X |
| Δ | 352,7 | X |
| A | 879,477 | X |
| B₁ αφλατοξίνη | | |
| Κτήματα | M.O. | Ομοιογενείς ομάδες |
| B | 0,0 | X |
| Δ | 616,937 | X |
| A | 1047,47 | X |

Ομοίως και στο στάδιο της αποθήκευσης δεν συλλέχθηκε δείγμα από το Κτήμα Γ λόγω μικρής παραγωγής. Από τα υπόλοιπα κτήματα, διέφεραν όλα στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Στο Κτήμα Α και Δ ανιχνεύθηκαν υψηλά ποσοστά

αφλατοξίνης με το Α να ξεπερνά τα 1000ppb συνολική αφλατοξίνη. Αντίθετα, στο Κτήμα Β δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη. Ένας πολύ σπουδαίος παράγοντας που διαφοροποιεί τα τρία αυτά κτήματα είναι ότι στο μόνο κτήμα που δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη (Κτήμα Β) η αποθήκευση έγινε σε ψυγείο σε θερμοκρασία 5-7°C και 45-60% σχετική υγρασία. Αντίθετα στα υπόλοιπα κτήματα η παραγωγή αποθηκεύθηκε σε ιδιόκτητες αποθήκες σε θερμοκρασία και σχετική υγρασία περιβάλλοντος. Εξάλλου, οι καρποί του Κτήματος Β είχαν τη μικρότερη επιμόλυνση σε όλα τα προηγούμενα στάδια και επομένως έφθασαν στο στάδιο της αποθήκευσης χωρίς ιδιαίτερο φορτίο.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ.1. ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ

Δ.1.1 Συσχέτιση με τα στάδια παραγωγής

Η μελέτη για την μόλυνση από αφλατοξίνη στα κελυφωτά φιστίκια πραγματοποιήθηκε σε όλες τις φάσεις παραγωγής. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μόλυνση με αφλατοξίνη είναι πιθανό να συμβεί σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας, από το δέντρο μέχρι και την αποθήκευση. Ειδικότερα:

Δ.1.1.1 Παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή

- Αφλατοξίνη ανιχνεύθηκε από τη φάση της ωρίμανσης (2^η δειγματοληψία) στις 13-8-08 και μάλιστα στα 3 από τα 4 κτήματα σε ποσότητες πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Ιδιαίτερα στο Κτήμα Γ η Β₁ ανιχνεύθηκε στα 847ppb.

Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι

- α) η αφλατοξίνη παρήχθη πριν τη συλλογή, όταν ακόμη οι καρποί ήταν στα δέντρα
 - β) το στάδιο της ωρίμανσης είναι το πιο κρίσιμο στάδιο για την μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνη.
- Η ποσότητα της αφλατοξίνης αυξήθηκε κατακόρυφα προς το τέλος Αυγούστου, πλησιάζοντας προς τη συγκομιδή. Στο Κτήμα Α αυξήθηκε πάνω από 100 φορές σε σχέση με το στάδιο της ωρίμανσης.
Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκομιδή αποτελεί το πιο επιβαρυνόμενο στάδιο ως προς την ύπαρξη αφλατοξίνης.
 - Σε όλα τα στάδια, από τις 4 αφλατοξίνες ανιχνεύθηκε κυρίως η Β₁ με πολύ μεγάλη διαφορά από τις Β₂, G₁ και G₂. Η σειρά κατάταξης με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι Β₁ >>G₁ >Β₂ >G₂.

4.1.1.2 Ανάπτυξη *A.flavus* πριν τη συγκομιδή και ανίχνευση αφλατοξίνης στα δείγματα ταυτοποίησης

- Κατά την ανάλυση των δειγμάτων ταυτοποίησης βρέθηκε πολύ υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης στους προβληματικούς καρπούς (εξωτερικές δυσμορφίες, μαύρου χρώματος, προσβεβλημένους από έντομα, άσπερμους).
- Η ποσοτική ανάλυση για προσδιορισμό αφλατοξίνης έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με την ύπαρξη του *A.flavus*. Ο *A.flavus* ταυτοποιήθηκε από την 1^η δειγματοληψία (31-7-08) αλλά μόνο στους προβληματικούς καρπούς σε όλα τα κτήματα. Σε αυτά τα δείγματα ανιχνεύθηκαν και πολύ υψηλές ποσότητες αφλατοξίνης. Η απουσία *A.flavus* σε ανώριμους υγιείς καρπούς αναφέρεται στη βιβλιογραφία²⁵ και εξηγείται ότι στους ανώριμους καρπούς, με πράσινη ακόμα τη φλούδα πιθανόν να υπάρχουν μυκητοστατικές ουσίες.
- Όσο οι καρποί ωρίμαζαν περισσότερο και πλησίαζε η συγκομιδή, ο μύκητας βρέθηκε και στους φαινομενικά υγιείς καρπούς, αλλά σε λιγότερους καρπούς απ'ότι στο αντίστοιχο δείγμα των προβληματικών.

Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι

- α) οι ώριμοι καρποί γίνονται πιο ευάλωτοι στη μόλυνση από το μύκητα
 - β) αυτή την περίοδο διάφορα έντομα όπως η ψύλλα αναπτύσσονται ταχύτατα και σε μεγάλους πληθυσμούς³⁹, προσβάλλουν τους καρπούς, δημιουργούν πληγές και ευνοούν τις μολύνσεις από το μύκητα
 - γ) πιθανόν να υπάρχει επιμόλυνση των υγιών από τους μολυσμένους καρπούς δεδομένου ότι στα φιστίκια η παρουσία του *A.flavus* είναι κυρίως επιφανειακή⁴⁹ με αποτέλεσμα το μόλυσμα να μπορεί εύκολα να μεταφερθεί με τον αέρα ή το χρώμα σε ολόκληρη την περιοχή⁴⁹
 - δ) οι συνθήκες είναι πιο ευνοϊκές για την ανάπτυξη του επάνω στους καρπούς
 - ε) στους ώριμους καρπούς δεν υπάρχουν μυκητοστατικές ουσίες που να αναστέλλουν την ανάπτυξη του, όπως πιθανολογείται να υπάρχουν στους πράσινους ανώριμους καρπούς
- Στη συγκομιδή, η παρουσία του *A.flavus* είναι ίδια τόσο στο δείγμα των υγιών όσο και στο δείγμα των προβληματικών, χωρίς στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Σε αυτά τα δείγματα ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη τόσο στους υγιείς όσο και στους

προβληματικούς καρπούς. Στο Ιράν βρέθηκαν καρποί με προσβεβλημένο σπέρμα από *A.flavus* και *A.parasiticus* πάνω στο δένδρο κυρίως όμως κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξής τους²² και στις περισσότερες περιπτώσεις περιείχαν αφλατοξίνες²².

- Ο *A.flavus* ταυτοποιήθηκε σε όλα τα μέρη του καρπού (σπέρμα, κέλυφος, εξωκάρπιο). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με μελέτη στο Ιράν όπου ο *A.flavus* απομονώθηκε στο ενδοσπέρμιο των φιστικιών πριν τη συγκομιδή²⁵. Σε μελέτη όμως στην Τουρκία ο *A.flavus* βρέθηκε στην επιφανειακή μικροχλωρίδα άωρων καρπών, δεν βρέθηκε όμως σε άωρα σπέρματα ούτε σε πρόσφατα αποφλοιωμένους καρπούς^{22,25}. Η παρουσία του *A.flavus* στην επιφανειακή μικροχλωρίδα των νωπών φιστικιών αναφέρεται και σε μία μελέτη στην Καλιφόρνια⁴⁹. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται επίσης ότι οι καρποί εκτίθενται σε έναν πολύ μεγάλο αριθμό σπορίων στο φιστικεώνα αλλά λίγα από αυτά τα σπόρια τελικά έχουν την ικανότητα να εκβλαστήσουν και να αποικίσουν τους εσωτερικούς ιστούς⁴⁹.

4.1.1.3 Παραγωγή αφλατοξίνης μετά τη συγκομιδή

- Όταν η ποσότητα αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή ήταν υψηλή, ανιχνεύθηκε σε υψηλές ποσότητες και στο στάδιο της ξήρανσης, καθώς και στην αποθήκευση. Η μόλυνση των ηρητημένων καρπών με αφλατοξίνες ακόμα και σε πολύ μικρό ποσοστό θεωρείται ότι έχει μεγάλη σημασία, γιατί η παρουσία αφλατοξινών προϋποθέτει μόλυνση από τοξικογόνους μύκητες, οι οποίοι μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταχύτατα μετά τη συγκομιδή, αν καθυστερήσει η αποφλοίωση και επικρατήσουν ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους συνθήκες²².
- Στο στάδιο της ξήρανσης:
 - α) η ποσότητα αφλατοξίνης μειώθηκε σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια στην περίπτωση που
 - ο η ποσότητα κατά τη συγκομιδή ήταν σχετικά χαμηλή (10ppb)
 - ο η ξήρανση έγινε σε ξηραντήριο
 - β) η ποσότητα αφλατοξίνης παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα στην περίπτωση που

- ο πριν τη συγκομιδή είχαν ανιχνευθεί επίσης υψηλές ποσότητες
 - ο η ξήρανση είχε γίνει σε ανοιχτό χώρο στον ήλιο
- γ) σε κάθε περίπτωση κατά την αποφλοιώση απομακρύνεται ένα μεγάλο ποσοστό προβληματικών καρπών, οι οποίοι βρέθηκαν με υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης
- δ) Στους αποφλοιωμένους καρπούς μετά τη συγκομιδή οι μύκητες πρέπει να μεταφέρονται με το νερό που χρησιμοποιείται κατά την αποφλοιώση και κατά τον διαχωρισμό των άσπερων (κούφιών) φιστικιών^{22,25}
- Στο στάδιο της αποθήκευσης:
 - α) βρέθηκε αφλατοξίνη σε πολύ υψηλές ποσότητες όταν και στην ξήρανση οι ποσότητες που είχαν ανιχνευθεί ήταν υψηλές
 - β) η ποσότητα αφλατοξίνης κατά την αποθήκευση αυξήθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα με στατιστικά σημαντική διαφορά από το στάδιο της ξήρανσης, όπου οι καρποί είχαν αποθηκευτεί σε ιδιόκτητο χώρο-αποθήκη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
 - γ) αφλατοξίνη δεν ανιχνεύθηκε σε φιστίκια που είχαν αποθηκευτεί σε ψυγείο σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

4.1.1.4 Ανάπτυξη *A.flavus* μετά τη συγκομιδή και ανίχνευση αφλατοξίνης στα δείγματα ταυτοποίησης

- Η ανάπτυξη του *A.flavus* μετά την ξήρανση δεν αναστάλθηκε πλήρως, αλλά παρατηρήθηκε καθυστέρηση σε σχέση με τα άλλα στάδια. Συνεπώς η παραγωγή αφλατοξίνης σε αυτό το στάδιο δεν μπορεί να αποκλειστεί.
Η καθυστέρηση αυτή υποδεικνύει ότι:
 - α) μετά την ξήρανση η κατάσταση είναι μη ευνοϊκή για την ανάπτυξη του μύκητα (χαμηλή ενεργότητα νερού⁴⁹)
 - β) ο πληθυσμός του έχει μειωθεί πολύ
 - γ) έχουν υποστεί ζημιά τα κύτταρά του
 - δ) στη βιβλιογραφία αναφέρεται και κυριαρχία από ζύμες σε αυτό το στάδιο²⁵
- Στα δείγματα της ξήρανσης ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε χαμηλές ποσότητες (3-6 ppb) με εξαίρεση το Κτήμα Γ όπου η ποσότητα αφλατοξίνης ήταν πολύ υψηλή

- (1000ppb). Ο πειραματικός αγρός αυτός έχει περιγραφεί ως το κτήμα με το υψηλότερο ποσοστό σε προσβεβλημένους καρπούς.
- Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνιση του *A.flavus* στα δείγματα που προερχόταν από ξήρανση στον ήλιο και ξήρανση σε ξηραντήριο. Το ίδιο ισχύει και για την ανίχνευση αφλατοξίνης στα δείγματα ταυτοποίησης.
 - Στο στάδιο της αποθήκευσης ταυτοποιήθηκε *A.flavus* σε όλους τους πειραματικούς αγρούς.
 - Στον πειραματικό αγρό όπου η αποθήκευση είχε γίνει σε ψυγείο παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού του *A.flavus* σε σχέση με το στάδιο της ξήρανσης. Αυτό δεν παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους πειραματικούς αγρούς όπου η αποθήκευση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για την ύπαρξη αφλατοξίνης.
 - Ο *A.flavus* ταυτοποιήθηκε και στο ξυλώδες ενδοκάρπιο (κέλυφος) και στο σπέρμα (ψίχα). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες^{25,49}.

Δ.1.2 Συσχέτιση με τις εντομολογικές προσβολές, δυσμορφίες καρπού, μεταχρωματισμούς καρπού και καλλιεργητικές φροντίδες στο χωράφι

- Στον πειραματικό αγρό (Κτήμα Γ) με το υψηλότερο ποσοστό προσβεβλημένων από έντομα καρπών, με ελλιπείς καλλιεργητικές φροντίδες και χωρίς άρδευση ανιχνεύθηκαν πολύ υψηλές ποσότητες αφλατοξίνης σε όλα τα στάδια –πριν και μετά τη συγκομιδή- εκτός από το πρώτο στάδιο στην αρχή της ωρίμανσης.
- Όσον αφορά την εμφάνιση του *A.flavus* δεν παρατηρήθηκε η παραπάνω διαφοροποίηση δεδομένου ότι σε όλους τους πειραματικούς αγρούς ο *A.flavus* είχε ισχυρή παρουσία σε όλα τα στάδια αλλά ιδιαίτερα στους προβληματικούς καρπούς όλων των κτημάτων. Όμως, η ποσότητα αφλατοξίνης στα δείγματα ταυτοποίησης του Κτήματος Γ ήταν υψηλότερη των υπολοίπων κτημάτων με εξαίρεση το πρώτο δείγμα στην αρχή της ωρίμανσης, στο οποίο επικρατούσε ο *A.niger*.

- Στον πειραματικό αγρό με το μικρότερο ποσοστό προσβεβλημένων καρπών (Κτήμα Β) δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη ή ανιχνεύθηκε οριακά πάνω από τα επιτρεπτά όρια μόνο στη συγκομιδή. Όμως ως προς την εμφάνιση του *A.flavus* δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά με τους υπόλοιπους πειραματικούς αγρούς.
- Στο Κτήμα Δ, όπου η υπήρχε σημαντική προσβολή από ψύλλα και βρωμούσα και ένα μικρό ποσοστό προσβολής από ευρύτομο και σκώρο ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη πάνω από τα επιτρεπτά όρια, όχι όμως στα επίπεδα του Κτήματος Γ. Πολύ υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης ανιχνεύθηκε κυρίως στην αποθήκευση όπου εντοπίστηκε πολύ υψηλή προσβολή από σκώρο και άλλα έντομα αποθήκης.
- Στο Κτήμα Α, όπου το ποσοστό προσβεβλημένων καρπών μπορεί να χαρακτηριστεί μέτριο (εντοπισμένες προσβολές σε μεμονωμένα δένδρα κυρίως στα άκρα) αλλά οι καλλιεργητικές φροντίδες ήταν ικανοποιητικές ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε υψηλά επίπεδα από το στάδιο της συγκομιδής και μετά.
- Σε αντιστοιχία, στο ίδιο Κτήμα Α η εμφάνιση του *A.flavus* στη συγκομιδή είχε στατιστικά σημαντική διαφορά με τα υπόλοιπα κτήματα (Δ και Β) και στα ίδια δείγματα ταυτοποίησης ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε υψηλά επίπεδα.
- Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η κατάσταση των κτημάτων όσον αφορά τις προσβολές από έντομα σχετίζεται με την ποσότητα αφλατοξίνης που ανιχνεύεται. Ως προς την ύπαρξη αφλατοξίνης η γενικότερη κατάταξη των κτημάτων είναι : Κτήμα Γ >> Κτήμα Α > Κτήμα Δ > Κτήμα Β.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ο *A.flavus* είναι παθογόνο το οποίο εισβάλλει τους φυτικούς ιστούς στα σημεία που έχουν υποστεί ζημιές από έντομα^{28,33}, ζώα πουλιά⁴¹, από σχίσσιμο λόγω ωρίμανσης και από τη συγκομιδή^{28,40}. Στην Αυστραλία, αναφέρεται ότι η μεγαλύτερη προσβολή από τον *A.flavus* και η παραγωγή αφλατοξίνης συμβαίνει κυρίως πριν τη συγκομιδή στην αραχίδα⁴⁴ και ότι οι μηχανικές ζημιές αυξάνουν την ευαισθησία των καρπών στην προσβολή από τον *A.flavus*⁴⁴. Στις Η.Π.Α. πάνω στο δένδρο οι μύκητες αυτοί προσβάλλουν συνήθως τους καρπούς των οποίων η φλούδα έχει σχιστεί πρόωρα (early splits) ή φέρει σκασίματα από υπερωρίμανση (tattering) ή φαγώματα από πουλιά²². Επίσης προσβάλλουν σπέρματα, τα οποία φέρουν φαγώματα από έντομα (στις ΗΠΑ το

Amyeloidis transitella)²². Άλλες μελέτες δείχνουν μία συσχέτιση των καρπών με σκούρο χρωματισμό, προσβεβλημένων από έντομα και των καρπών με διάρρηξη του εξωκαρπίου είτε λόγω πρόωρου σχισίματος (early splitting) είτε υπερωρίμανσης, με την μόλυνση με μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες⁴⁰ και την ύπαρξη αφλατοξίνης⁴¹ σε υψηλές συγκεντρώσεις⁵⁰. Επίσης, η συγκέντρωση αφλατοξίνης σε αμύγδαλα αναφέρεται ότι σχετίζεται με την προσβολή από έντομα³⁶. Στα αμύγδαλα, διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι καρποί υγιείς, χωρίς προσβολές από έντομα δεν μολύνθηκαν με αφλατοξίνη³⁶. Το ίδιο αναφέρεται και στα κελυφωτά φιστίκια⁴⁹. Γενικότερα, οι καρποί με οποιαδήποτε μορφής ζημιά στο εξωκάρπιο είναι αυτοί που κυρίως συνεισφέρουν στην ύπαρξη του *A.flavus* καθώς και στη μόλυνση με αφλατοξίνες^{41,49}. Οι καρποί κακής ποιότητας που παρουσιάζουν μεταχρωματισμούς, παραμορφώσεις, υπολείμματα περικαρπίου κ.τ.λ. είναι συχνά μολυσμένοι με αφλατοξίνες. Έχει αποδειχθεί ότι ο φλοιός του κελυφωτού φιστικιού όταν είναι άθικτος προστατεύει το σπέρμα κατά την ανάπτυξη στο χωράφι⁵⁰. Επομένως, οποιοδήποτε μέτρο που μειώνει την πιθανότητα να πάθει ζημιά ο φλοιός μειώνει τον αριθμό των προσβεβλημένων με αφλατοξίνη καρπών⁵⁰. Υπό αυτό το πρίσμα ο ρόλος των εντόμων είναι πολύ σημαντικός στην μόλυνση με αφλατοξίνη⁵⁰.

Ερευνητές θεωρούν πιθανό οι τοξικογόνοι μύκητες να διεισδύουν στα σπέρματα μέσω της κοιλιακής ραφής⁵⁰ ή στους καρπούς των οποίων το ενδοκάρπιο δεν έχει ανοίξει από το σημείο πρόσφυσης του ποδίσκου²². Έχει παρατηρηθεί ότι ο μύκητας αναπτυσσόταν στην περιοχή του πλακούντα, γι' αυτό και η περιοχή των κοτυληδόνων είχε καφετί χρώμα⁵⁰. Αναφέρεται επίσης ότι το αγγειακό σύστημα των φιστικιών μπορεί να λειτουργήσει ως οδός διείσδυσης για τη μόλυνση του σπέρματος από τον *A.flavus*⁵⁰. Η παρουσία αφλατοξίνης σε καφετί χρώματος σπέρματα έχει αποδειχθεί⁵⁰, επομένως η διαλογή και απομάκρυνση τέτοιων καρπών μειώνει την περιεκτικότητα του προϊόντος σε αφλατοξίνες^{22,46,49}. Σε προηγούμενη μελέτη στην Ελλάδα για την μόλυνση των κελυφωτών φιστικιών με αφλατοξίνες²⁴ με ημι-ποσοτική ανάλυση αποδείχθηκε ότι το μόλις το 5% των υγιών καρπών βρέθηκαν θετικοί στην αφλατοξίνη, ενώ το 30% των καρπών με προσβολή στο σπέρμα και το 70% των καρπών με καφέ-μαύρο σπέρμα ήταν θετικό στην αφλατοξίνη. Στην ίδια μελέτη η ύπαρξη αφλατοξίνης συνδέθηκε άμεσα με τους προσβεβλημένους από έντομα καρπούς²⁴.

Τα παραπάνω δεν σημαίνουν αυτόματα ότι οι εξωτερικά υγιείς καρποί δεν έχουν αφλατοξίνη. Μάλιστα σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι στα φιστίκια βρέθηκαν υψηλές ποσότητες αφλατοξίνης και σε σπέρματα στα οποία δεν υπήρχε εμφανής εντομολογική προσβολή⁴² αν και δεν είναι σαφές οι υγιείς καρποί σε τι ποσοστό συνεισφέρουν στη γενικότερη μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνη⁴⁹. Παρ'όλα αυτά η διαλογή των καρπών βάσει της εμφάνισής τους είτε με το χέρι είτε μηχανικά έχει αποδειχθεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μείωση της αφλατοξίνης^{22,24,43}. Μάλιστα, το αυτοματοποιημένο σύστημα οπτικού διαχωρισμού των καρπών με άσχημη εξωτερική εμφάνιση π.χ. με εντομολογικές προσβολές μείωσε την αφλατοξίνη από τα 8.6ppb στα 0.04ppb⁴³.

Ένα άλλο σύστημα διαλογής και απόρριψης των «ύποπτων» με αφλατοξίνη καρπών είναι βάσει της ιδιότητας του φθορισμού που έχει ο *A.flavus*⁵⁰ (Εικόνα Δ.1.2.1)²⁴. Πιο συγκεκριμένα, με βάση την ιδιότητα του πρασινο-κίτρινου φθορισμού (BGYF – Bright Greenish Yellow Fluorescence) που έχουν τα κύτταρα του *A.flavus* κάτω από UV δοκιμάστηκε στα φιστίκια σε μήκος κύματος 420 και 490nm σαν τρόπος ανίχνευσης των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών⁵⁰. Για να δημιουργηθεί φθορισμός θα πρέπει να συμβούν 3 πράγματα: 1) Ο *A.flavus* να μολύνει ένα φυτικό ιστό και να αναπτυχθεί μέχρι ένα βαθμό, 2) να σχηματιστεί ο γνωστός μεταβολίτης του *A.flavus* το κογικό οξύ και αυτός 3) να μετασχηματιστεί σε μία ή περισσότερες φθορίζουσες ενώσεις⁵⁰. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε και δεν θεωρήθηκε αξιόπιστη λόγω του ότι και άλλα είδη μυκήτων εκτός του *A.flavus* είναι δυνατό να παράγουν φθορίζουσες ουσίες⁵⁰. Επίσης στην Ελλάδα, σε προηγούμενη μελέτη²⁴ για την μόλυνση των φιστικιών από αφλατοξίνη είχε δοκιμαστεί ο φθορισμός των καρπών σε UV ως μέθοδος ανίχνευσης των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν μονοσήμαντη σχέση μεταξύ του φθορισμού των καρπών και της ύπαρξης αφλατοξίνης, αλλά ήταν περισσότερο δείκτης της ύπαρξης του μύκητα²⁴. Όμως λόγω του ότι οι καρποί με καφετί χρώμα στο σπέρμα φθορίζουν, η απομάκρυνσή τους μειώνει σημαντικά το ποσοστό αφλατοξίνης στους καρπούς⁵⁰.

Εικόνα Δ.1.2.1 Φθορισμός στο κέλυφος των καρπών στο υπεριώδες φως²⁴



Όσον αφορά τις καλλιεργητικές φροντίδες εκτός από τις επεμβάσεις φυτοπροστασίας, η άρδευση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αφλατοξίνης. Παράγοντες στρες όπως η ξηρασία⁵² λόγω μειωμένων βροχοπτώσεων και ανεπαρκούς άρδευσης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης²⁰ καθώς και τους πληθυσμούς των αφλατοξικογόνων μυκήτων⁴⁴. Μελέτη σε αραχίδες δείχνει ότι υπό στρες ξηρασίας η παραγωγή σε αφλατοξίνη αυξάνεται αλλά παράλληλα μειώνονται οι συγκεντρώσεις φυτοαλεξινών ουσίες που σχετίζονται με την αντοχή των φυτών σε διάφορες προσβολές⁵⁵. Επιπλέον, η μειωμένη ευρωστία των δένδρων η οποία σχετίζεται με ελλειπείς καλλιεργητικές φροντίδες (κλάδεμα, λίπανση) ευαισθητοποιεί τους καρπούς σε ενδεχόμενη μόλυνση και αποικισμό από τους μύκητες⁵¹. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Δ.1.3 Συσχέτιση με τους καρπούς με κηλίδες

Τη χρονιά που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες υπήρχε πολύ έντονο το πρόβλημα της ύπαρξης καφετί χρώματος κηλίδας στο εσωτερικό του σπέρματος (Εικόνα Γ.2.24). Το σύμπτωμα αυτό είχε εντοπιστεί και σε προηγούμενη μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί για τη μόλυνση από αφλατοξίνης των ελληνικών κελυφωτών φιστικιών²⁴. Στο υπεριώδες φως, η μαύρη κηλίδα καθώς και μια ζώνη γύρω απ' αυτήν έδινε χαρακτηριστικό κιτρινοπράσινο φθορισμό²⁴ (Εικόνα Δ.1.3.1). Η εσωτερική αυτή

καφετί κηλίδα στο σπέρμα των φιστικιών που παρατηρήθηκε στη μελέτη συνδέεται με μία ασθένεια τη στιγματομύκωση²² (Εικόνα Γ.2.24, Δ.1.3.1), η οποία οφείλεται στον μύκητα *Nematospora coryli*^{22,29}. Η ασθένεια αυτή συνδέεται με τις προσβολές των φιστικιών από έντομα της τάξης Hemiptera²⁹, στον οποίον τα ρύγχη διαχειμάζει ο παθογόνος μύκητας. Το πρόβλημα με τους καρπούς αυτούς είναι ότι εκτός από την ποιοτική τους υποβάθμιση, φαίνονται εξωτερικά υγιείς ενώ ανοίγοντας το σπέρμα εμφανίζονται κόκκινο-καφέ κηλίδες. Επιπλέον, είναι ελαφρύτεροι και διαχωρίζονται κατά την αποφλοιώση μαζί με τους άσπερμους ή ανώριμους. Ανά έτος και αγρό, το πρόβλημα είναι μικρότερο ή μεγαλύτερο, αλλά το έτος που έγιναν οι δειγματοληψίες ήταν πολύ μεγάλη η ζημιά. Στους Πίνακες Γ.1.3 και Γ.1.4 αναφέρεται σαν παρατήρηση η έντονη παρουσία του εντόμου με το κοινό όνομα βρωμούσα, ημίπτερο της οικογένειας Pentatomidae η παρουσία του οποίου στο Κτήμα Γ και Δ ήταν πολύ έντονη. Τα έντομα αυτά ξέοντα και μυζώντας τους καρπούς δημιουργούν οπές απ'όπου εκτός από τη μεταφορά του *Nematospora coryli* δημιουργούν πύλη εισόδου και για άλλους μύκητες όπως ο *A.flavus*. Γενικότερα, καρποί με καφετί κηλίδες στο σπέρμα έχουν συνδεθεί με την ύπαρξη αφλατοξίνης⁵⁰ σε πολύ μεγάλο ποσοστό, πριν ή μετά τη συγκομιδή⁵⁰. Συμπερασματικά, στη συγκεκριμένη μελέτη:

- η ύπαρξη της εσωτερικής κόκκινο-καφέ κηλίδας μελετήθηκε σε σχέση με την ύπαρξη του *A.flavus* αλλά δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που είχαν κηλίδα και αυτών που δεν είχαν
- σε δείγμα το οποίο είχε αποκλειστικά καρπούς με εσωτερική κηλίδα αναπτύχθηκε τόσο ο *A.flavus* όσο και ο *A.niger*
- στην ανάλυση για αφλατοξίνη του δείγματος 30 (μισών) αποξηραμένων, υγιών εξωτερικά καρπών με εσωτερική κηλίδα βρέθηκε αφλατοξίνη στα 21ppb όταν το αντίστοιχο δείγμα προβληματικών καρπών είχε 1200ppb αφλατοξίνη
- από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ύπαρξη εσωτερικής κηλίδας στους καρπούς συνεισφέρει στο συνολικό ποσοστό αφλατοξίνης αλλά όχι στο βαθμό που συνεισφέρουν οι μαυρισμένοι, προσβεβλημένοι από έντομα καρποί.

Εικόνα Δ.1.3.1 Προσβολή της ψίχας από *Nematospora coryli* η οποία στο υπεριώδες φως φθορίζει²⁴



Δ.1.4 Συσχέτιση με τη μέθοδο ξήρανσης

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι στο στάδιο της ξήρανσης η ποσότητα αφλατοξίνης μειώθηκε σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια όταν η ποσότητα κατά τη συγκομιδή ήταν σχετικά χαμηλή (10ppb) και η ξήρανση έγινε σε ξηραντήριο. Αντίθετα, η ποσότητα αφλατοξίνης παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα όταν πριν τη συγκομιδή είχαν ανιχνευθεί υψηλές ποσότητες και η ξήρανση είχε γίνει σε ανοιχτό χώρο στον ήλιο.

Η ξήρανση στον ήλιο είναι μία συνήθης πρακτική για την αποξήρανση των φιστικιών στην Ελλάδα. Μάλιστα θεωρείται μία παραδοσιακή πρακτική, η οποία περιγράφεται στην απόφαση ένταξης του προϊόντος «Φιστίκι Αιγίνης» ως Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης³⁵. Σε προηγούμενη μελέτη στην Ελλάδα²⁴ για την μόλυνση με αφλατοξίνη των κελυφωτών φιστικιών φάνηκε μία τάση για μόλυνση με αφλατοξίνη των καρπών που είχαν αποξηρανθεί στον ήλιο. Συγκεκριμένα, από τα 8 δείγματα που εξετάστηκαν κατά το στάδιο της αποφλοιώσης και της ξήρανσης βρέθηκε αφλατοξίνη σε 4 δείγματα εκ των οποίων τα 3 είχαν αποξηρανθεί στον ήλιο. Στο 1 από τα 3 το πρόβλημα εντοπίστηκε σε υγιείς καρπούς στους οποίους δεν είχε εντοπιστεί αφλατοξίνη σε προηγούμενο στάδιο²⁴. Το 4^ο δείγμα, το οποίο ήταν οριακά θετικό με 4 ppb

αποξηράνθηκε σε ξηραντήριο και προερχόταν από κτήμα στο οποίο είχε εντοπιστεί αφλατοξίνη και πριν την ξήρανση²⁴.

Σε αντίστοιχη μελέτη στην Τουρκία²⁵ η αποξήρανση στον ήλιο μεταξύ των άλλων πρακτικών παραγωγής των φιστικιών περιγράφεται ως σχετικά πρωτόγονη μέθοδος, η οποία παρέχει προϋποθέσεις για μόλυνση από τους μύκητες που παράγουν αφλατοξίνη. Στο εγχειρίδιο Μικροβιολογίας Τροφίμων των Adams & Moss⁵² αναφέρεται ότι αν και η ξήρανση στον ήλιο είναι μία εύκολη και φθηνή λύση επαφίεται στις «ιδιοτροπίες» του καιρού. Βέβαια είναι μία ευρέως διαδεδομένη πρακτική στα ζεστά κλίματα που όμως δεν εξασφαλίζεται επαρκώς η προστασία από μόλυνση από πουλιά, τρωκτικά, έντομα και σκόνη⁵².

Η διεργασία της ξήρανσης στον ήλιο γίνεται αργά (3-4) ημέρες σε σχέση με την ξήρανση σε ξηραντήριο η οποία επιτυγχάνεται μέσα σε λίγες ώρες. Επιπλέον στο ξηραντήριο, η επιθυμητή τελική περιεκτικότητα των καρπών σε υγρασία μπορεί να ελεγχθεί και να ρυθμιστεί ανάλογα με το χρόνο ξήρανσης και τη θερμοκρασία. Αντίθετα στην αποξήρανση στον ήλιο, η τελική περιεκτικότητα σε υγρασία μπορεί να μην είναι η επιθυμητή (6%) και στην πράξη ο έλεγχος γίνεται με την «αίσθηση κατά το δάγκωμα». Τα τελευταία χρόνια, έχει αρχίσει να ελέγχεται η υγρασία του προϊόντος με υγρασιόμετρα, εφόσον το προϊόν παραδίδεται για αποθήκευση και περαιτέρω επεξεργασία (ψήσιμο) σε εμπόρους ή συνεταιριστικές οργανώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις κακής πρακτικής και σκοπιμότητας από πλευράς των παραγωγών, το φιστίκι αφήνεται με μεγαλύτερη υγρασία διότι είναι βαρύτερο. Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με μία ακατάλληλη αποθήκευση (π.χ. σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) μπορεί να δημιουργήσουν συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή αφλατοξίνης σε υψηλά επίπεδα.

Δ.1.5 Συσχέτιση με τη μέθοδο αποθήκευσης

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι στο στάδιο της αποθήκευσης βρέθηκε αφλατοξίνη σε πολύ υψηλές ποσότητες ιδιαίτερα όταν οι καρποί είχαν αποθηκευτεί σε ιδιόκτητο χώρο-αποθήκη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Παρόμοια ήταν η εικόνα και ως προς την παρουσία του *A.flavus*. Αντιθέτως, αφλατοξίνη δεν ανιχνεύθηκε σε φιστίκια

που είχαν αποθηκευτεί σε ψυγείο σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού του *A.flavus* σε σχέση με το στάδιο της ξήρανσης. Αυτό δεν παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους πειραματικούς αγρούς όπου η αποθήκευση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Η ανάπτυξη των μυκήτων είναι μία φυσιολογική κατάσταση τόσο στον αγρό όσο και στην αποθήκη⁵¹. Κατά την αποθήκευση υπάρχει πάντα ο κίνδυνος της επαναμόλυνσης των αποξηραμένων φιστικιών²². Μελέτη στο Ιράν έδειξε ότι μία αύξηση της περιόδου αποθήκευσης σε ακατάλληλες συνθήκες είχε σαν συνέπεια της αύξησης της αφλατοξίνης⁵⁰. Σε μελέτη στην Τουρκία οι αποφλοιωμένοι αποθηκευμένοι καρποί παρουσίαζαν εκτεταμένη μόλυνση από *A.flavus*^{22,25}. Σε μελέτη στην Καλιφόρνια αναφέρεται ότι ο χώρος επεξεργασίας και αποθήκευσης επηρεάζει τα σπόρια που εγκαθίστανται στους καρπούς και προέρχονται από τον αέρα⁴⁹. Θεωρείται επίσης ότι οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης εμποδίζουν αυτούς τους μύκητες να εγκατασταθούν στους εσωτερικούς ιστούς⁴⁹ και να παράγουν αφλατοξίνη. Αν και οι καρποί είναι αποξηραμένοι, δηλαδή σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού (a_w) και η ανάπτυξη του υπάρχοντος μολύσματος δεν είναι πιθανή, όμως ακόμα και μια προσωρινή έκθεση των καρπών σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων πιθανόν να οδηγήσουν σε σοβαρές μολύνσεις των εσωτερικών ιστών διότι το μολύσμα υπάρχει⁴⁹. Η σχετική υγρασία και η θερμοκρασία είναι δύο παράγοντες που επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη του μύκητα όσο και την παραγωγή αφλατοξίνης κατά την αποθήκευση των φιστικιών. Μέσω των ισόθερων καμπυλών υγρασίας στα κελυφωτά φιστίκια^{53,54} αποδείχθηκε ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία στην αποθήκευση η περιεκτικότητα σε υγρασία του καρπού μειώνεται σε κάθε τιμή ενεργότητας νερού (a_w). Έτσι, σε τιμή ενεργότητας νερού $a_w < 0.86$ η ανάπτυξη του *A.flavus* όσο και του *A.niger* παρεμποδίστηκε λόγω ανταγωνιστικής ανάπτυξης πιο ξηροφιλικών μυκήτων όπως ο *Aspergillus amstelodami*⁵⁴. Σε τιμές ενεργότητας νερού 0.87 και 0.88 αναπτύχθηκε ο *A.flavus* και ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη⁵³. Συνεπώς, οι προτεινόμενες και από τον Codex Alimentarius αλλά και από άλλους οργανισμούς συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία $< 10^\circ\text{C}$ και σχετική υγρασία $< 70\%$) είναι αρκετά ασφαλείς για την παρεμπόδιση ανάπτυξης των αφλατοξικογόνων μυκήτων όσο και της παραγωγής αφλατοξίνης^{57,58}.

Δ.2. ΕΠΕΜΒΑΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ NaCl (ΑΛΑΤΙ)

Στις τροπικές περιοχές, η αποξήρανση η οποία συνήθως γίνεται στον ήλιο, λόγω της υψηλής υγρασίας διαρκεί περισσότερο μέχρι το προϊόν να φθάσει την επιθυμητή υγρασία⁵². Έτσι, προϊόντα όπως το ψάρι συνηθίζεται πριν την ξήρανση να αλατίζεται ώστε να παρεμποδιστεί η μικροβιακή ανάπτυξη κατά την ξήρανση⁵². Σκοπός της εφαρμογής 25% και 35% διαλύματος NaCl στα φιστίκια πριν την ξήρανση στον ήλιο ήταν να δούμε εάν η παρουσία άλατος και η επακόλουθη μείωση της a_w επηρεάζει την ανάπτυξη των μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνη (*Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*) και την παραγωγή αφλατοξίνης. Το ποσοστό διαλύματος 25% σε αλάτι είναι όμοιο με την ποσότητα άλατος που προστίθεται στο προϊόν στην πράξη πριν το ψήσιμο.

Είναι δεδομένο ότι το αλάτι έχει συντηρητική ικανότητα η οποία συνίσταται στη μείωση της τιμής της ενεργότητας νερού του τροφίμου (a_w) και συνεπώς την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ή την καταστροφή τους λόγω πλασμόλυσης. Όλες οι δραστηριότητες των μυκήτων σε κυτταρικό επίπεδο απαιτούν νερό σε υγρή μορφή και όταν το νερό δεσμεύεται χημικά σε πυκνά διαλύματα αλάτων δεν είναι πλέον διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς. Οπότε όσο χαμηλότερη ενεργότητα νερού (διαθέσιμο νερό στους μικροοργανισμούς) έχει ένα τρόφιμο τόσο περισσότερο εμποδίζεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών και το τρόφιμο γίνεται ασφαλέστερο. Βέβαια, έχει βρεθεί ότι οι διάφοροι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ζύμες) έχουν διαφορετικές απαιτήσεις σε νερό, άρα και διαφορετική αντοχή. Γενικά, οι μύκητες είναι περισσότερο ανθεκτικοί από τους άλλους μικροοργανισμούς σε χαμηλές τιμές a_w . Ειδικότερα οι μύκητες που αναπτύσσονται στα φιστίκια και παράγουν αφλατοξίνες, αναφέρεται ότι είναι δυνατό να αναπτυχθούν σε ελάχιστη a_w 0,77 και να παράγουν αφλατοξίνη σε ελάχιστη a_w 0,83. Είναι σαφές ότι όσο χαμηλώνει η ενεργότητα νερού (a_w) τόσο δυσχεραίνεται η ανάπτυξη των μυκήτων και μειώνεται η πιθανότητα ύπαρξης αφλατοξίνης.

Τα αποτελέσματα ως προς την ανάπτυξη του *A.flavus* έδειξαν ότι:

- Στο Κτήμα Α δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων με το αλάτι (και οι δύο συγκεντρώσεις) και του κανονικού δείγματος της ξήρανσης

- Στο Κτήμα Δ στην ξήρανση υπήρχε μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του κανονικού δείγματος και αυτού με το 25% σε άλας ενώ με το 35% αλάτι δεν υπήρχε διαφορά. Στο δείγμα αποθήκης δεν υπήρχε αυτή η διαφορά.

Τα αποτελέσματα ως προς την μόλυνση με αφλατοξίνη έδειξαν ότι:

- Στο Κτήμα Α υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων με το διάλυμα NaCl και του κανονικού δείγματος. Βέβαια και στα τρία δείγματα ανιχνεύθηκαν πολύ υψηλές ποσότητες (Κανονικό=1143ppb, 25% NaCl=794ppb και 35% NaCl=661ppb) αφλατοξίνης. Μεταξύ του διαλύματος 25% και 35% δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά.
- Στο Κτήμα Δ στην ξήρανση υπήρχε μία διαφορά στην ποσότητα αφλατοξίνης μεταξύ του κανονικού δείγματος της ξήρανσης και αυτού με την επέμβαση με διάλυμα 25% NaCl, αλλά στατιστικά μη σημαντική. Στο δείγμα με 35% NaCl ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε πολύ υψηλά επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα της ξήρανσης (Πίνακας Γ.4.4.1)
- Στο Κτήμα Δ στην αποθήκη ανιχνεύθηκαν πολύ υψηλές ποσότητες αφλατοξίνης τόσο στο κανονικό δείγμα της αποθήκευσης όσο και σε αυτά με το διάλυμα άλατος, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Η μεγάλη διαφορά στο στάδιο της ξήρανσης μεταξύ του δείγματος με διάλυμα 35% NaCl σε σχέση με τα υπόλοιπα δεν ήταν αναμενόμενο, αλλά μπορεί να συσχετιστεί με την έντονη προσβολή του συγκεκριμένου δείγματος από σκώρο και άλλα έντομα αποθηκών. Επιπλέον, κατά την αποθήκευση και τα τρία δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε τρίχινους σάκους το ένα δίπλα στο άλλο και έτσι μπορεί να εξηγηθεί η μεγάλη αύξηση στην παραγωγή αφλατοξίνης και στα άλλα δύο δείγματα σε ποσότητες ίσες με το δείγμα 35% NaCl. Άλλη εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι το 35% αλάτι δημιούργησε συνθήκες στρες στο μύκητα με αποτέλεσμα να παραχθεί περισσότερη αφλατοξίνη αλλά αυτό είναι λιγότερο πιθανό διότι στην αποθήκευση δεν υπήρχε διαφορά με το δείγμα 25% NaCl.

Θα ήταν σημαντική μία περαιτέρω έρευνα μετρώντας το ποσοστό NaCl που τελικά κρατήθηκε στους καρπούς ώστε να υπολογιστεί ο βέλτιστος χρόνος εμβάπτισης. Επιπλέον, πιθανόν να ήταν σημαντική η επανάληψη της εφαρμογής παραλλάζοντας την εμβάπτιση με διασπορά του άλατος σε ξηρή μορφή επάνω στους καρπούς πριν την ξήρανση.

Δ.3. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *A.FLAVUS* – *A.NIGER*

Στα δείγματα ταυτοποίησης, στους υγιείς καρπούς απομονώθηκαν τόσο ο *A.flavus* όσο και ο *A.niger* σε όλα τα στάδια από την ωρίμανση μέχρι και την αποθήκευση. Σε ορισμένα δείγματα κυριαρχούσε ο *A.niger* και σε άλλα ο *A.flavus* όπως περιγράφεται στα αποτελέσματα. Η ύπαρξη των μυκήτων αυτών και σε υγιείς καρπούς στα διάφορα στάδια παραγωγής αναφέρεται και έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία⁴⁹. Γενικότερα φαίνεται ότι οι χειρισμοί των καρπών πριν και μετά τη συγκομιδή έχουν μεγάλη επίδραση στη μικροχλωρίδα που υπάρχει και ότι φιστίκια προσβεβλημένα από μύκητες συνήθως αποικίζονται από διάφορα είδη και όχι από ένα⁴⁹. Υπάρχει περιορισμένη πληροφόρηση σχετικά με τη σχέση του *A.flavus* και των άλλων μυκήτων που υπάρχουν στους καρπούς, αν και αυτές οι σχέσεις μπορεί να επηρεάζουν την ίδια την προσβολή, την παραγωγή αφλατοξίνης και τον βιολογικό έλεγχο⁴⁹. Στην παρούσα μελέτη ο μύκητας που κυριαρχούσε μαζί με τον *A.flavus* ήταν ο *A.niger* εικόνα η οποία αναφέρεται και σε αντίστοιχη μελέτη στην Καλιφόρνια⁴⁹.

Δ.3.1 Παρουσία και Σημασία του *A.niger*¹⁶

Οι μαύροι ασπεργίλλοι είναι πιο κοινοί απ'ότι οποιοδήποτε άλλη ομάδα του γένους των ασπεργίλλων. Είναι παγκοσμίως διαδεδομένοι και μπορούν και αναπτύσσονται σε μια τεράστια ποικιλία υποστρωμάτων όπως: σιτηρά, ζωοτροφές, αλλοιωμένα φρούτα και λαχανικά, βαμβακερά και άλλα υφάσματα, δερμάτινα, γαλακτοκομικά και άλλα πλούσια σε πρωτεΐνες υποστρώματα, καθώς και φυτικά υπολείμματα σε αποσύνθεση. Είναι παρών σε όλα τα εδάφη και εμφανίζεται κυρίως σε εδάφη από τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Συνήθως αναπτύσσεται ως σαπρόφυτο σε νεκρούς φυτικούς ιστούς ή άλλα οργανικά υλικά, αλλά υπό συγκεκριμένες συνθήκες είναι και φυτοπαθογόνος σε μερικά φυτά (π.χ. σήψη κορφής αραχίδας). Ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Με εξαίρεση τους μύκητες της ομάδας του *A.flavus* είναι αναμφισβήτητα ο πιο διαδεδομένος μύκητας στη βιομηχανία. Επιπλέον, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του *A.niger* στα μέταλλα, ορισμένα στελέχη χρησιμοποιούνται σαν οργανισμοί-δείκτες για τον προσδιορισμό τροφωπενίας σε μεταλλικά ιόντα στα εδάφη (P, K και άλλα

ιχνοστοιχεία όπως Cu, Zn κ.α.). Λόγω της κοσμοπολίτικης διάδοσής του υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία για τον *A.niger*.

Δ.3.2. Αλληλεπίδραση *A.niger* – *A.flavus*

Ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A.flavus* είναι η παρουσία και η αλληλεπίδραση με άλλους μικροοργανισμούς⁴⁶ και ιδιαιτέρως με τον *A.niger*. Στην Τουρκία, σε μελέτη για την μόλυνση των φιστικιών με αφλατοξίνη ο μύκητας που προσδιορίστηκε ότι κυριαρχεί στο έδαφος ήταν ο *A.niger*, ενώ ο *A.flavus* προσδιορίστηκε σε πολύ μικρότερο ποσοστό²⁵. Τόσο ο *A.niger* όσο και ο *A.flavus* απομονώθηκαν στην επιφανειακή μικροχλωρίδα (φλούδα) των άωρων φιστικιών²⁵ όμως ο *A.flavus* δεν βρέθηκε σε άωρα σπέρματα ούτε σε πρόσφατα αποφλοιωμένους καρπούς²⁵. Στους αποξηραμένους καρπούς ο *A.flavus* προσδιορίστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους νωπούς²⁵. Επίσης, και οι δύο μύκητες απομονώθηκαν στα υπολείμματα και στη σκόνη από το δάπεδο των αποθηκών²⁵. Αντίθετα, σε μελέτη στο Ιράν τόσο ο *A.flavus* όσο και ο *A.niger* απομονώθηκαν από άωρα σπέρματα⁴¹ όπως και στην παρούσα μελέτη. Γενικά φαίνεται ότι στα φιστίκια η μόλυνση από *A.flavus* και *A.niger* είναι περισσότερο επιφανειακή⁴⁹.

Ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ του *A.flavus* και *A.niger* αναφέρεται στη βιβλιογραφία^{2,44,46,54}. Στην αραχίδα αναφέρεται ότι όταν η αναλογία ώριμων καρπών αραχίδας οι οποίοι είχαν ενοικιστεί με τον *A.flavus* και τον *A.niger* ήταν >19:1 υπήρχε μόλυνση από αφλατοξίνη^{2,46}. Όταν η αναλογία αυτή ήταν <9:1 δεν υπήρχε². Ενώ ο *A.flavus* και ο *A.niger* έχουν παρόμοιες τιμές (ελαχ, μέση, μέγιστη) για τη θερμοκρασία, ο *A.flavus* αναπτύσσεται σε ελάχιστη aw 0,78, τιμή πολύ χαμηλή για να αναπτυχθεί ο *A.niger* (ελάχιστη aw 0.88)². Ο *A.flavus* αναφέρεται ότι κυριαρχεί σε ζεστές και ξηρές συνθήκες⁴⁴. Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης είναι η ανταγωνιστική σχέση των μυκήτων *A.flavus* και *A.niger* όπως αναφέρεται σε μια μελέτη στην Τουρκία⁵⁴. Σε αυτή την μελέτη, ανιχνεύθηκε μεγαλύτερη ποσότητα αφλατοξίνης στους καρπούς που είχαν υποστεί επιφανειακή αποστείρωση, ενώ στους μη-αποστειρωμένους επιφανειακά καρπούς η παρουσία και άλλων μυκήτων και κυρίως του *A.niger* λειτούργησε ανταγωνιστικά και η συγκέντρωση αφλατοξίνης ήταν μικρότερη⁵⁴.

Σε άλλες μελέτες⁴⁹ αναφέρεται θετική συσχέτιση μεταξύ του *A.flavus* και του *A.niger* και γενικά μεταξύ των ειδών του γένους *Aspergillus*: φιστίκια προσβεβλημένα από ένα είδος ήταν πιο πιθανό να αποικιστούν και από άλλο είδος⁴⁹. Αυτή η θετική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε σε όλα τα είδη των ξηρών καρπών⁴⁹. Γενικότερα, φιστίκια που είχαν προσβληθεί από τον *A.niger* βρέθηκαν με υψηλότερη πιθανότητα να περιέχουν και *A.flavus*⁴⁹. Δίδονται διάφορες εξηγήσεις για αυτή την αλληλεπίδραση. Μία εξήγηση είναι ότι οι συνθήκες που ευνοούν τον ένα μύκητα ευνοούν και τον άλλο και οι καρποί εκτίθενται ταυτόχρονα και στα δύο είδη⁴⁹. Μία δεύτερη εξήγηση είναι ότι η προσβολή από το ένα είδος κάνει τον καρπό πιο ευαίσθητο στην προσβολή από το άλλο είδος⁴⁹. Θετική αλληλεπίδραση μεταξύ *A.flavus* και *A.niger* παρατηρήθηκε και στα σύκα στην Καλιφόρνια αλλά όχι στα αμύγδαλα⁴⁹.

Η αντίφαση στα αποτελέσματα των μελετών στην αραχίδα όπου αναφέρθηκε αρνητική συσχέτιση του *A.flavus* και του *A.niger* και των μελετών στα σύκα και τα φιστίκια πιθανόν να αντανακλά τις διαφορές που έχουν οι υπέργειες από τις υπόγειες καλλιέργειες στον αποικισμό από μύκητες⁴⁹. Γενικότερα, οι ιδιαιτερότητες στον αποικισμό των καρπών από τους ασπέργιλλους και οι σχέσεις μεταξύ των ειδών έχουν μεγάλη σημασία στην μόλυνση από αφλατοξίνες, δεδομένου ότι οι καρποί από το χωράφι εκτίθενται σε υψηλή ποσότητα μολύσματος μεταφερόμενο κυρίως με τον αέρα αλλά και κατά την επεξεργασία και παραμένουν στους καρπούς μέχρι και το ράφι⁴⁹. Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία άλλων μυκήτων μπορεί να μειώσει την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A.flavus*⁴⁹ κάτι το οποίο φάνηκε και στη συγκεκριμένη μελέτη ιδιαίτερα κατά την 1^η δειγματοληψία στο Κτήμα Γ στο Δείγμα Ταυτοποίησης με τους προβληματικούς καρπούς στο οποίο κυριαρχούσε ο *A.niger*. Παρόμοια μελέτη αναφέρει ότι ο *A.niger*, ο *Penicillium viridicatum* και άλλοι μύκητες μείωσαν την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A.flavus* σε συνθήκες υψηλής a_w , αλλά την αύξησαν σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού (a_w)⁴⁹. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι οι καρποί με υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης να προσβάλλονται μόνο από τον *A.flavus*⁴⁹. Επιπλέον, η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ειδών *Aspergillus* είναι σημαντική στον βιολογική αντιμετώπιση του προβλήματος⁴⁹.

Δ.4. ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ - ΠΡΟΛΗΨΗ

Γενικά, από τη μελέτη φάνηκε ότι το πρόβλημα είναι μεγάλο και τα αίτιά του εντοπίζονται κυρίως πριν τη συγκομιδή αλλά και μετά. Φαίνεται ότι παραγωγή επιβαρυνμένη με υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης από το χωράφι είναι δύσκολο έως αδύνατο να μειωθεί εντός των επιτρεπτών ορίων μετά ακόμα και να υποβληθούν σε αποφλοιώση, ξήρανση και κατάλληλη αποθήκευση. Επομένως συνιστάται πρακτικά μείωση των μολύνσεων από τους μύκητες που παράγουν αφλατοξίνη τόσο στο χωράφι όσο και μετά τη συγκομιδή.

Γενικότερα μέτρα για την Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους παρακάτω τρόπους:

- *Μέτρα πριν τη συγκομιδή*
 1. Η συγκομιδή να γίνεται όσο το δυνατό νωρίτερα. Το καλύτερο είναι οι καρποί να συλλέγονται μόλις ωριμάσουν. Αυτό αναφέρεται και στη βιβλιογραφία διότι μειώνεται και η πιθανότητα ζημιάς του φλοιού⁵⁰.
 2. Να γίνεται σωστή καταπολέμηση των εντόμων που προσβάλλουν τη φιστικιά.
 3. Να καταστρέφονται με επιμέλεια κάθε έτος οι προσβεβλημένοι από έντομα ή ασθένειες καρποί.
 4. Να πραγματοποιούνται οι απαραίτητες καλλιεργητικές φροντίδες όπως άρδευση, κλάδεμα, απομάκρυνση φυτικών υπολειμμάτων ώστε ο αγρός να διατηρείται σε υγιεινή κατάσταση. Μελέτες δείχνουν ότι τα υπολείμματα των φιστικιών καθώς και ο φλοιός είναι πολύ καλά υποστρώματα ανάπτυξης του *A.flavus*⁵⁰. Επομένως η πρακτική της απόρριψης των φλοιών των φιστικιών μέσα στο χωράφι θα μπορούσε να αυξήσει την μόλυνση από τον *A.flavus* πριν τη συγκομιδή^{50,57,58}. Ορισμένες περιοχές στο Ιράν θεωρούνται «εθισμένες» στον *A.flavus* λόγω απόρριψης στο χωράφι των πράσινων φλοιών⁵⁰.
- *Μέτρα μετά τη συγκομιδή*
 1. Η αποφλοιώση να γίνεται αμέσως μετά τη συγκομιδή. Το νερό της αποφλοιώσης θα πρέπει να είναι καθαρό προκειμένου να αποφεύγεται η επιμόλυνση και υγιών καρπών.

2. Η ξήρανση να γίνεται άμεσα ώστε να μην παραμένουν οι καρποί υγροί μέσα στους σάκους.
3. Εφόσον η ξήρανση δεν γίνεται στο ξηραντήριο αλλά στον ήλιο θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε ο χώρος που απλώνεται το φιστίκι να είναι καθαρός και να λαμβάνονται μέτρα να παραμένει καθαρός, μακριά από έντομα και τρωκτικά. Να μην απλώνεται σε περισσότερες από μία στρώσεις και να μαζεύεται όταν ο καιρός είναι υγρός.
4. Μετά την ξήρανση συνίσταται να ελέγχεται η υγρασία των αποξηραμένων καρπών. Υγρασία καρπού περίπου στο 6% είναι ικανοποιητική για να οδηγηθεί ο καρπός στην αποθήκευση.
5. Η διαλογή μετά την ξήρανση προκειμένου να απομακρύνονται «ύποπτου» καρποί (καρποί με μεταχρωματισμούς, εξωτερικές δυσμορφίες, προσβεβλημένοι με έντομα) μπορεί να μειώσει τη συνολική ποσότητα αφλατοξίνης και κάτω από τα επιτρεπτά όρια.
6. Η αποθήκευση των αποξηραμένων φιστικιών πρέπει να γίνεται σε ψυγείο στους 4-6°C και σχετική υγρασία κάτω από 70%.
7. Ο χώρος αποθήκευσης πρέπει να είναι καθαρός και να λαμβάνεται μέριμνα για την υγιεινή του με συνεχείς ελέγχους.

Τα παραπάνω μέτρα είναι απαραίτητα στα πλαίσια της πρόληψης της μόλυνσης των κελυφωτών φιστικιών από αφλατοξίνη. Αυτά σε συνδυασμό μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα αφλατοξίνης κάτω από τα επιτρεπτά όρια. Όμως αυτά δεν μπορούν να αποκλείσουν τον έλεγχο για ύπαρξη αφλατοξίνης στο τελικό προϊόν, ο οποίος παραμένει απαραίτητος ώστε να διατίθεται στους καταναλωτές ένα ασφαλές, ελεύθερο από αφλατοξίνες και ποιοτικό προϊόν.

Δ.5. ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδωσαν μία εικόνα της κατάστασης όσον αφορά την μόλυνση των ελληνικών φιστικιών με αφλατοξίνη σε σχέση με τα στάδια παραγωγής και τις συνήθειες πρακτικές. Δημιουργήθηκαν όμως νέα ερωτήματα και ζητήματα τα οποία θα μπορούσαν να είναι αντικείμενο νέων μελετών. Επιπλέον, οι περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες στον τομέα της αντιμετώπισης του προβλήματος, τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή. Πεδία περαιτέρω μελέτης και έρευνας θα μπορούσαν να είναι:

Α) Ανάλυση για προσδιορισμό αφλατοξίνης στα υπόλοιπα μέρη του καρπού όπως κέλυφος και εξωκάρπιο (φλούδα), καθώς και των άσπερμων καρπών (κούφιοι). Όλα τα παραπάνω έχουν αποθηκευτεί σε καταψύκτη και δεν αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι αναλύσεις αυτές θα έδιναν σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την διασπορά και κατανομή της αφλατοξίνης στα διάφορα μέρη του καρπού, αλλά και την ικανότητα παραγωγής αφλατοξίνης του *A.flavus* στα συγκεκριμένα υποστρώματα.

Β) Ανάλυση για προσδιορισμό αφλατοξίνης των κλειστών καρπών τόσο στο σπέρμα (ψίχα) όσο και στο κέλυφος. Δεδομένου ότι στην πράξη οι κλειστοί καρποί οδηγούνται σε σπαστήρα όπου τα σπέρματα διαχωρίζονται και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στη ζαχαροπλαστική θα υπήρχε ενδιαφέρον να ελεγχθούν εάν είναι μολυσμένα με αφλατοξίνη. Από την παρούσα μελέτη, οι κλειστοί καρποί διαχωρίζονταν από το δείγμα και έχουν αποθηκευθεί σε καταψύκτη.

Γ) Μελέτη απομόνωσης του *A.flavus* και *A.parasiticus* σε καρπούς με προσβολή από τα έντομα της φιστικιάς ευρύτομο, σκώρο και ψύλλα, καθώς και ανάλυση για την ύπαρξη αφλατοξίνης. Από αυτή τη μελέτη η παρουσία του *A.flavus* καθώς και της αφλατοξίνης συνδέθηκε άμεσα με την προσβολή από τα έντομα του ευρυτόμου και του σκώρου, καθώς και με την γενικότερη εικόνα του αγρού ως προς τις προσβολές. Μία μελέτη με πιο εξειδικευμένο σκοπό την μελέτη αυτών των καρπών θα έδινε στοιχεία πρόβλεψης της μόλυνσης με αφλατοξίνη στο χωράφι.

Δ) Ανάλυση δειγμάτων εδάφους από φιστικεώνες σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας ως προς την ύπαρξη τοξικογόνων και μη-τοξικογόνων στελεχών του *A.flavus*. Μια τέτοια μελέτη θα έδινε περισσότερες πληροφορίες ως προς την οικολογία του μύκητα. Επομένως, καλλιεργητικές πρακτικές οι οποίες σχετίζονται με την ενσωμάτωση ή απόρριψη προσβεβλημένων καρπών και άλλων φυτικών υπολειμμάτων στον φιστικεώνα

θα ελέγχονταν ως προς την ορθότητά τους. Μία επιπλέον προέκταση της μελέτης αυτής θα ήταν η έρευνα και ταυτοποίηση ενός μη τοξικογόνου στελέχους του *A.flavus* ο οποίος θα ήταν κατάλληλος για βιολογικό έλεγχο των τοξικογόνων στελεχών στο χωράφι.

Ε) Έλεγχος διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *A.flavus* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας ως προς την ικανότητα παραγωγής αφλατοξίνης. Αυτή η μελέτη θα έδινε αφ' ενός πληροφορίες για το ποσοστό των τοξικογόνων στελεχών στην Ελλάδα, καθώς και τη δυνατότητα απομόνωσης ενός κατάλληλου μη-τοξικογόνου στελέχους του *A.flavus* για βιολογικό έλεγχο και εξαπόλυση στο χωράφι. Μια τέτοια πρακτική θα μείωνε την μόλυνση με αφλατοξίνη των φιστικιών από το χωράφι.

Ζ) Επέκταση της παρούσας μελέτης με τον ίδιο σκοπό σε άλλες φιστικοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας.

Η) Έλεγχος του νερού της αποφλοιώσης για την ύπαρξη μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνες. Με μια τέτοια μελέτη θα δίνονταν πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα επιμόλυνσης των φιστικιών κατά την αποφλοιώση.

Θ) Σύγκριση των μεθόδων ξήρανσης στον ήλιο και σε ξηραντήριο σε σχέση με την ύπαρξη των αφλατοξικογόνων μυκήτων και την μόλυνση με αφλατοξίνες. Δεδομένου ότι σε αυτή τη μελέτη η αποξήρανση στον ήλιο συνδέθηκε με την μόλυνση με αφλατοξίνες, αλλά και άλλες βιβλιογραφικές αναφορές θεωρούν ότι η ξήρανση στον ήλιο δημιουργεί προϋποθέσεις μόλυνσης και επιπλέον είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη παραδοσιακή πρακτική στην Ελλάδα, μια τέτοια μελέτη θα ήταν ιδιαίτερος χρήσιμη.

Ι) Ανάλυση των φιστικιών ως προς την ύπαρξη ωχρατοξίνης δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε ο μύκητας *A.carbonarius*.

ΙΑ) Έρευνα με στόχο την ανίχνευση μολυσμένων με αφλατοξίνη φιστικιών με τη βοήθεια υψηλής τεχνολογίας (π.χ. ηλεκτρονική μύτη). Τέτοιες μελέτες πραγματοποιούνται παγκοσμίως και γίνονται προσπάθειες με τη χρήση υψηλής τεχνολογίας. Εάν αυτές οι προσπάθειες ευοδωθούν τότε θα υπάρξει οριστική αντιμετώπιση του προβλήματος μετά τη συγκομιδή δεδομένης και της μεγάλης ανομοιομορφίας της μόλυνσης ανάμεσα στους καρπούς.

Ε. Βιβλιογραφία

1. R.A.Hill, D.M.Wilson, W.W.McMillian, N.W.Widstrom, R.J.Cole, T.H.Sanders and P.D.Blankenship «Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut», Proceedings of the International mycotoxin symposium Sydney – Australia, Trichothecenes and Other Mycotoxins Ed. J.Lacey, Chapter 8 p.79-95 (1985)
2. R.A.Hill, P.D.Blankenship, R.J.Cole and T.H.Sanders «Effects of Soil Moisture and Temperature on Preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent Aflatoxin Development», Applied and Environmental Microbiology, 45 No.2, p.628-633 (1983)
3. J.Jaimez, C.A.Fente, B.I.Vazquez, C.M.Franco, A.Cepeda, G.Mahuzier, P.Prognon «Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis», Journal of Chromatography A, 882 p.1-10 (2000)
4. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα».
5. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής της 23ης Φεβρουαρίου 2006 «για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα».
6. M.Aghamohammadi, J.hashemi, G.Asadi Kram, N.Alizadeh «Enhanced synchronous spectrofluorimetric determination of aflatoxin B₁ in pistachio samples using multivariate analysis», Analytica Chimica Acta 582, p.288-294 (2007)
7. Ali Sheibani, Hassan S.Ghaziaskar «Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B₁ and B₂ from pistachio», Food Control 20 p.124-128 (2008)
8. Bahram Haghghi, C.Thorpe, A.E.pohland, R.Barnett «Development of a sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxins in pistachio nuts», Journal of Chromatography, 206 p.101-108 (1981)
9. AOAC Official Method 999.07 «Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder – Immunoaffinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization, First Action 1999, 49.2.29
10. AOAC Official Method 2005.08 «Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter», Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Derivatization, First Action 2005, 49.2.18A
11. AOAC Official Method 991.31 «Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter - Immunoaffinity Column (Aflatest) Method », First Action 1991 Final Action 1994, 49.2.18
12. AOAC Official Method 971.22 «Standards for Aflatoxins - Thin Layer Chromatographic Methods», M₁-First Action 1981 Final Action 1988, 49.2.03
13. A.Papadopoulou-Bouraoui, J.Stroka, E.Anklam «Comparison of Two Post-Column Derivatization Systems, Ultraviolet Irradiation and Electrochemical Determination, for the Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Food», J.AOAC Int.85, p.411-416 (2002)

14. A.Maroto, R.Boque, J.Riu, It.Ruisanchez, M.Odena «Uncertainty in aflatoxin B₁ analysis using information from proficiency tests», Anal. Bioanal Chem 382, p.1562-1566 (2005)
15. J.Gilbert, E.Anklam «Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs», Trends in analytical chemistry, 21, p.468-486 (2002)
16. Kenneth B.Raper and Dorothy I.Fennell: “The Genus *Aspergillus*”, The Williams & Wilkins Co., Baltimore U.S.A., (1965)
17. Scott E.Baker and Joan W.Bennett «An overview of the Genus *Aspergillus*» Κεφ.1, σελ.3-14, Gustavo H.Goldman & Stephen A.Osmani «The *Aspergilli*», Mycology, 26, CRC Press (2008)
18. Martin Weidenbömer «Mycotoxins in Foodstuffs», Springer U.S.A. (2008)
19. Garry A.Payne, Jiujiang Yu, William C.Nierman, Masayuki Machida, Deepak Bhatnagar, Thomas E.Cleveland and Ralph A.Dean «A first glance into the Genome Sequence of *Aspergillus flavus*» Ch.2, p.15-23, Gustavo H.Goldman & Stephen A.Osmani «The *Aspergilli*», Mycology, 26, CRC Press (2008)
20. Jiujiang Yu, Garry A.Payne, Bruce C. Campbell, Baozhu Guo, Thomas E.Cleveland, Jane F.Robens, Nancy P.Keller, Joan W.Bennett and William C.Nierman «Mycotoxin Production and Prevention of Aflatoxin Contamination in Food and Feed» Ch.27, p.457-472, Gustavo H.Goldman & Stephen A.Osmani «The *Aspergilli*», Mycology, 26, CRC Press (2008)
21. Μπρουσοβάννα Νικ., «Η φιστικιά» Εκδόσεις: Στρ.ΚλαπάκηςΛάρισα (1980)
22. Α.Χιτζανίδου, Π.Α.Μουρίκης, Κ.Δ.Χολέβας «Ασθένειες & Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα» Μ.Φ.Ι (2004)
23. Ποντίκης Κ.Α. «Ειδική Δενδροκομία», ΓΠΑ, Εκδόσεις Α.Σταμούλης Τόμος Δεύτερος, (1996)
24. Voyatzidaki Zoi, Georgiadou M., Yanniotis St. “ A study of Aflatoxin Contamination in greek pistachios” GREMPA Proceedings, 31/3 – 4/4 Athens, Greece (2008)
25. Denizel T., Jarvis B. and Rolfe Ed «A field survey of pistachio (*Pistachia vera*) nut production and storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination» Journal of the Science of Food Agriculture, 27:1021-1026 (1976)
26. King Douglas A., J.R., Ailsa D. Hocking and J.I.Pitt «Dichloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods», Applied and Environmental Microbiology, 37, p.959-964 (1979)
27. Munger P., H. Bleiholder, H. Hack, M. Hess, R. Stauss, T. Van Denboom and E. Weber “Phenological Growth Stages of the Peanut plant (*Arachis hypogaea* L.) Codification and Description according to the BBCH Scale– with figures” Journal of Agronomy and Crop Science 180, 101 – 107 (1998).
28. Sui-Shenf T. Hua, James L.Baker and Melanie Flores-Espiritu “Interactions of Saprophytic Yeasts with a *nor* Mutant of *Aspergillus flavus*” Appl. And Environmental Microbiology, Vol.65 No.6, p.2738-2740 (1999)
29. Daane M.K., Yokota Y.G., Krugner R., Steffan A.S., Paul G. Da Silva, Beede H.R., Benmtnley J.W., Weinberger B.G. “Large bugs damage pistachio nuts most severely during midseason” <http://CaliforniaAgriculture.ucop.edu>, April-June (2005)
30. Χαρίτου Χαρίκλεια «Προσδιοριστικοί παράγοντες κατανάλωσης ξηρών καρπών» Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία ΓΠΑ Τμήμα Αγρ.Οικονομίας & Ανάπτυξης, Αθήνα, Μάρτιος (2009)

31. Marin Sonia, Hodzic Irzada, Ramos J. Antonio, Sanchis V. "Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts" Food Microbiology 25, p.683-689 (2008)
32. Thomas F. Schatzki "Distribution of aflatoxin in pistachios. Sampling and Testing U.S. Pistachios for Aflatoxin", J. Agric. Food Chem. 46, 2-4(1998)
33. Sui-Sheng Sylvia Hua "Field Assessment of an effective yeast strain to control aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*" Proceedings Addendum California Conference on Biological Control IV, July 13-15, Berkeley, California (2004)
34. Perng-Kuang Chang, Sui-Sheng T. Hua "Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitively prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes" Int. J. of Food Microbiology 114 275-279 (2007)
35. ΦΕΚ Β18 14-1-1994, ΥΑ 317708 «Αναγνώριση Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) Φυστίκι Αίγινας»
36. Thomas F. Schatzki and Martin S. Ong "Dependence of Aflatoxin in Almonds on the Type and Amount of Insect Damage" J. Agric. Food Chem., 49, 4513-4519 (2001)
37. S.M. Pearson, A.A.G. Candlish, K.E. Aidoo & J.E. Smith "Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection" Biotechnology Techniques 13: 97-99, (1999)
38. Παπαδόπουλος Ηλίας «Προσδιορισμός αφλατοξινών σε φιστίκια Αιγίνης με προσαρμοσμένη στο εργαστήριο μέθοδο» Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία ΓΠΑ, Τμήμα Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων, Αθήνα (2006)
39. C. Souliotis, A. Tsourgianni "Population dynamics of Psyllidae on pistachio (*Pistachia vera*) Bioecological data on *Agonoscena pistaciae*", Boll. Zool. agr. Bachic. Ser II, 32 (1):49-58 (2000)
40. Doster M.A. and Michailides T.J. "Relationship between Shell Discoloration of Pistachio Nuts and Incidence of Fungal Decay and Insect Infestation" Plant Disease, 83 No.3, p.259-264 (1999)
41. Bonjar G.H. Shahidi "Incidence of Aflatoxin Producing Fungi in Early Split Pistachio Nuts of Kerman, Iran" Journal of Biological Sciences 4 (2): 199-202, (2004)
42. Sommer N.F., Buchanan J.R., and Fortlage R.J. "Aflatoxin and Sterigmatocystin Contamination of Pistachio Nuts in Orchards" Appl. And Environmental Microbiology, p.64-67 (1976)
43. Pearson T.C. and Schatzki "Machine Vision System for Automated Detection of Aflatoxin-Contaminated Pistachios" J. Agric. Food Chem., 46, p.2248-2252 (1998)
44. Barry J. Blaney "Mycotoxins in crops grown in different climatic regions of Queensland", Trichothecenes and Other Mycotoxins, Edited by J. Lacey, Chapter 9, p.97-108 (1985)
45. Keith A. Scudamore "Principles and applications of mycotoxin analysis" Mycotoxins, Taplow, Maidenhead, Berkshire UK, Chapter 7 p.157-178
46. M.O. Moss and J.M. Frank "The influence on mycotoxin production of interactions between fungi and their environment" Trichothecenes and Other Mycotoxins, Edited by J. Lacey, Chapter 24 p.257-268 (1985)

47. Thomas B. Whitaker, Andrew B. Slate and Anders Sture Johansson “Sampling feeds for mycotoxin analysis” The mycotoxin Blue Book, Nottingham University Press, Ed. Duarte Diaz Chapter 1 p.1-21 (2005)
48. J.W. Bennett “Mutants and mycotoxins: aflatoxins as a model system”, Trichothecenes and Other Mycotoxins, Edited by J. Lacey, Chapter 25, p.271-280 (1985)
49. Paul Bayman, James L. Baker & Noreen E. Mahoney “Aspergillus on tree nuts: incidence and associations”, Mycopathologia 155:161-169(2002)
50. Ebrahim Hadavi “Several physical properties of aflatoxin-contaminated pistachio nuts: Application of BGY fluorescence for separation of aflatoxin – contaminated nuts”, Food Additives & Contaminants, Vol.22 Issue 11, p.1144-1153 (2005)
51. Elizabeth Santin “Mould growth and mycotoxin production” The mycotoxin Blue Book, Nottingham University Press, Ed. Duarte Diaz Chapter 9 p.225-234, (2005)
52. Martin R. Adams and Maurice O. Moss “Food Microbiology” Third Edition RSC Publishing (2008)
53. S. Yanniotis and I. Zarboutis “Water Sorption Isotherms of Pistachio Nuts” Research Note Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 29, 372-375 (1996)
54. Turgut Denizel, Edward J. Rolfe and Basil Jarvis “Moisture-Equilibrium Relative Humidity Relationships in Pistachio Nuts with Particular Regard to Control of Aflatoxin Formation”, J. Sci. Fd Agric., 27, 1027-1034 (1976)
55. Hilary R. Wotton and Richard N. Strange “Increased Susceptibility and Reduced Phytoalexin Accumulation in Drought-Stresses Peanut Kernels Challenged with *Aspergillus flavus*” Applied and Environmental Microbiology, p.270-273 (1987)
56. Russel J. Molyneux, Noreen Mahoney, Jong H. Kim, Bruce C. Campbell “Mycotoxins in edible tree nuts” International Journal of Food Microbiology 119 p.72-78 (2007)
57. Codex Alimentarius “Code of Practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts” CAC/RCP 59-2005
58. THIRD JOINT FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL “Conference on Mycotoxins” Tunis, Tunisia 3-6 March (1999)

Παραπομπή σε Ιστοσελίδες

- 1A. UVE Photochemical Reactor, UV-Derivatization Module for Aflatoxin Analysis, www.lctech.de
- 2A. Aflatoxin Control in Pistachios: Biocontrol Using Atoxigenic Strains, 2005 Annual Report, www.usda.gov,
- 3A. Reddy S.V., Waliyar F «Properties of aflatoxin and it producing fungi» <http://www.aflatoxin.info/aflatoxin.asp>
- 4A. Aflatoxins, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and natural Toxins Handbook, www.usda.gov

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

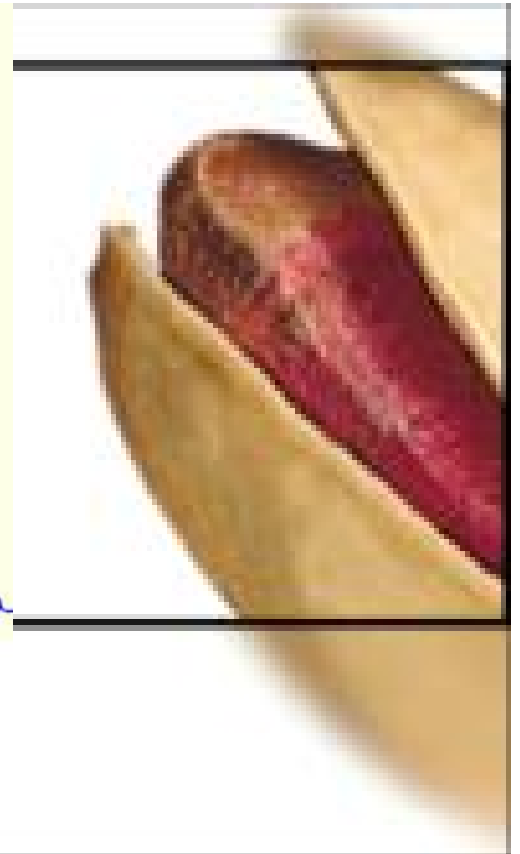
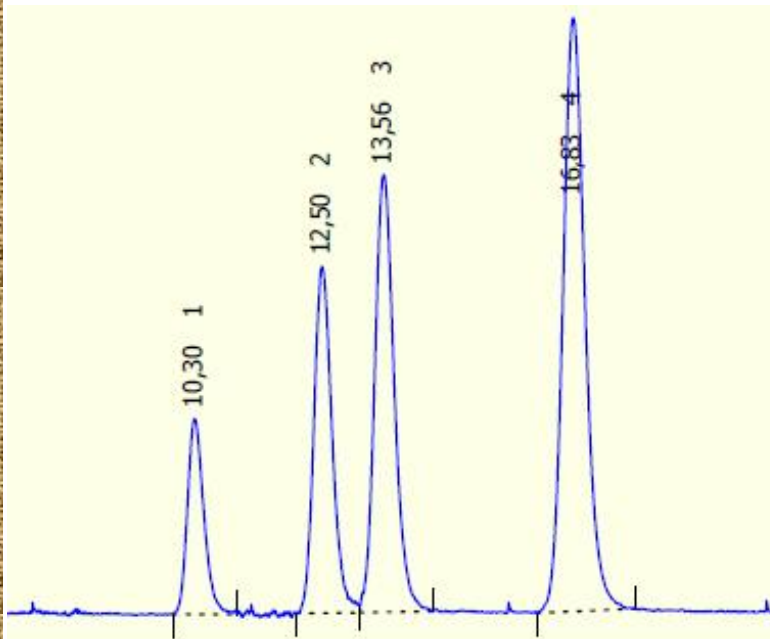
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών
σε κελυφωτά φιστίκια

ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑ



ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σταύρος Γιαννιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (επιβλέπων)
Γεώργιος – Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.
Παναγιώτης Σκανδάμης, Λέκτορας Γ.Π.Α.
Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2009

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 - Κατάλογος Πινάκων και Εικόνων της μελέτης

Πίνακες

| | | | |
|-------|--|------|-----|
| 1.1 | Δείγματα κελυφωτών φιστικιών μολυσμένων με αφλατοξίνες όπως έχουν καταγραφεί στο “Mycotoxins in Foodstuffs” M.Weidenboerner (2008) | σελ. | 10 |
| 1.2 | Φυσικές και Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών | | 13 |
| 1.3 | Σύνοψη των υπαρχόντων κανονισμών στο τέλος του 2002 | | 18 |
| 2.1 | Παραγωγή φιστικιών στις κυριότερες χώρες καλλιέργειας φιστικιάς (τόνοι) | | 21 |
| 2.5.1 | Προβλήματα φυτοπροστασίας | | 25 |
| 2.3 | Οι εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα | | 27 |
| 2.4 | Σύσταση φιστικιών και θρεπτική αξία | | 32 |
| B.1 | Κτήμα Α: Δειγματοληψίες - μετρήσεις | | 74 |
| B.2 | Κτήμα Β: Δειγματοληψίες - μετρήσεις | | 75 |
| B.3 | Κτήμα Γ: Δειγματοληψίες - μετρήσεις | | 75 |
| B.4 | Κτήμα Δ: Δειγματοληψίες - μετρήσεις | | 77 |
| B.5 | Συστατικά θρεπτικού υποστρώματος DRBC | | 79 |
| B.6 | Συγκεντρώσεις αφλατοξινών για κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης - Υπολογισμός | | 86 |
| B.6.1 | G ₂ – Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης | | 87 |
| B.6.2 | G ₁ – Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης | | 88 |
| B.6.3 | B ₂ – Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης | | 89 |
| B.6.4 | B ₁ – Αποτελέσματα αναλύσεων για κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης | | 90 |
| B.7 | Βάρος Δειγμάτων Αγρού | | 96 |
| B.8 | Περιγραφή Δειγμάτων Ταυτοποίησης για ανάλυση αφλατοξίνης – Βάρος, Μέθοδος επεξεργασίας του δείγματος και Συμπύκνωση | | 99 |
| B.9 | Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη G ₂ | | 101 |
| B.10 | Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη G ₁ | | 101 |
| B.11 | Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη B ₂ | | 101 |
| B.12 | Δοκιμές ανάκτησης για την αφλατοξίνη B ₁ | | 102 |
| Γ.1.1 | Κτήμα Α : Ιστορικό Χωραφιού - Κατάσταση | | 104 |
| Γ.1.2 | Κτήμα Β : Ιστορικό Χωραφιού - Κατάσταση | | 105 |
| Γ.1.3 | Κτήμα Γ : Ιστορικό Χωραφιού - Κατάσταση | | 106 |
| Γ.1.4 | Κτήμα Δ : Ιστορικό Χωραφιού - Κατάσταση | | 107 |
| Γ.2.1 | 1 ^η Δειγματοληψία – Αρχή ωρίμανσης | | 109 |
| Γ.2.2 | 2 ^η Δειγματοληψία –Ωρίμανση | | 113 |
| Γ.2.3 | 3 ^η Δειγματοληψία – Συγκομιδή Κτήμα Α | | 117 |
| Γ.2.4 | 3 ^η Δειγματοληψία – Συγκομιδή Κτήμα Β | | 119 |
| Γ.2.5 | 3 ^η Δειγματοληψία – Συγκομιδή Κτήμα Δ | | 122 |
| Γ.2.6 | 4 ^η Δειγματοληψία – Ξήρανση Κτήμα Α | | 125 |
| Γ.2.7 | 4 ^η Δειγματοληψία – Ξήρανση Κτήμα Β | | 128 |

| | | | |
|---------|--|------|-----|
| Γ.2.8 | 4 ^η Δειγματοληψία – Ξήρανση Κτήμα Γ | σελ. | 131 |
| Γ.2.9 | 4 ^η Δειγματοληψία – Ξήρανση Κτήμα Δ | | 135 |
| Γ.2.10 | 5 ^η Δειγματοληψία – Αποθήκευση Κτήμα Α | | 139 |
| Γ.2.11 | 5 ^η Δειγματοληψία – Αποθήκευση Κτήμα Β | | 141 |
| Γ.2.12 | 5 ^η Δειγματοληψία – Αποθήκευση Κτήμα Δ | | 143 |
| Γ.2.6.1 | Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του <i>A.flavus</i> στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Α | | 147 |
| Γ.2.6.2 | Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του <i>A.flavus</i> στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Β | | 149 |
| Γ.2.6.3 | Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του <i>A.flavus</i> στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Γ | | 150 |
| Γ.2.6.4 | Δοκιμή Fisher (LSD) για την ύπαρξη διαφορών ως προς την παρουσία του <i>A.flavus</i> στα διάφορα στάδια από το Κτήμα Δ | | 152 |
| Γ.3.1.A | Κτήμα Α – Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 156 |
| Γ.3.1.B | Κτήμα Α – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη <i>A.flavus</i> και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 157 |
| Γ.3.2.A | Κτήμα Β – Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 159 |
| Γ.3.2.B | Κτήμα Β – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη <i>A.flavus</i> και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 160 |
| Γ.3.3.A | Κτήμα Γ – Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 163 |
| Γ.3.3.B | Κτήμα Γ – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη <i>A.flavus</i> και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 164 |
| Γ.3.4.A | Κτήμα Δ – Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 166 |
| Γ.3.4.B | Κτήμα Δ – Σύγκριση αποτελεσμάτων μετρήσεων για ύπαρξη <i>A.flavus</i> και αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης στα Δείγματα Ταυτοποίησης | | 168 |
| 3.5.1 | Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα «Αρχή ωρίμανσης-προβληματικοί» | | 171 |
| 3.5.2 | Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα «Ωρίμανση-προβληματικοί» | | 171 |
| 3.5.3 | Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα «Συγκομιδή υγιείς» | | 172 |
| 3.5.4 | Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα «Συγκομιδή προβληματικοί» | | 172 |
| 3.5.5 | Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα: «Ξήρανση» | | 172 |
| 3.5.6 | Σύγκριση των κτημάτων στο δείγμα «Αποθήκη» | | 172 |
| Γ.4.1 | Κτήμα Α –Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια | | 174 |
| Γ.4.4.1 | Κτήμα Α –Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων : από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε Β ₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη. | | 176 |

| | | | |
|---------|--|------|-----|
| Γ.4.1 | Κτήμα Α –Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια | σελ. | 174 |
| Γ.4.4.1 | Κτήμα Α –Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων : από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε Β ₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη. | | 176 |
| Γ.4.2 | Κτήμα Β –Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια | | 178 |
| Γ.4.2.1 | Κτήμα Β –Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων : από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε Β ₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη. | | 180 |
| Γ.4.3 | Κτήμα Γ –Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια | | 181 |
| Γ.4.3.1 | Κτήμα Γ –Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων : από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε Β ₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη. | | 183 |
| Γ.4.4 | Κτήμα Δ –Αποτελέσματα αναλύσεων για ανίχνευση αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια | | 184 |
| | Κτήμα Δ –Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων σταδίων : από την ωρίμανση μέχρι την αποθήκευση ως προς την ποσότητα σε Β ₁ αφλατοξίνη και συνολική αφλατοξίνη. | | 187 |
| Γ.4.5.1 | Στάδιο «Αρχή ωρίμανσης» -Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών | | 189 |
| Γ.4.5.2 | Στάδιο «ωρίμανση» -Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών | | 190 |
| Γ.4.5.3 | Στάδιο «συγκομιδή» - Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών | | 191 |
| Γ.4.5.4 | Στάδιο «ζήρανση» -Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών | | 192 |
| Γ.4.5.5 | Στάδιο «αποθήκη» -Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 πειραματικών αγρών | | 192 |

Εικόνες

| | | | |
|---------------|---|------|-----|
| 1.1 | Χημικοί τύποι αφλατοξινών B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ | σελ. | 12 |
| 2.1 | Προνύμφη ευρυτόμου σε φιστίκι – Συμπτώματα προσβολής των φιστικιών από ευρύτομο | | 28 |
| 2.2 | Ενήλικο σκόρου φιστικιάς – Συμπτώματα προσβολής των φιστικιών από σκόρο | | 29 |
| 2.3 | Ενήλικο ψύλλας φιστικιάς – Pronύμφες ψύλλας επάνω σε φύλλα | | 30 |
| 4.1 | Επίδραση της θερμοκρασίας (T) και της ενεργότητας νερού (a _w) στην ανάπτυξη και παραγωγή αφλατοξίνης | | 53 |
| 6.4.1 | Βασικές αρχές λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας | | 61 |
| B.1.1 | Σήμανση δένδρων στους πειραματικούς αγρούς στην Αίγινα | | 67 |
| B.2.1 | Κτήμα Α : 1 ^η Δειγματοληψία στο χωράφι – Αρχή ωρίμανσης | | 69 |
| B.2.2 | Κτήμα Δ: Συγκομιδή φιστικιού | | 70 |
| B.2.3 | Κτήμα Δ: Καθάρισμα καρπού κατά τη συγκομιδή | | 70 |
| B.2.4 | Κτήμα Δ: Άπλωμα καρπού στον ήλιο για ξήρανση | | 71 |
| B.2.5 | Κτήμα Δ: Επέμβαση με αλάτι – Εμβάπτιση καρπών σε διάλυμα NaCl | | 72 |
| B.2.6 | Κτήμα Β: Αποφλοιώση καρπών | | 73 |
| B.2.7 | Κτήμα Β: Δειγματοληψία αποξηραμένου καρπού σε ξηραντήριο από τον «αφρό» της αποφλοιώσης | | 75 |
| B.2.8 | Κτήμα Γ: Δείγμα ξήρανσης | | 76 |
| B.4.1 | Δείγμα Ταυτοποίησης – Εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC | | 79 |
| B.4.2 | Εξωτερική απολύμανση καρπών – Εμβάπτιση σε χλωρίνη | | 80 |
| B.4.3 | Τοποθέτηση μισών καρπών στα τριβλία Petri για επώαση | | 80 |
| B.4.4 | Τοποθέτηση μισών καρπών στα τριβλία Petri για επώαση από αποξηραμένους καρπούς – 4 ^η Δειγματοληψία | | 81 |
| B.6.1 | Άλεση του δείγματος σε υψηλή ταχύτητα σε Ultra Turex | | 92 |
| B.6.2(α) | Διήθηση του αλεσμένου δείγματος και συλλογή του εκχυλίσματος | | 93 |
| B.6.2(β) | Διαχωρισμός του εκχυλίσματος σε δύο φάσεις: φάση λαδιού (υπερκείμενη) – υδατική φάση (υποκειμένη) | | 93 |
| B.6.3 | Φιλτράρισμα του μίγματος με PBS σε Wharman 100mm | | 93 |
| B.6.4 | Καθαρισμός με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) | | 94 |
| Γ.1.1 | Κτήμα Α – Στάδιο καλλιέργειας | | 105 |
| Γ.1.2 | Κτήμα Β – Στάδιο καλλιέργειας | | 106 |
| Γ.1.3 | Κτήμα Γ – Στάδιο καλλιέργειας – Κατάσταση προσβολών | | 107 |
| Γ.1.4 | Κτήμα Δ – Στάδιο καλλιέργειας | | 108 |
| Γ.2.1 | Υγιείς καρποί μετά την επώαση στο εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC | | 111 |
| Γ.2.2 | Προβληματικοί καρποί μετά την επώαση στο εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC | | 111 |
| Γ.2.3(α), (β) | Ανάπτυξη A.niger σε προβληματικούς καρπούς μετά την επώαση στο εκλεκτικό υπόστρωμα DRBC από τα Κτήματα Γ και Δ | | 112 |
| Γ.2.4 | Δείγμα υγιών καρπών πριν τη τοποθέτηση στα τριβλία | | 115 |
| Γ.2.5 | Δείγμα προβληματικών καρπών από το Κτήμα Α πριν τη τοποθέτηση στα τριβλία | | 115 |

| | | | |
|--------|---|------|-----|
| Γ.2.6 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> στο δείγμα προβληματικών καρπών από τη δεύτερη δειγματοληψία | σελ. | 116 |
| Γ.2.7 | Καμία ανάπτυξη <i>ασπεργίλλων</i> στο δείγμα υγιών καρπών από τη δεύτερη δειγματοληψία | | 116 |
| Γ.2.8 | Δείγμα συγκομιδής – Προβληματικοί καρποί Κτήμα Α πριν τη τοποθέτηση στα τριβλία | | 118 |
| Γ.2.9 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Συγκομιδής – Αριστερά: υγιείς καρποί – Δεξιά: προβληματικοί καρποί | | 118 |
| Γ.2.10 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στο Δείγμα Συγκομιδής – Αριστερά: υγιείς καρποί – Δεξιά: προβληματικοί καρποί | | 119 |
| Γ.2.11 | Δείγμα Συγκομιδής – Υγιείς (αριστερά) και προβληματικοί (δεξιά) καρποί από το Κτήμα Β πριν τη τοποθέτηση στα τριβλία | | 120 |
| Γ.2.12 | Δείγμα συγκομιδής από το Κτήμα Β – καρποί με εσωτερική κηλίδα | | 121 |
| Γ.2.13 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> σε προβληματικούς καρπούς από το Κτήμα Β στο Δείγμα Συγκομιδής | | 121 |
| Γ.2.14 | Δείγμα Συγκομιδής από το Κτήμα Δ – Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στους προβληματικούς καρπούς | | 124 |
| Γ.2.15 | Δείγμα Συγκομιδής από το Κτήμα Δ – Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στους υγιείς καρπούς | | 124 |
| Γ.2.16 | Δείγμα Ξήρανσης Κτήματος Α – Κανονικοί (χωρίς άλας) και με 35% άλας | | 126 |
| Γ.2.17 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήματος Α – Επέμβαση Κανονικοί (χωρίς αλάτι) | | 127 |
| Γ.2.18 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήματος Α – Επέμβαση 25% αλάτι(α) – Επέμβαση 35% αλάτι (β) | | 127 |
| Γ.2.19 | Δείγμα ΚΑΝΟΝΙΚΟ Ξήρανσης από το Κτήμα Β πριν τη τοποθέτηση στα τριβλία | | 129 |
| Γ.2.20 | Δείγμα «αφρού» από το Κτήμα Β πριν τη τοποθέτηση στα τριβλία | | 129 |
| Γ.2.21 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήμα Β | | 130 |
| Γ.2.22 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήμα Β – «Αφρός» σε κλειστούς καρπούς | | 130 |
| Γ.2.23 | Καρποί Λευκοί και Σκούροι και με Κηλίδα από το Δείγμα Ξήρανσης του Κτήματος Γ | | 132 |
| Γ.2.24 | Καρποί με εσωτερική κηλίδα στο Δείγμα Ξήρανσης Κτήμα Γ | | 133 |
| Γ.2.25 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> και <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Ξήρανσης – Λευκοί Κτήμα Γ | | 133 |
| Γ.2.26 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> στο Δείγμα Ξήρανσης – Σκούροι Κτήμα Γ | | 134 |
| Γ.2.27 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> και <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Ξήρανσης – Καρποί με εσωτερική κηλίδα από το Κτήμα Γ | | 134 |
| Γ.2.28 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> και <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Ξήρανσης – Κανονικοί από το Κτήμα Δ | | 137 |
| Γ.2.29 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> στο Δείγμα Ξήρανσης με 25% αλάτι από το Κτήμα Δ | | 137 |

| | | | |
|---------|--|------|-----|
| Γ.2.30 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> στο Δείγμα Ξήρανσης – 35% αλάτι από το Κτήμα Δ | σελ. | 138 |
| Γ.2.31 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Αποθήκευσης Κτήμα Α | | 140 |
| Γ.2.32 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στο Δείγμα Αποθήκευσης Κτήμα Α | | 140 |
| Γ.2.33 | Ανάπτυξη <i>A.flavus</i> και <i>A.niger</i> στο Δείγμα Αποθήκευσης Κτήμα Β | | 142 |
| Γ.2.34 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> και <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Αποθήκευσης – Κανονικοί (χωρίς επέμβαση με αλάτι) – Κτήμα Δ | | 145 |
| Γ.2.35 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> και <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Αποθήκευσης – Επέμβαση με 25% αλάτι – Κτήμα Δ | | 145 |
| Γ.2.36 | Ανάπτυξη <i>A.niger</i> και <i>A.flavus</i> στο Δείγμα Αποθήκευσης – Επέμβαση με 35% αλάτι – Κτήμα Δ | | 145 |
| Δ.1.2.1 | Φθορισμός στο κέλυφος των καρπών στο υπεριώδες φως | | 202 |
| Δ.1.3.1 | Προσβολή της ψίχας από το <i>Nematospora coryli</i> η οποία στο υπεριώδες φως φθορίζει | | 204 |

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 - Κλίμακα προσδιορισμού σταδίου καλλιέργειας κατά BBCH ²⁷

Peanut Munger et al., 1998a

Phenological growth stages and BBCH-identification keys of the peanut

Code Description

Principal growth stage 8: Ripening of fruits and seeds⁵

- 81 Beginning of ripening: about 10% of pods developed to final size are ripe
- 82 About 20% of pods developed to final size are ripe
- 83 Continuation of ripening: about 30% of pods developed to final size are ripe
- 84 About 40% of pods developed to final size are ripe
- 85 Main phase of ripening: about 50% of pods developed to final size are ripe
- 86 About 60% of pods developed to final size are ripe
- 87 Advanced ripening: about 70% of pods developed to final size are ripe
- 88 About 80% of pods developed to final size are ripe
- 89 Full maturity: nearly all pods developed to final size are ripe

Principal growth stage 9: Senescence

- 91 About 10% of above ground parts of plant dry
- 92 About 40% of above ground parts of plant dry
- 93 About 30% of above ground parts of plant dry
- 94 About 40% of above ground parts of plant dry
- 95 About 50% of above ground parts of plant dry
- 96 About 60% of above ground parts of plant dry
- 97 Above ground parts of plant dead
- 99 Harvested product

Criteria of maturity: Pericarp hard, with distinct texture, can be split open easily;
Testa (seed coat) dry, with cultivar-specific dark colour

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 - Δεδομένα αναλύσεων - Χρωματογραφήματα

ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4 - Δεδομένα αναλύσεων - Χρωματογραφήματα

ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5 - Δεδομένα αναλύσεων - Χρωματογραφήματα

**ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6 - Δεδομένα αναλύσεων - Χρωματογραφήματα

**ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΑΓΡΟΥ**