



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.1.6.1: Αναφορά σχετικά με την ανάπτυξη Κυτταρικών ή/και ακουστικών βιοαισθητήρων για την ανίχνευση ωχρατοξινών σε επιτραπέζια σταφύλια: Ανίχνευση Ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ) με χρήση εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π1.6.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΓΠΑ**

Συγγραφείς: **Σπυρίδων Κίντζιος, Σοφία Μαυρικού**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **28 Δεκεμβρίου 2025**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες
Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	5
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	6
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	8
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	16
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές	17

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχησης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ1

Στο πλαίσιο της ΕΕ1 του έργου, στόχος είναι ανάπτυξη, αξιολόγηση και ενσωμάτωση σύγχρονων διαγνωστικών και προγνωστικών εργαλείων για την αποτελεσματική παρακολούθηση, έγκαιρη διάγνωση και ολοκληρωμένη διαχείριση εντομολογικών εχθρών, φυτοπαθογόνων, ζιζανίων και υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών στην αγροτική παραγωγή. Οι ερευνητικές δραστηριότητες περιλαμβάνουν 9 υποενότητες, καθεμία από τις οποίες καλύπτει διαφορετικές πτυχές της φυτοπροστασίας. Η υποενότητα 1.6 αφορά την ανάπτυξη καινοτόμων, φορητών και υψηλής ευαισθησίας βιοαισθητήρων για την επιτόπια και ταχεία ανίχνευση τόσο μυκοτοξινών όσο και υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, με κύρια εφαρμογή τα επιτραπέζια σταφύλια και τα οπωροκηπευτικά. Το παραδοτέο Π1.6.1 εστιάζει στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων που συνδυάζονται με ηλεκτροχημικές τεχνικές όπως η φασματοσκοπία εμπέδησης για την παρακολούθηση των επιπέδων της ωχρατοξίνης Α στα αγροτικά προϊόντα διευκολύνοντας τους παραγωγούς για την έγκαιρη λήξη αποφάσεων.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.6.1

Οι μυκοτοξίνες, και ιδιαίτερα η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και την ασφάλεια τροφίμων, καθώς εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα και ανιχνεύονται συχνά σε αγροτικά προϊόντα, όπως ο οίνος. Τα αυστηρά νομοθετικά όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθιστούν αναγκαία την ανάπτυξη ιδιαίτερα ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης. Παρότι οι κλασικές τεχνικές, όπως η ΗPLC, είναι ακριβείς, παρουσιάζουν υψηλό κόστος και περιορισμούς στην επιτόπια εφαρμογή.

Το Παραδοτέο επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ενός ηλεκτροχημικού εμπειρομετρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της ΟΤΑ σε δείγματα οίνου. Ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με τροποποίηση χρυσού ηλεκτροδίου και ακινητοποίηση ειδικών αντισωμάτων έναντι της ΟΤΑ, ενώ η απόδοσή του αξιολογήθηκε μέσω ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης. Η βελτιστοποίηση κρίσιμων παραμέτρων βελτίωσε σημαντικά την ηλεκτροχημική απόκριση του συστήματος.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η δέσμευση της ΟΤΑ προκαλεί μετρήσιμες μεταβολές στην αντίσταση μεταφοράς φορτίου, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα του βιοαισθητήρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Συμπερασματικά, οι ηλεκτροχημικοί εμπεδημετρικοί βιοαισθητήρες αποτελούν μια υποσχόμενη, γρήγορη και οικονομική εναλλακτική λύση για την ανίχνευση της ωχρατοξίνης Α στον οίνο, με προοπτικές περαιτέρω βελτίωσης και εφαρμογής στον έλεγχο της ασφάλειας τροφίμων.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται κυρίως από μύκητες των γενών *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* και μπορούν να μολύνουν ποικίλα τρόφιμα, αποτελώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Αν και είναι γνωστές πολλές μυκοτοξίνες, λίγες έχουν σημαντικές επιπτώσεις, προκαλώντας νεφρικές και ηπατικές βλάβες καθώς και καρκινογένεση. Η παρουσία τους μπορεί να προκύψει σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας και η υψηλή χημική και θερμική τους σταθερότητα δυσχεραίνει την απομάκρυνσή τους.

Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι ωχρατοξίνες, με κυρίαρχη την ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), η οποία εμφανίζει υψηλή τοξικότητα και τάση βιοσυσσώρευσης, κυρίως στους νεφρούς. Τα αυστηρά ανώτατα επιτρεπόμενα όρια που θεσπίζονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία επιβάλλουν την εφαρμογή ορθών γεωργικών και τεχνολογικών πρακτικών καθώς και συστηματικούς ελέγχους ασφάλειας τροφίμων.

Η ανάγκη για γρήγορη, αξιόπιστη και επιτόπια ανίχνευση έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων ως καινοτόμων εργαλείων παρακολούθησης μυκοτοξινών. Οι βιοαισθητήρες, συνδυάζοντας βιολογικούς υποδοχείς με μετατροπείς σήματος, προσφέρουν υψηλή εκλεκτικότητα, χαμηλό κόστος και ελάχιστη προετοιμασία δειγμάτων, καλύπτοντας τις σύγχρονες απαιτήσεις της βιομηχανίας τροφίμων για αποτελεσματικό και περιβαλλοντικά φιλικό έλεγχο της ασφάλειας τροφίμων.

Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καινοτόμου έρευνας στα πλαίσια του παραδοτέου Π1.6.1, που αφορά τη χρήση το σχεδιασμό και η αξιολόγηση μεθοδολογίας για την επιλεκτική ανίχνευση της ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ) με χρήση βιοαισθητήρα. Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε αποσκοπεί στη διερεύνηση της δυνατότητας ενσωμάτωσης της τεχνολογίας σε διαδικασίες ελέγχου ποιότητας προϊόντων της αμπελοοινικής βιομηχανίας.

Το παρόν έγγραφο **ακολουθεί την παρακάτω δομή:**

- 1. Εισαγωγή και Στόχοι:** Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.
- 2. Περιγραφή των Εργασιών:** 2.1. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση.
- 3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.
- 4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ωχρατοξίνης A

Τα πρότυπα διαλύματα ωχρατοξίνης A παρασκευάστηκαν αρχικά από μητρικό (stock) διάλυμα OTA συγκέντρωσης 20 mg/L σε μεθανόλη. Μέσω διαδοχικών αραιώσεων προέκυψαν τα ενδιάμεσα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 2 mg/L (stock A) και 0,1 mg/L (stock B). Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης A 0,25, 0,5, 1, 2 και 5 μg/L.

Βήματα κατασκευής Βιοαισθητήρα

Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και ενεργοποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού της Metrohm DropSens, 250AT. Στην επιφάνεια εργασίας των ηλεκτροδίων χρυσού, τοποθετήθηκε H_2O_2 10mM, το οποίο έχει διαλυθεί σε PBS 1x σε pH 7.4 ± 0.2 . Έγινε εφαρμογή κυκλικής βολταμετρίας με όρια -1V έως 1V, scan rate 0,01V/S, e step 0,01V και 3 κύκλους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση της επιφάνειας με DI water. Έπειτα τα ηλεκτρόδια στέγνωσαν στους 37 °C για 10 λεπτά και στην συνέχεια έγινε έκπλυση της επιφάνειας με PBS 1x (Stan et al., 2022). Αυτή η μέθοδος καθαρισμού εκτός από τη θετικά αποτελέσματα στην απομάκρυνση υπολειμμάτων με τη λιγότερη δυνατή επίδραση στην τραχύτητα της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, έχει αναφερθεί και ότι βελτιώνει την ηλεκτροχημική του απόκριση και προσθέτει και ομάδες C-O (Cumba et al., 2016). Στη συνέχεια, στόχος ήταν να δημιουργήσουμε μια αυτοοργανωμένη μονοστιβάδα (SAM) ώστε να γίνει ακινητοποίηση των αντισωμάτων έναντι της ωχρατοξίνης A. Η επιλογή του υλικού ήταν το θειογλυκολικό οξύ (TGA or MAA) 10mM διαλυμένο σε PBS 1x (De Benedetto et al., 2019; Zamzami et al., 2024). Έτσι 10μl διαλύματος θειογλυκολικού διαλυμένο σε DI water εφαρμόστηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έγινε επώαση overnight στους 4 βαθμούς στο ψυγείο (Ron & Rubinstein, 1998). Με αυτό τον τρόπο προστέθηκαν στην επιφάνεια θειολικές ομάδες -SH. Στη συνέχεια έγινε ενεργοποίηση των εστερικών ομάδων που θα συνδεθούν με τις αμινομάδες των αντισωμάτων. Αυτό επιτεύχθηκε με ένα διάλυμα EDC/NHS (Lim et al., 2014) σε διαλυμένο σε MES buffer 100mM, pH=6 και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (Zamzami et al., 2024).

Μετά την ενεργοποίηση των εστερικών ομάδων, προστέθηκαν τα αντισώματα, διαλυμένα σε PBS 1x, και επώαστηκαν για 2 ώρες στους 4 °C. Ακολούθως, μετά την ακινητοποίηση των αντισωμάτων έναντι της ωχρατοξίνης A, προστέθηκαν 10 μl διαλύματος BSA 1% και πραγματοποιήθηκε επιπλέον επώαση διάρκειας 30 λεπτών, με σκοπό τον αποκλεισμό μη ειδικών αλληλεπιδράσεων (Zamzami et al., 2024). Τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια αποθηκεύτηκαν στους 4 °C έως την ημέρα των μετρήσεων.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα ωχρατοξίνης A σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25 ppb, με περιεκτικότητα μεθανόλης 5% v/v. Οι αραιώσεις από τα μητρικά πρότυπα διαλύματα πραγματοποιήθηκαν με PBS 1x και καθαρή μεθανόλη. Οι μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας και ηλεκτροχημικής

φασματοσκοπίας εμπέδησης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση τριένυδρου άλατος καλίου του εξακυανοσιδηρικού(II) ανιόντος, συγκέντρωσης 5 mM, διαλυμένου σε διάλυμα KCl 0,1 M, με όγκο 40 μ L, καθώς και 10 μ L διαλύματος ωχρατοξίνης A σε κάθε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο.

Οι μετρήσεις εμπέδησης, τόσο κατά τα επιμέρους στάδια τροποποίησης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου όσο και κατά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, πραγματοποιήθηκαν σε εύρος συχνοτήτων από 0,1 έως 10.000 Hz, με εφαρμογή σταθερού εναλλασσόμενου δυναμικού $V = 10$ mV. Στην αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζονται σχηματικά όλα τα στάδια τροποποίησης της επιφάνειας του εκτυπωμένου ηλεκτροδίου χρυσού για την κατασκευή του εμπεδημετρικού ανοσοαισθητήρα έναντι της ωχρατοξίνης A.

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η συχνότητα των 100 Hz, καθώς στην περιοχή αυτή ο αισθητήρας παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεταβολές της συγκέντρωσης του αναλύτη. Σε αυτή τη συχνότητα, το μέτρο της σύνθετης αντίστασης $|Z|$ βρίσκεται στη μεταβατική περιοχή μεταξύ ωμικής και χωρητικής συμπεριφοράς του συστήματος, με αποτέλεσμα η πρόσδεση του αναλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου να επηρεάζει εντονότερα την εμπέδηση και να επιτρέπει σαφέστερη διάκριση μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αντίθετα, σε υψηλές συχνότητες η απόκριση κυριαρχείται από την αντίσταση του διαλύματος, ενώ σε χαμηλές συχνότητες υπερισχύει η χωρητική συμπεριφορά, γεγονός που περιορίζει την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

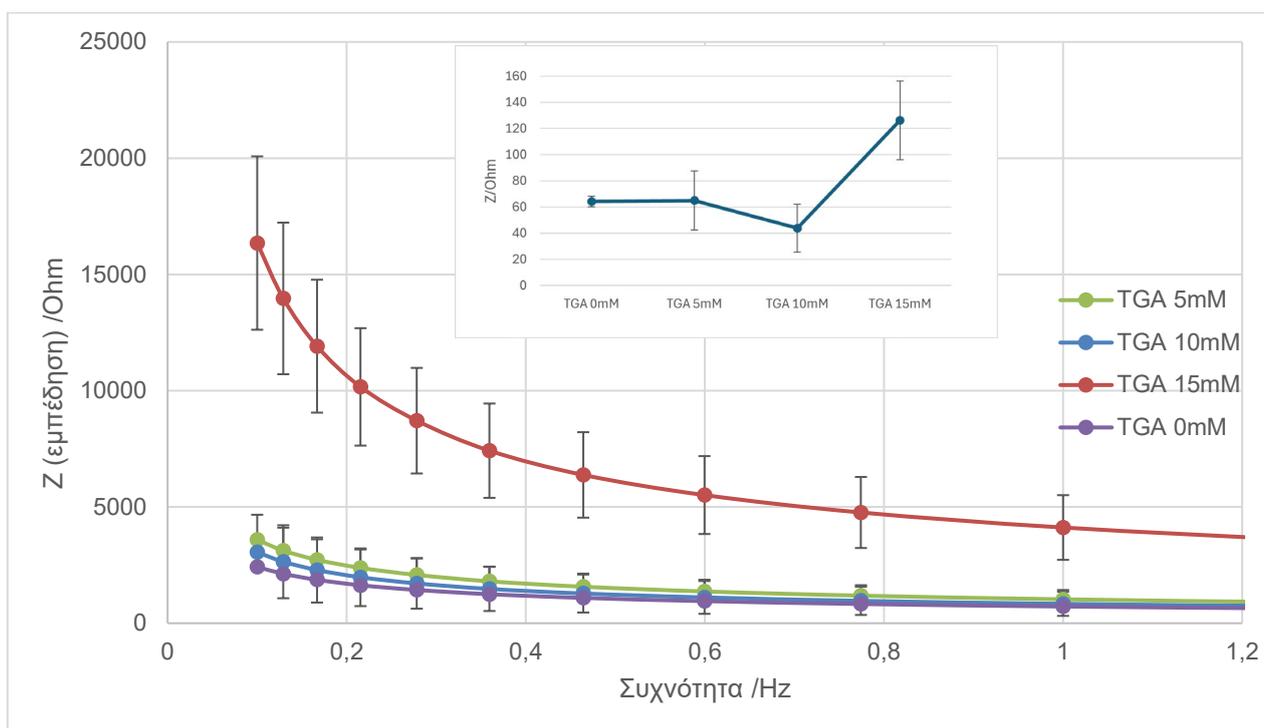
2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Βελτιστοποίηση των στοιχείων του βιοαισθητήρα

Για τη βελτιστοποίηση του βιοαισθητήρα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές συγκεντρώσεων κάθε υλικού και σε διαφορετικές συνθήκες συγκεντρώσεις και θερμοκρασίας. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκαν ηλεκτροχημικές μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας και φασματοσκοπία εμπέδησης. Για την εκτίμηση της μεταβολής της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς της επιφάνειας του ηλεκτροδίου χρησιμοποιήθηκε $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ συγκέντρωσης 5mM. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα αυτών, όπου είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση υλικού και συνθηκών με τις αντίστοιχες τυπικές τους αποκλίσεις.

Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης θειογλυκολικού οξέος:

Η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης θειογλυκολικού οξέος (TGA) για τη διασύνδεση του στην επιφάνεια χρυσού του βιοαισθητήρα πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης (Εικόνα 1.6.1-1). Η ανάλυση του μέτρου της σύνθετης αντίστασης $|Z|$ σε εύρος συχνοτήτων, καθώς και στη χαρακτηριστική συχνότητα των 100 Hz, έδειξε ότι η συγκέντρωση 5 mM δεν επηρεάζει ουσιαστικά την ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου, ενώ στα 10 mM παρατηρείται μείωση της εμπέδησης. Αντίθετα, η συγκέντρωση 15 mM οδήγησε σε σαφή και σημαντική αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου, υποδεικνύοντας αποτελεσματικότερη τροποποίηση της επιφάνειας. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα 15 mM TGA αποτελούν τη βέλτιστη συγκέντρωση για τη λειτουργική διασύνδεση της επιφάνειας του βιοαισθητήρα.

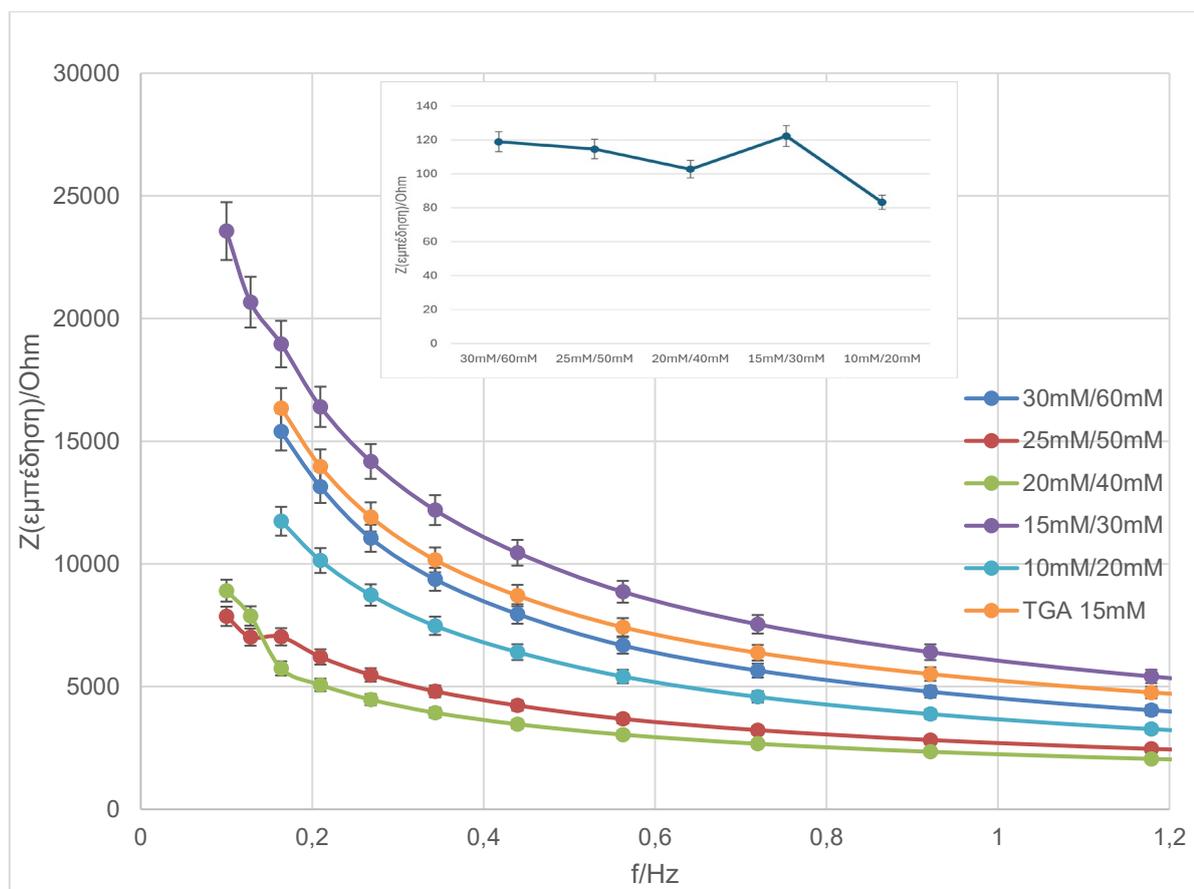


Εικόνα 1.6.1-1. Αποκρίσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) ως συνάρτηση της συχνότητας μετά από εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων θειογλυκολικού οξέος (0, 5, 10, 15 mM). Στο ένθετο γράφημα απεικονίζεται η τιμή της εμπέδησης στα 100 Hz.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην υπολογισμένη επιφάνεια μεταξύ του μη τροποποιημένου (bare) ηλεκτροδίου και των ηλεκτροδίων που τροποποιήθηκαν με θειογλυκολικό οξύ σε συγκεντρώσεις 5, 10 και 15 mM, για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$. Σε όλες τις συγκρίσεις τα p-values ήταν μεγαλύτερα από 0,05 και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης περιλάμβαναν το μηδέν, υποδηλώνοντας ότι η τροποποίηση με θειογλυκολικό οξύ δεν επηρέασε σημαντικά τη γεωμετρική επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Βελτιστοποίηση αναλογίας και συγκέντρωσης 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιιμιδίου/ N-Υδροξυ Σουκκινιμίδης (EDC/NHS):

Στην Εικόνα 1.6.1-2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βελτιστοποίησης της επιφανειακής ενεργοποίησης του ηλεκτροδίου με μίγμα EDC/NHS σε διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων, σε σύγκριση με ηλεκτρόδιο-μάρτυρα που περιείχε θειογλυκολικό οξύ. Οι μετρήσεις ηλεκτροχημικής εμπέδησης έδειξαν ότι ο συνδυασμός **15 mM/30 mM EDC/NHS** παρείχε τη μεγαλύτερη αύξηση της απόλυτης αντίστασης του συστήματος σε όλο το φάσμα συχνοτήτων. Το ίδιο συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε και από την αξιολόγηση στη συχνότητα των **100 Hz**, όπου η συγκεκριμένη συγκέντρωση παρουσίασε την υψηλότερη απόκριση. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός 15 mM/30 mM αποτελεί τη βέλτιστη συνθήκη για την αποτελεσματική ενεργοποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου.



Εικόνα 1.6.1-2. Αποκρίσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) μετά από εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων EDC/NHS. Στο ένθετο γράφημα απεικονίζεται η τιμή της απόλυτης εμπέδησης $|Z|$ στα 100 Hz, για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών ενεργοποίησης της επιφάνειας.

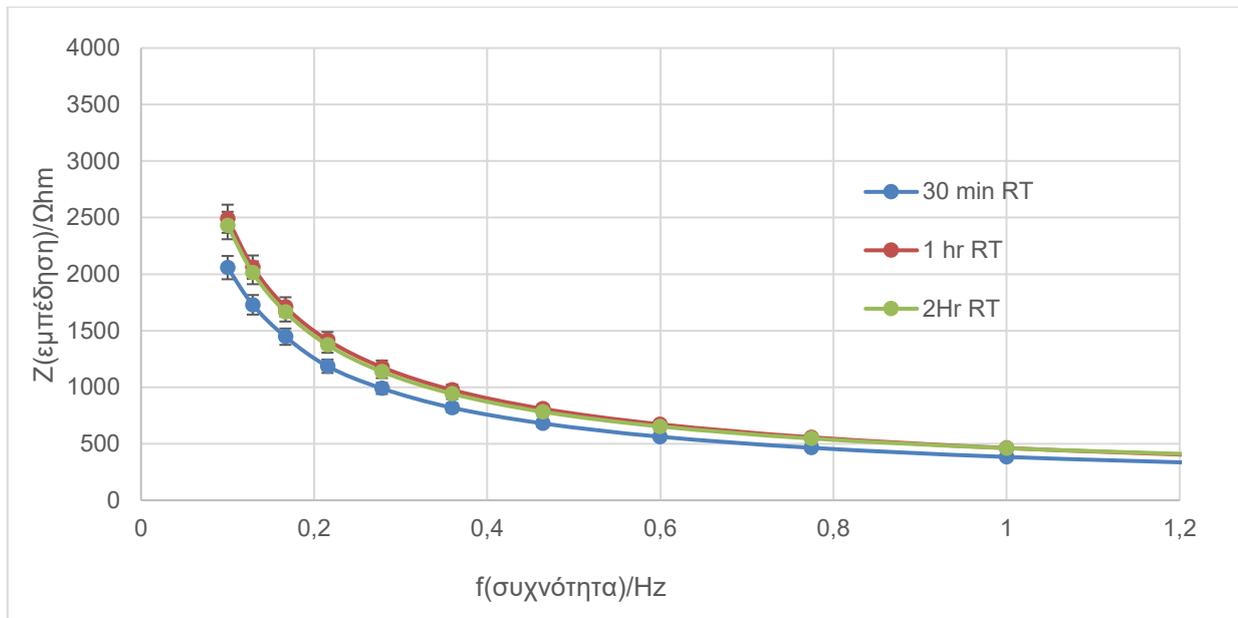
Πραγματοποιήθηκαν στατιστικοί έλεγχοι t-test ($\alpha = 0,05$) για τη σύγκριση του δείγματος ελέγχου TGA 15 mM με διάφορες συνθήκες ενεργοποίησης EDC/NHS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο ο συνδυασμός **EDC/NHS 15/30 mM** παρουσίασε **στατιστικά σημαντική διαφορά** σε σχέση με το δείγμα ελέγχου ($p = 0,00522$). Αντίθετα, οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις (30/60, 25/50, 20/40 και 10/20 mM) δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι ο συνδυασμός 15/30 mM αποτελεί τη βέλτιστη συνθήκη ενεργοποίησης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου.

Βελτιστοποίηση χρόνου και θερμοκρασίας επώασης αντισωμάτων:

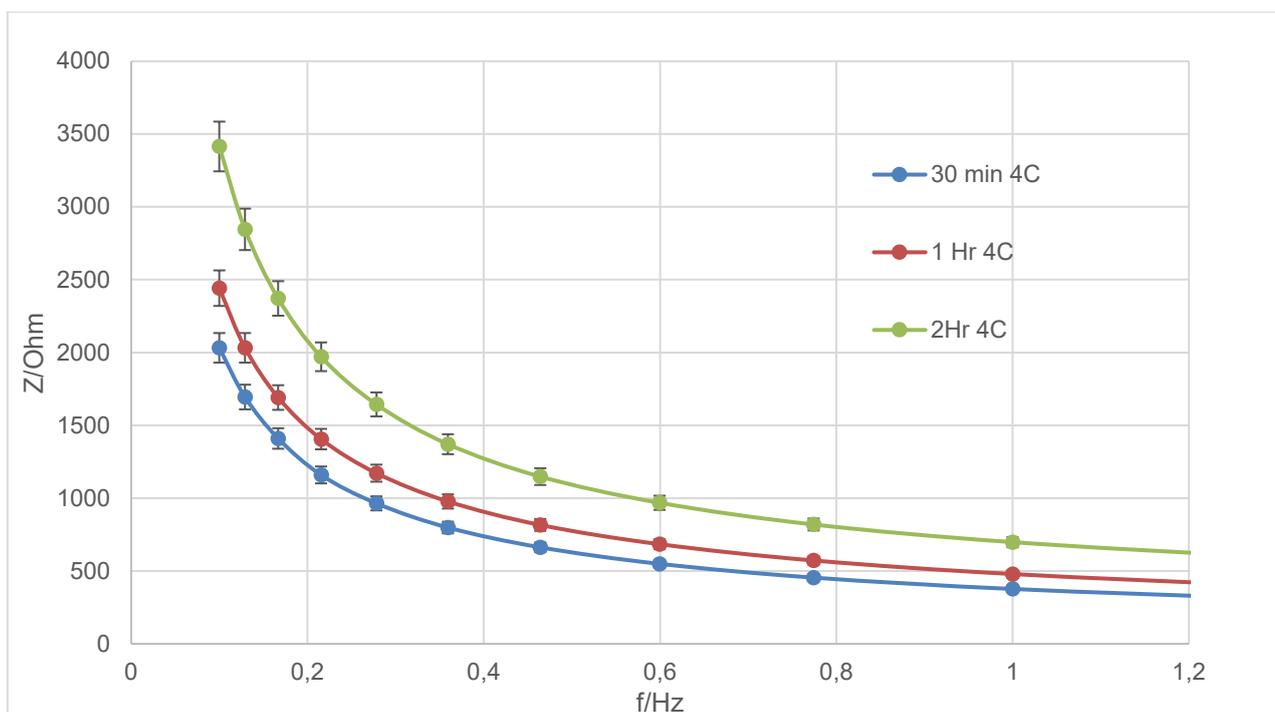
Η βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης των αντισωμάτων ωχρατοξίνης A μελετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (1.6.1-3) και στους 4 °C (1.6.1-4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση του χρόνου επώασης οδηγεί σε αύξηση της εμπέδησης, υποδηλώνοντας αποτελεσματικότερη πρόσδεση των αντισωμάτων και σχηματισμό παχύτερου βιολογικού στρώματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η επίδραση αυτή ήταν εντονότερη στους 4 °C, γεγονός που δείχνει ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία ευνοεί τη διατήρηση της δομής και της λειτουργικότητας των αντισωμάτων.

Η στατιστική ανάλυση (two-way ANOVA) έδειξε ότι η θερμοκρασία επώασης έχει

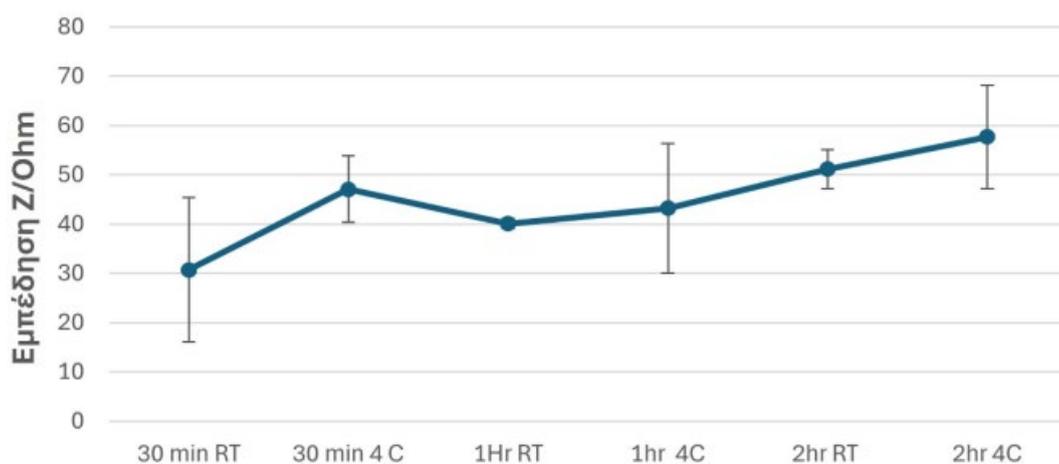
στατιστικά σημαντική επίδραση στην εμπέδηση ($p = 0,025$), ενώ ο χρόνος επώασης και η αλληλεπίδρασή του με τη θερμοκρασία δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική επίδραση. Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η επώαση στους 4 °C οδηγεί σε υψηλότερη και πιο σταθερή απόκριση του βιοαισθητήρα, ανεξάρτητα από τη διάρκεια επώασης (1.6.1-5).



Εικόνα 1.6.1-3. Αποκρίσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) μετά από επώαση του αντισώματος για την ωχρατοξίνη A για 30 λεπτά, 1 ώρα και 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 1.6.1-4. Αποκρίσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) μετά από επώαση του αντισώματος για την ωχρατοξίνη A για 30 λεπτά, 1 ώρα και 2 ώρες στους 4°C.

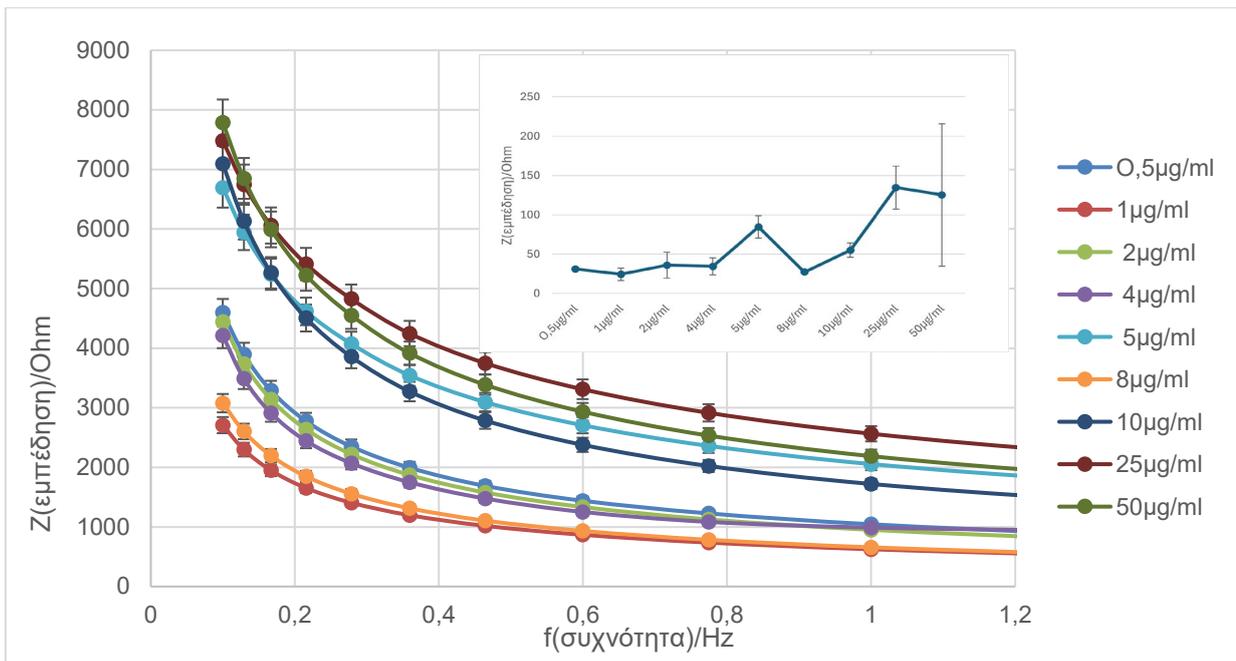


Εικόνα 1.6.1-5. Αποκρίσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) στη συχνότητα 100 Hz μετά από επώαση του αντισώματος για την ωχρατοξίνη A για 30 λεπτά, 1 ώρα και 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C.

Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος.

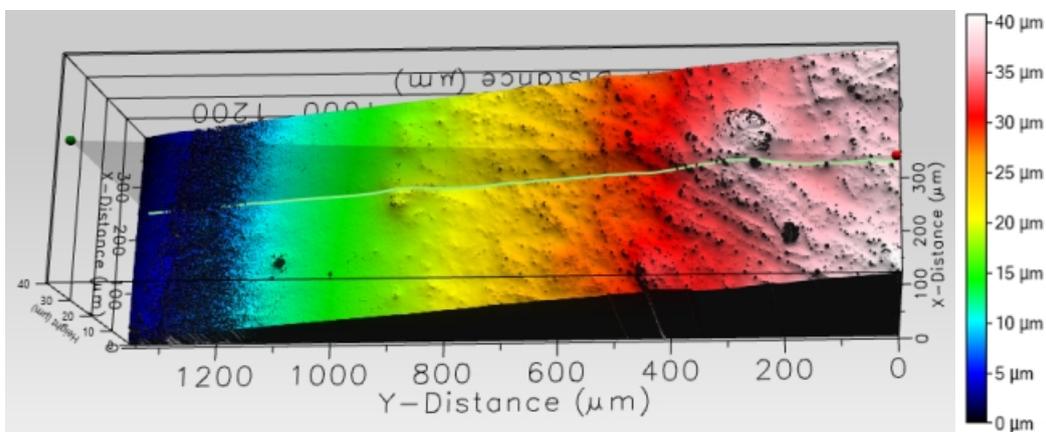
Οι δοκιμές βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης των ακινητοποιημένων αντισωμάτων, μέσω μετρήσεων ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης, έδειξαν ότι η ηλεκτροχημική απόκριση του βιοαισθητήρα μεταβάλλεται σημαντικά με τη συγκέντρωση των αντισωμάτων (1.6.1-6). Παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της απόλυτης εμπέδησης έως τη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{g/mL}$, ενώ στη συγκέντρωση των 8 $\mu\text{g/mL}$ καταγράφηκε πτωτική τάση, πιθανώς λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από την υπερβολική κάλυψη της επιφάνειας. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε εκ νέου αύξηση της απόκρισης, συνοδευόμενη όμως από αυξημένη τυπική απόκλιση.

Η στατιστική ανάλυση (one-way ANOVA) επιβεβαίωσε ότι η συγκέντρωση των αντισωμάτων επηρεάζει σημαντικά την αντίσταση μεταφοράς φορτίου ($p < 0,05$). Παρότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή, παρατηρήθηκε ανομοιογένεια διακυμάνσεων, ενώ οι μεταγενέστεροι έλεγχοι έδειξαν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων οδηγούν σε σημαντικά αυξημένες τιμές αντίστασης σε σχέση με τις χαμηλότερες, υπογραμμίζοντας τη σημασία της ορθής επιλογής συγκέντρωσης για τη βέλτιστη απόδοση του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 1.6.1-6. Αποκρίσεις απόλυτης εμπέδησης Z ως συνάρτηση της συχνότητας f μετά από εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων αντισώματος για την ωχρατόξινη A σε εύρος 0,5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Η τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου αξιολογήθηκε με Συμβολομετρία Λευκού Φωτός (WLI), αποκαλύπτοντας σημαντικές μεταβολές στη μικροτοπογραφία της (Εικόνα 1.6.1-7). Η αυξημένη μέση τραχύτητα ($S_a = 1,547 \mu\text{m}$) και το μεγάλο βάθος κοιλάδων ($S_v = 3,645 \mu\text{m}$) υποδηλώνουν έντονη επιφανειακή ανάγλυφη δομή, ενώ η αρνητική ασυμμετρία ($S_{sk} = -0,3$) δείχνει επικράτηση κοιλάδων έναντι κορυφών (Εικόνα 1.6.1-1). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν την επιτυχή επιφανειακή τροποποίηση του χρυσού ηλεκτροδίου μετά την ακινητοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ωχρατόξινης A , υποστηρίζοντας τη δημιουργία λειτουργικής επιφάνειας για τη λειτουργία του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 1.6.1-7. Τρισδιάστατη τοπογραφία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου χρυσού (Au) μετά τη διασύνδεση, όπως καταγράφηκε με White Light Interferometry (WLI)

Πίνακας 1.6.1-1. Ανάλυση μορφολογίας της επιφάνειας του ηλεκτροδίου χρυσού

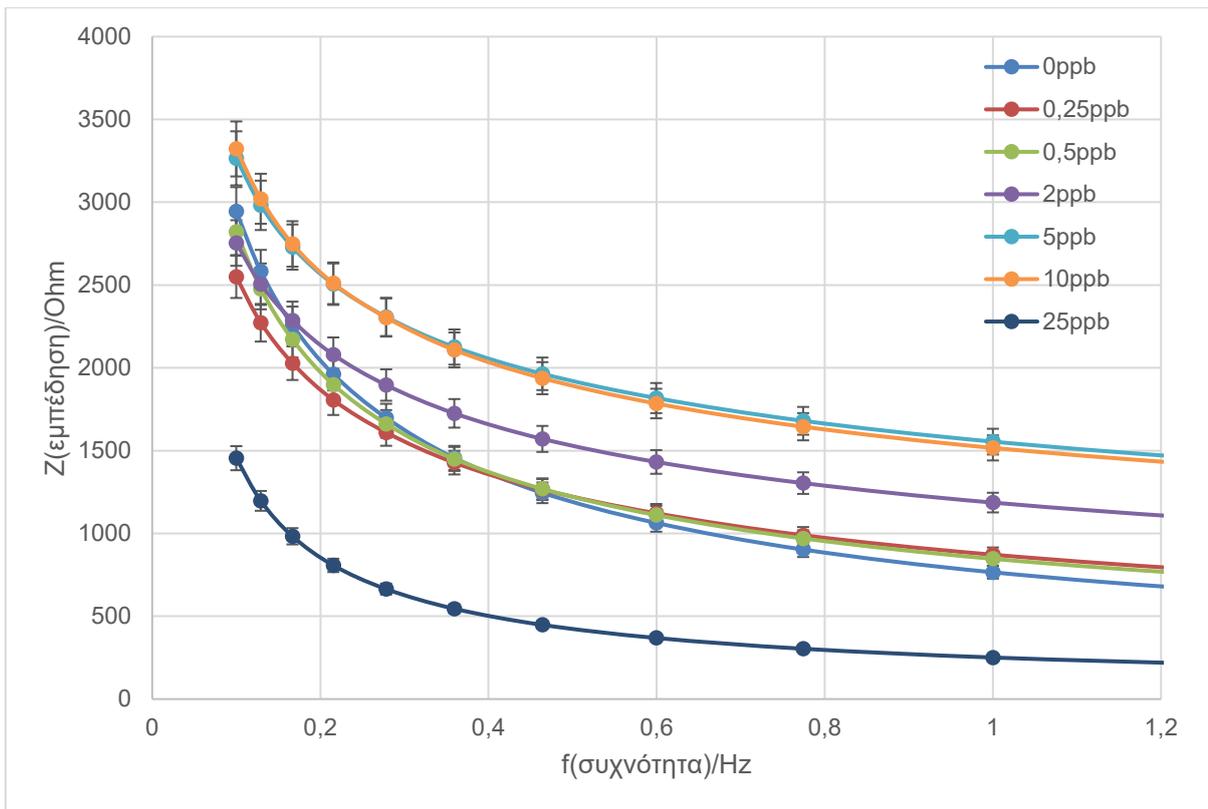
Παράμετρος	Τιμή	Μονάδα μέτρησης	Περιγραφή
Sp	2,971	μm	Ύψος κορυφής
Sv	3,645	μm	Βάθος κοιλότητας
St	3,616	μm	Μέγιστη κορυφή κοιλότητας
Sa	1,547	μm	Μέσος όρος ύψους
Sq	1,761	μm	Τετραγωνική μέση τιμή ύψους
Ssk	-0,3		Ασυμμετρία
Sku	1,78		Κύρτωση

Κατασκευή Πρότυπης Καμπυλης

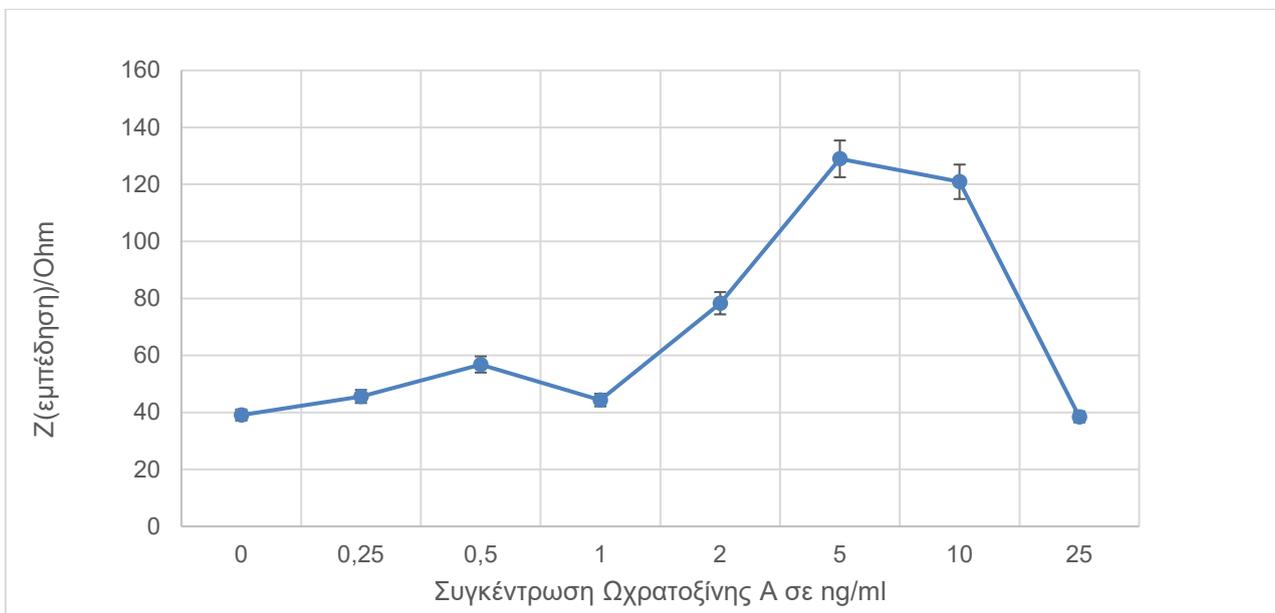
Παρουσιάζονται μετρήσεις ηλεκτροχημικής εμπέδησης για συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A από 0 έως 25 ng/mL, σε εύρος συχνοτήτων 0,1 Hz–10 kHz. Παρατηρείται συστηματική αύξηση του μέτρου της εμπέδησης $|Z|$ με την αύξηση της συγκέντρωσης της ΟΤΑ, ιδιαίτερα σε χαμηλές συχνότητες, φαινόμενο που αποδίδεται στη δέσμευση της τοξίνης στα ακινητοποιημένα αντισώματα και στον σχηματισμό βιολογικού στρώματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (Εικόνα 1.6.1-8).

Για την ποσοτική αξιολόγηση της απόκρισης του αισθητήρα επιλέχθηκε η συχνότητα των 100 Hz, όπου καταγράφηκε αυξημένη ευαισθησία (Εικόνα 1.6.1-9). Η σχετική μεταβολή της εμπέδησης παρουσίασε ικανοποιητική γραμμικότητα έως τη συγκέντρωση των 5 ng/mL, επιτρέποντας την ποσοτική ανίχνευση της ΟΤΑ. Η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 1.6.1-10) επιβεβαιώνει τη σαφή συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης του βιοαισθητήρα, αποδεικνύοντας την αποτελεσματική λειτουργία του σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

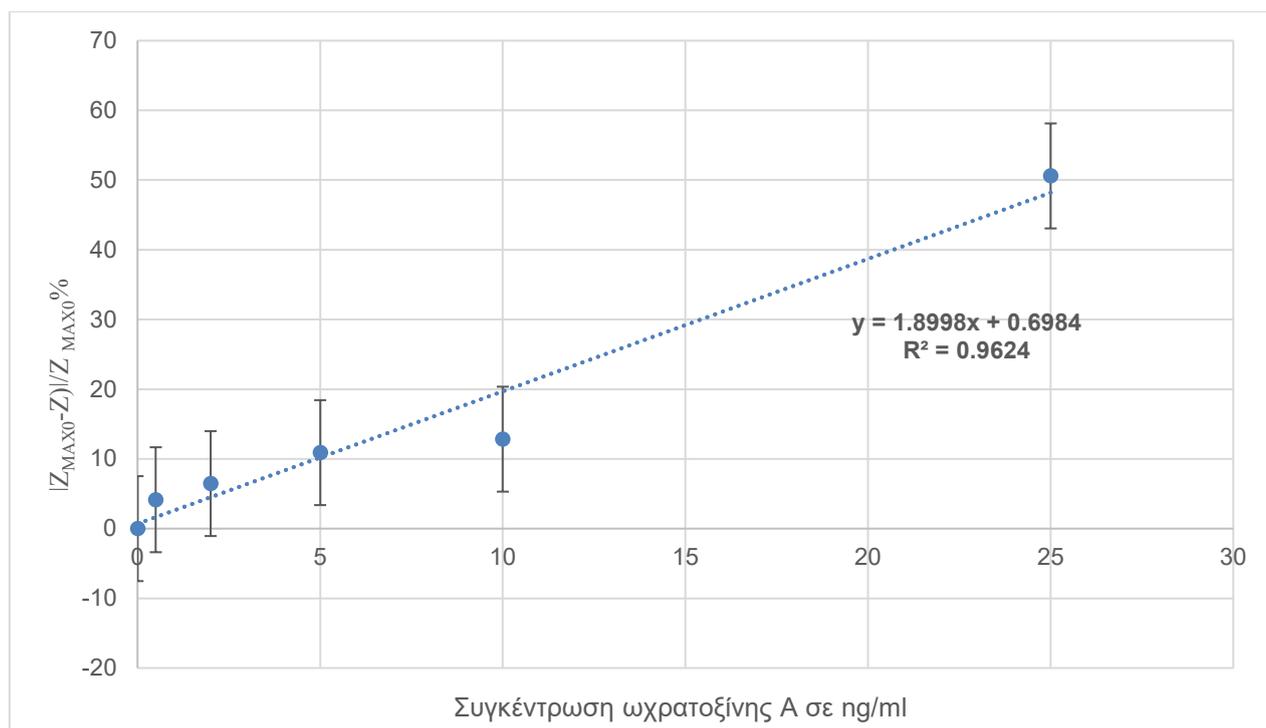
Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι περισσότερες μετρήσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$), με εξαίρεση τις συγκεντρώσεις 2 ppb και 5 ppb, οι οποίες εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, υπογραμμίζοντας την αυξημένη ευαισθησία του συστήματος σε επίπεδα κοντά στα νομοθετικά όρια.



Εικόνα 1.6.1-8. Διάγραμμα που απεικονίζει τις μέσες τιμές της σύνθετης αντίστασης $|Z|$ ως συνάρτηση της συχνότητας για διαφορετικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A (ΟΤΑ) σε ppb.



Εικόνα 1.6.1-9. Αποκρίσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης $|Z|$ στη συχνότητα 100 Hz μετά από εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ωχρατόξινης A σε εύρος 0,25-25 ng/ml.



Εικόνα 1.6.1-10. % μεταβολή της εμπέδησης $|Z|$ στη συχνότητα 100 Hz μετά από εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης A σε εύρος 0,25-25 ng/ml.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένας ηλεκτροχημικός εμπειρομετρικός ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση της ωχρατοξίνης A. Η τροποποίηση χρυσού ηλεκτροδίου με αυτο-οργανωμένες μονοστοιβάδες και η ομοιοπολική ακινητοποίηση αντισωμάτων μέσω χημείας EDC/NHS οδήγησαν στη δημιουργία σταθερής και λειτουργικής επιφάνειας, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με μελέτη μορφολογικής ανάλυσης. Η βελτιστοποίηση κρίσιμων παραμέτρων, όπως ο χρόνος και η συγκέντρωση επώασης των αντισωμάτων, βελτίωσε σημαντικά την εμπειρομετρική απόκριση του αισθητήρα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ωχρατοξίνης A προκαλεί μετρήσιμες μεταβολές στην αντίσταση μεταφοράς φορτίου, επιτρέποντας την κατασκευή πρότυπης καμπύλης στο εύρος 0–25 ng/mL. Ο αισθητήρας παρουσίασε ικανότητα ανίχνευσης συγκεντρώσεων σχετικών με το ευρωπαϊκό νομοθετικό όριο για τον οίνο, με μέγιστο όριο ανίχνευσης τα 5 ng/mL, σε συμφωνία με αποτελέσματα HPLC.

Παρότι ο αναπτυγμένος βιοαισθητήρας παρουσιάζει σημαντική δυναμική για εφαρμογές ασφάλειας τροφίμων, αναγνωρίζονται δυνατότητες περαιτέρω βελτίωσης, όπως η χρήση νανοδομημένων υλικών ή αγώγιμων πολυμερών, η ενίσχυση της επαναληψιμότητας και η διερεύνηση εναλλακτικών στοιχείων βιοαναγνώρισης (π.χ. απταμερή). Οι προτεινόμενες κατευθύνσεις μπορούν να οδηγήσουν σε πιο ευαίσθητα και αξιόπιστα εργαλεία για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε σύνθετες μήτρες, όπως ο οίνος, ενισχύοντας τη συνολική ασφάλεια των τροφίμων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Cumba, L. R., Foster, C. W., Brownson, D. A. C., Smith, J. P., Iniesta, J., Thakur, B., do Carmo, D. R., & Banks, C. E. (2016). Can the mechanical activation (polishing) of screen-printed electrodes enhance their electroanalytical response? *The Analyst*, 141(9), 2791–2799. <https://doi.org/10.1039/C6AN00167J>

De Benedetto, G. E., Di Masi, S., Pennetta, A., & Malitesta, C. (2019). Response Surface Methodology for the Optimisation of Electrochemical Biosensors for Heavy Metals Detection. *Biosensors*, 9(1), 26. <https://doi.org/10.3390/bios9010026>

Lim, C. Y., Owens, N. A., Wampler, R. D., Ying, Y., Granger, J. H., Porter, M. D., Takahashi, M., & Shimazu, K. (2014). Succinimidyl Ester Surface Chemistry: Implications of the Competition between Aminolysis and Hydrolysis on Covalent Protein Immobilization. *Langmuir*, 30(43), 12868–12878. <https://doi.org/10.1021/la503439g>

Ron, H., & Rubinstein, I. (1998). Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 3. Alkylthiol and Dialkyl Disulfide Assembly on Gold under Electrochemical Conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 120(51), 13444–13452. <https://doi.org/10.1021/ja9823722>

Stan, D., Mirica, A. C., Iosub, R., Stan, D., Mincu, N. B., Gheorghe, M., Avram, M., Adiaconita, B., Craciun, G., & Mateescu, A. L. B. (2022). What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? *Processes*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pr10040723>

Zamzami, M., Ahmad, A., Alamoudi, S., Choudhry, H., Hosawi, S., Rabbani, G., Shalaan, E. S., & Arkook, B. (2024). A highly sensitive and specific Gold Electrode-Based electrochemical immunosensor for rapid On-Site detection of *Salmonella enterica*. *Microchemical Journal*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110190>