



**Forebyggelse af mykotoksindannelse i
økologisk brødkorn**

**-med fokus på *Penicillium verrucosum* og dannelse af
ochratoksin A**

Specialeprojekt
Maiken Schioldann Haase
Biologisk Institut
Aarhus Universitet
April 2003

Forebyggelse af mykotoksindannelse i økologisk brødkorn

-med fokus på *Penicillium verrucosum* og dannelse af
ochratoksin A

Delprojekt I
Moniteringsprojekt i økologisk landbrug

Delprojekt II
Kornarters modstandsdygtighed over for *P. verrucosum* ved
spredning fra induceret enkeltkernehotspot

Vejledere:

Niels Peter Revsbech, professor, dr. scient, Afdeling for Mikrobiel Økologi, Biologisk Institut, Aarhus Universitet, DK-8000 Århus C.

Susanne Elmholt, seniorforsker, Afdeling for Jordbrugsproduktion og Miljø, Danmarks JordbrugsForskning, Forskningscenter Foulum, P.O. Box 50, DK-8830 Tjele.

Forsideillustration: Beskadigede bygkerner inokuleret med *Penicillium verrucosum*

Forord

Dette specialeprojekt er den afsluttende opgave på biologiuddannelsen ved Aarhus Universitet. Specialet er skrevet med tilknytning til projektet "Prevention of mycotoxins" (PREMYTOX) under Forskningscenter for Økologisk Jordbrug (FØJO) ved Danmarks JordbrugsForskning (DJF), Forskningscenter Foulum.

Data er baseret på prøver udtaget på en udvalgt økologisk drevet bedrift efteråret 2000 og 2001 samt prøver udtaget i en eksperimentel forsøgsopstilling på Forskningscenter Foulum mellem oktober 2001 og september 2002.

Det var mit ønske at skrive specialeprojektet med tilknytning til DJF dels for at få et indblik i, hvad det vil sige at arbejde i sektorforskningen, dels for at blive tilknyttet et praksisnært projekt i samarbejde med en forskergruppe. Dette ønske blev til fulde opfyldt. Det har været en stor motivationsfaktor både at samarbejde med de tilknyttede personer på Foulum og at være med til at producere resultater, der kan anvendes i praksis. Jeg har deltaget i et projekt, der er særdeles relevant og aktuelt for både producenter, forbrugere og videnskabsfolk. Vi har fået resultater, der stiller flere spørgsmål, end de besvarer, men det er præmisserne, når vi fordyber os.

Jeg vil gerne takke mine vejledere Susanne Elmholt, Forskningscenter Foulum, og Niels Peter Revsbech, Aarhus Universitet. Tak til Afdeling for Jordbrugsproduktion og Miljø samt FØJO for at gøre det muligt at skrive dette specialeprojekt. Tak til driftslederen på den udvalgte bedrift for godt samarbejde og for at stille bedriften til rådighed. Tak til personalet på Afdeling for Jordbrugsproduktion og Miljø specielt til Jørgen Munksgaard Nielsen, Henning Hougaard, Finn Christensen, Anne Sehested og Rita C. Bundgaard, Foulum, samt Erik Fløjgaard Kristensen, Bygholm, for teknisk assistance og vejledning. Tak til Peter H. Rasmussen, Fødevaredirektoratet, for OTA-analyser og til Preben Blæsild, Aarhus Universitet, for assistance med statistikken. En speciel tak til Knud Larsen for råd og kommentarer, Mette Struwe Bertelsen for hjælp til opsætning og min søster Sanne for korrekturlæsning. Min familie skylder jeg stor tak for støtte og opbakning. Endelig vil jeg takke Poul for at have hjulpet mig på alle måder.

Indholdsfortegnelse

1. Indledning	6
2. Teoridel	9
2.1 Mykotoksiner og mykotoksindannende svampe	9
2.1.1 Definition af mykotoksiner	9
2.1.2 Hvilke mykotoksiner findes?	10
2.1.3 Ochratoksin A	14
2.1.4 Hvorfor dannes mykotoksiner og hvad bruges de til?	15
2.1.5 Konsekvenser af OTA-optagelse	16
2.1.6 Regulatorer for OTA	18
2.1.7 Mark- og lagersvampe	20
2.2 Metoder til identifikation og detektion	21
2.2.1 Direkte eksamination	21
2.2.2 Direkte udlægning på DYSG-agar	22
2.2.3 Pladespredning	23
2.2.4 Tyndtlagskromatografi (Thin-layer chromatography, TLC)	25
2.2.5 Højtryksvæskeskromatografi (High performance liquid chromatography, HPLC)	25
2.2.6 Molekylær bestemmelse (PCR, RAPD og AFLP)	26
2.2.7 Bestemmelse af Ergosterol	26
2.2.8 Flygtige metabolitter –elektronisk næse	26
2.2.9 Bestemmelse af vandindhold	27
2.2.10 Overfladesterilisering	28
2.3 <i>Penicillium verrucosum</i>	28
2.3.1 Morfologi, taksonomi og toksiner	28
2.3.2 Vækst	30
2.3.3 Udbredelse	31
2.3.4 Forekomst	31
2.3.5 Økologi, kontamineringsveje og livscyklus	31
2.4 Økologiske faktorer der påvirker vækst og ochratoksindannelse	34
2.4.1 Fysisk/kemiske faktorer	34
2.4.2 Biologiske faktorer	40
2.4.3 Genetiske faktorer	42
2.4.4 Opsummering af faktorer	43
2.5 Forskellige lagrings- og tørringsmetoder	44
2.6 Fysiske faktorer under lagring	45
2.7 Fysiske faktorer i korn	50
2.8 Økologisk/konventionel dyrkning af brødkorn	52
2.9 Forebyggelse	54
3. Delprojekt I: Monitorering i økologisk landbrug	56
3.1 Baggrund for forsøgsopstilling	56
3.1.1 Lokalitet	56
3.1.2 Tørringsfaciliteter	56
3.1.3 Prøvetagningsåret 2000	57
3.1.4 Prøvetagningsåret 2001	58
3.2 Materialer og metoder	59
3.2.1 Prøvetagningsprocedure	59
3.2.2 Proceduren for prøveudtagning i år 2001	63
3.3 Analysemetoder	63
3.3.1 Mikrobiologisk analysemetode for <i>P. verrucosum</i>	63
3.3.2 Statistik for data fra år 2000	63
3.3.3 Statistik for data fra år 2001	66
3.3.4 Vandbestemmelsesanalyse	66
3.3.5 Ochratoksin A-analyse	66
3.3.6 Luftanalyser	66
3.3.7 Pilotpladespredning af hessian	67

3.4 Resultater	68
3.4.1 Kontaminering med <i>P. verrucosum</i> år 2000	68
3.4.2 Kontaminering med <i>P. verrucosum</i> år 2001	75
3.4.3 Vandprocentanalyse	79
3.4.4 Okratoksin A- analyser	81
3.4.5 Luftanalyser i hoved- og sidekanaler	87
3.4.6 Pilotpladespredning af hessian	89
3.5 Diskussion	90
4. Delprojekt II: Kornarters modstandsdygtighed over for <i>P. verrucosum</i> ved spredning fra induceret enkeltkernehotspot	95
4.1 Baggrund for forsøgsopstilling	95
4.2 Materialer og metoder	96
4.2.1 Forberedelsesfase	96
4.2.2 Forberedelse af byginokulat og kontrolbyg	97
4.2.3 Forberedelse af det øvrige korn	102
4.2.4 Opstilling af forsøg	103
4.2.5 Prøvetagningsprocedure	105
4.3 Analysemetoder	106
4.4 Resultater	107
4.4.1 Screening for kontaminering med <i>P. verrucosum</i>	107
4.4.2 Overfladesterilisering	113
4.4.3 Vandbestemmelse	114
4.4.4 Pladespredning	114
4.4.5 Diversitet	116
4.4.6 Temperatur- og RH-måling	117
4.5 Diskussion	118
5. Fælles diskussion og konklusion	125
6. Referencer	138

APPENDIKS

- Appendiks 1: Artikler
- Appendiks 2: Delprojekt I
- Appendiks 3: Delprojekt II

1. Indledning

Mykotoksiner er giftige metabolismeprodukter produceret af svampe (Scudamore & Wilkin, 1999). Ordet er afledt af det græske mykês, der betyder svamp. Hvilke mekanismer, der regulerer svampemetabolismen og dannelsen af toksiner, og hvilken rolle metabolitterne har i svampenes livscyklus, ved vi stadig meget lidt om.

Nogle af metabolismeprodukterne er til gavn for mennesker bl.a. ved anvendelse inden for den farmaceutiske industri, andre er skadelige. Ochratoksin A (OTA) er et eksempel på et af de skadelige metabolismeprodukter. Det er et af de vigtigste mykotoksiner globalt set, og sundhedsrisikoen for mennesker og dyr er blevet påvist (Scudamore & Wilkin, 1999). OTA er både nephrotoksisk, carcinogent, teratogent og immunotoksisk (Marquart & Frohlich, 1992). I de tempererede områder forekommer OTA specielt i cerealier, hvor det produceres af *Penicillium verrucosum*. *P. verrucosum* karakteriseres som en lagersvamp (Frisvad, 1995). Lagersvampes økologi og livshistorie i kornmarker og deres rolle i naturlige plantesamfund ved man reelt meget lidt om (Wicklow, 1995). Lillehøj & Elling (1983) understreger vigtigheden af, at vi forstår økologien bag den naturligt forekommende OTA i fødevarer, og derfor er det essentielt at kende den toksinproducerende svamps cyklus fra jord til korn og tilbage til jord igen.

Vi ved om *P. verrucosum*:

- at den er fundet naturligt i danske jorde (Elmholt, 2003)
- at den kan overleve i markjord i mange måneder og overvintre (Elmholt & Hestbjerg 2000)
- at den kan opformeres i jord (Elmholt & Hestbjerg 2000)
- at den forekommer i nytærsket korn (Elmholt, 2003)
- at den forekommer specielt ved våde høstår (Jørgensen *et al.*, 1996)
- at den trives i lagret korn og kan opformeres til høje niveauer (Elmholt, 2003; egne resultater)
- at den kan overleve i lagre fra år til år (egne undersøgelser)
- at bestemte fysisk/kemiske, biologiske og genetiske faktorer er bestemmende for dens trivsel (Northolt, 1979; Frisvad, 1995; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000)
- at interaktioner mellem mange faktorer er afgørende for svampens vækst og mykotoksindannelse (Frisvad, 1995)

Studier af *P. verrucosum* viser dog stor variation mellem marginale betingelser for vækst og dannelse af OTA. Specielt om dannelsen af OTA findes der mange ubesvarede spørgsmål.

Vi ved *ikke* entydigt om OTA:

- kan dannes af *P. verrucosum* i jorde (Elmholt, 2003)
- hvorfor det produceres (Hestbjerg, 1999)
- hvilke betingelser der ”trigger” dannelsen (Harwig & Chen, 1974; Northolt *et al.*, 1979; Lillehøj & Elling, 1983; Filtenborg *et al.*, 1990; Madhyastha *et al.*, 1990; Marquart & Frohlich, 1992; Müller & Boley, 1992; Frisvad, 1995; Marquardt & Ronald, 1996; Abramson, 1997; Scudamore & Wilkin, 1999; Pitt *et al.*, 2000)

EUs ”Scientific Committee of Food (SCF) anbefaler, at det tolerable daglige indtag (TDI-værdi) for OTA skal være så lavt som mulig og ikke højere end 5 ng/kg legemsvægt/dag (Jørgensen *et al.*, 1996). Undersøgelser af det daglige konsum af OTA på baggrund af europæiske data for forekomst og kost viste gennemsnitsværdier på 1,8 ng/kg legemsvægt/dag (Walker, 1999).

Indtagsberegninger foretaget på baggrund af Fødevaredirektoratets overvågningssystem fra 1986-1997 viste, at den primære kilde til optagelse af OTA er konsum af korn og kornprodukter.

Resultaterne viste desuden, at personer, der udelukkende spiser økologiske kornprodukter, har risiko for at overstige den anbefalede TDI-værdi. I 1995 blev der indført en grænseværdi på 5 µg/kg for indhold af OTA i korn og kornprodukter for humant konsum. Beregninger viser, at hvis denne grænseværdi overholdes, er befolkningen sikret mod overskridelse af TDI-værdien (Jørgensen *et al.*, 1996). Resultater fra overvågningssystemet og egne resultater viser dog, at der i nogle tilfælde i korn forekommer OTA-værdier langt over grænseværdien. Derfor er det vigtigt at forebygge, hvor vækst af *P. verrucosum* og dannelse af OTA kan forekomme.

Dette projekt præsenterer resultater, der belyser og stiller nye spørgsmål til aspekter af *Penicillium verrucosum*s økologi.

Projektet er et resultat af et litteraturstudie (teoridel), et monitoringsprojekt (delprojekt I) og et forsøgsprojekt (delprojekt II).

Formålet var:

- at undersøge hvordan udvikling af *P. verrucosum* og dannelse af OTA kan forebygges. Herunder var det nødvendigt at undersøge hvilke betingelser, der favoriserer vækst af *P. verrucosum* og dannelse af OTA

- at undersøge et planlager på en økologisk bedrift for at få en praksisrelateret indgangsvinkel til problemstillingen
- at afprøve metoder og konstruere en forsøgsopstilling, der kunne bidrage med viden omkring *P. verrucosums* evne til at sprede sig fra hotspot

Original referencer, som jeg ikke selv har læst, er i samråd med min vejleder refereret på følgende måde, Bennet & Bentley (1989) (iflg. Hestbjerg, 1999) diskuterer...

Delprojekt I

Resultaterne herfra fokuserer specielt på tørringsfaciliteterne ved en udvalgt økologisk bedrift.

Baggrunden for valget af denne bedrift er, at bedriften har indgået i en tidligere casestudy (Elmholt, 2003), hvor der opstod mistanke om, at bedriften havde problemer med *P. verrucosum*.

Projektet belyser desuden tendensen til, at der er større problemer med *P. verrucosum* og dannelse af OTA på økologisk drevne bedrifter.

Delprojekt II

Det eksperimentelle projekt omfatter studier af *P. verrucosums* evne til at sprede sig fra inducerede hotspots samt en undersøgelse af, om der er forskel på kornarters modstandsdygtighed.

Artikler

Nogle af resultaterne fra delprojekt I har dannet baggrund for en artikel til "Økologisk Jordbrug" med økologiske landmænd som målgruppe. Artiklen udkom den 18. april 2003. Artiklen er oversat til engelsk og udkommer i det internationale nyhedsbrev fra Danish Research Centre for Organic Farming (DARCOF), <http://www.darcof.dk/enews/may03/index.html>. Den udkommer maj 2003. Artiklerne er vedlagt i appendiks

1.

2. Teoridel

2.1 Mykotoksiner og mykotoksindannende svampe

Mykotoksiner i foder og fødevarer har været et problem for menneskeheden fra kultiveringen af korn begyndte for århundreder siden. I dag udgør mykotoksinforureninger stadig en væsentlig risiko for foder og fødevarereproduktionen og for sundhedstilstanden hos mennesker og dyr.

2.1.1 Definition af mykotoksiner

Mykotoksiner er ifølge Abramson (1998) naturligt forekommende sekundære produkter fra svampe, der ved optagelse gennem foder og fødevarer er giftige.

Denne definition ekskluderer mykotoksiner, der er frembragt i laboratoriet samt zearaleon og de tilhørende derivater, der i stedet har østrogenlignende effekt og derfor tilhører gruppen af svampeøstrogener (Abramson, 1998). Ligeledes negligerer definitionen gruppen af toksiner, som har fytotoksiske effekter (påvirkning af planter) (Desjardins & Hohn, 1997) (iflg. Hestbjerg, 1999) og antibiotiske effekter (påvirker andre mikroorganismer) (Vesonder & Golinski, 1989) (iflg. Hestbjerg, 1999). Dette har givet ophav til megen diskussion om anvendelsen af termen mykotoksin. Termen 'mycotoxins' foreslås introduceret i stedet for 'mycotoxins' (Hestbjerg, 1999).

Betydningsmæssigt omfatter ordet mykotoksiner i sig selv en bredere definition, eftersom myko kommer af græsk 'mykes om svampe og toksiner af græsk tok' sikon for giftstof. Jeg ser derfor ingen grund til at ændre termen. I stedet anvendes her en udvidet definition, der også omfatter toksiske effekter på andre organismer.

Sekundære metabolitter er produkter, der produceres efter den aktive vækstfase. Modsat primærmetabolisme har sekundærmetabolisme ikke noget med syntesen af cellemateriale og normal vækst at gøre. Mykotoksiner hører under kategorien sekundære metabolitter (Prescott *et al.*, 1993). Inddelingen i primær og sekundær svampemetabolisme er dog omdiskuteret (Benett & Bentley, 1989; Bennett, 1995 (iflg. Hestbjerg, 1999)). Bennet & Bentley (1989) (iflg. Hestbjerg, 1999) diskuterer definitionen af sekundær metabolisme og belyser:

- at sekundær metabolisme ikke er essentiel for vækst (Bu'Lock, 1975) (iflg. Hestbjerg, 1999)
- at sekundære produkter ikke har stor biologisk udbredelse. Nogle slægter er eneste producent af et sekundært produkt, hvorimod primærprodukter har stor biologisk udbredelse

- at de metaboliske forløb ved dannelsen af sekundære metabolitter er langt mere komplekse end den kortere biosyntetiske vej, mange af primærprodukterne har
- at sekundære metabolitter ikke har nogen tydelig funktion i svampes livscyklus

Argumenterne imod at inddele i primær- og sekundærsvampemetabolisme er bl.a., at sekundære metabolitter har en funktion i svampenes livscyklus, at de er naturligt forekommende, at de har specifikke funktioner, samt at biosyntetiseringen er en energikrævende proces, der må være rentabel for organismerne (Maplestone *et al.*, 1992) (iflg. Hestbjerg, 1999). Anvendelsen af termen ”sekundær” er desuden kontroversiel, idet nomenklaturen antyder, at produkterne er mindre vigtige. Derfor har der bl.a været forslag om at erstatte primær og sekundær med ”generel” og ”speciel” (Bennet & Bentley, 1989) (iflg. Hestbjerg, 1999). En ny definition af sekundærm metabolitter blev foreslået af Frisvad (1998) (iflg. Hestbjerg, 1999, s. 6): ”*Secondary metabolites are extrovert chemical differentiation products produced by living organisms*”.

Jeg vil i det følgende anvende en bred definition, hvor mykotoksiner er svampemetabolitter, som er giftige for andre organismer.

2.1.2 Hvilke mykotoksiner findes?

Mere end 300 mykotoksiner er identificeret i laboratoriestudier, men blot 20 er naturligt forekommende i mængder, der er til fare for fødevarer sikkerheden (Smith *et al.*, 1994). For landbruget er det primært 6 grupper af mykotoksiner, som har betydning. Disse er: aflatoxiner, ochratoxin A, patulin, fumonisiner, trichothecener, og zearalenon (Pittet, 1998) (Tabel 2.1.1). I tabel 2.1.1 er der yderligere tilføjet citrinin, xanthomegnin og viomellein, idet Frisvad (1995) føjer dem til trichothecener, zearalenon og ochratoxin A som de vigtigste mykotoksiner i lager i tempererede klimatiske zoner.

Nogle slægter producerer kun en type mykotoksin, mens andre producerer flere. Endvidere er der flere slægter, som producerer samme type mykotoksin (Smith *et al.*, 1994).

Tabel 2.1.1 Hovedgruppe af mykotoksiner der giver problemer i landbruget og eksempler på producenterne og deres forekomst.

Mykotoksiner	Eks. på producerende svampe og deres forekomst
Aflatoksiner B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ og M ₁	<i>Aspergillus flavus</i> (cerealier, krydderier, nødder, tørrede figer), <i>A. parasiticus</i> (cerealier, nødder, jord), <i>A. nomius</i>
Ochratoxin A	<i>Penicillium verrucosum</i> (cerealier, jord), <i>Aspergillus alutaceus</i>
Citrinin	<i>Penicillium verrucosum</i> (cerealier, jord), <i>P. citrinum</i> , <i>P. terrus</i> (cerealier)
Xanthomegnin	<i>P. freii</i> (cerealier), <i>P. cyclopium</i> (cerealier)
Viomellein	<i>P. freii</i> (cerealier), <i>P. cyclopium</i> (cerealier)
Patulin	<i>Penicillium expansum</i> (frugt, jord), <i>Aspergillus alutaceus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>
Trichothecener (ex.DON)	<i>Fusarium graminearum</i> (cerealier, græsser, jord), <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> (jord), <i>F. poae</i> (cerealier, jord, ærter), <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i> (cerealier, citrusfrugter, bananer, jord)
Zearalenon	<i>Fusarium equiseti</i> (cerealier, jord), <i>F. graminearium</i> (cerealier, græsser, jord), <i>F. culmorum</i> (cerealier, kartofler, ærter, jord), <i>F. crookwellense</i> (cerealier, kartofler, jord)
Fumonisin	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> (ris, majs, frugt, korn)

(baseret på Samson et al., 2000; Elmholt & Kristensen, 2001; Pittet, 1998)

Aflatoksiner

Aflatoksiner forekommer hovedsageligt i afgrøder i fugtige tropiske og subtropiske klimaer. I EU findes de i importerede fødevarer (Elmholt & Kristensen, 2001). De produceres primært af *A. flavus* og *A. parasiticus*, der henholdsvis er dominerende på planter og i jordmiljøer. De er indelt i B- og G-grupper efter deres fluorescerende egenskaber (Pittet, 1998). B₁, B₂, G₁ og G₂ er naturligt forekommende, mens aflatoksin M₁ er et derivat af B₁. M₁ fremkommer som konsekvens af en detoxificering eller hydrolisering i mælk fra lakterende dyr inklusiv mennesker, der har indtaget kontaminerede produkter med aflatoksin B₁ (Smith *et al.*, 1994). Det hænder dog, at aflatoksin B₁ forekommer i tempererede områder, og her specielt i cerealier, der er behandlet med forsurende produkter og opbevaret fugtigt. Aflatoksiner kan være akut toksiske, carcinogene, mutagene, teratogene og immunforsvaretsnedsættende for de fleste dyregrupper (Smith *et al.*, 1994), (Frisvad, 1995). Risikoen for forekomst af aflatoksiner er størst i bl.a. majs, jordnødder og pistacienødder. Soyabønner, bønner, ris, hvede, rug og byg er modstandsdygtige over for aflatoksiner i marken, men lagres disse afgrøder under betingelser med høje fugtigheder og temperaturer, forekommer forureninger med aflatoksiner også her (Pittet, 1998).

Ochratoxin A

Vil blive uddybet i afsnit 2.1.3

Citrinin

En del arter producerer citrinin, men for cerealier er det primært *P. verrucosum*, *P. citrinum* og *A. terreus*. Citrinin er fundet i cerealier i Danmark, Sverige, Tyskland, Storbritannien, Canada, USA og Brasilien. I Brasilien er der rapporteret porcine nefropati (mugnefrose) forårsaget af kontamineret byg med *P. citrinum* (Frisvad, 1995). Mugnefrose uddarmer sig makroskopisk som 1½-2 gange forstørrede nyrer. I dyreforsøg er citrinin påvist som årsag til nyreskader, der minder om porcine nefropati (mugnefrose). Det menes, at der er synergieffekter med ochratoksin A og citrinin (Marquardt & Ronald, 1996).

Citrinin har vist sig at have både antibiotiske og fytotoksiske effekter (Størmer *et al.*, 1998).

Xanthomegnin og Viomellein

Xanthomegnin og Viomellein produceres af meget almindeligt forekommende penicillier i korn. De er fundet i kornprøver fra Danmark og Storbritannien. Undersøgelser viser, at de har hepato- og nephrotoksiske effekter (Frisvad, 1995).

Patulin

Patulin bliver primært produceret af *P. expansum*, der er vigtig ved kontaminering af frugt og grøntsager. Forekomsten af svampevækst og følgende produktion af patulin opstår typisk efter beskadigelse af frugter. Flere undersøgelser har fundet meget høje værdier af patulin i æblejuice. Overordnet var 50% af æblejuiceprøverne positive for indhold af patulin. Årsagen hertil var, at juicen blev lavet af gamle, halvrottede æbler. Dette har de seneste år ført til øget fokus på produktionsmetoderne og omgangen med æblerne. Forarbejdningsprocessen er specielt vigtig, idet patulin er varmestabil og stabilt under sure miljøer (Pittet, 1998). Patulin kan være mutagen. Data angående carcinogene effekter er stadig mangelfulde (Smith *et al.*, 1994).

Fumoniser

Fumoniserne er en ny gruppe af mykotoksiner, første gang isoleret i 1988. De produceres af en begrænset gruppe *Fusarium*-svampe. Specielt *F. moniliforme* og *F. proliferatum* er vigtige, idet de er udbredt i store dele af verden hovedsageligt i forbindelse med majsproduktionen. Områder med koldere klima som Canada og det nordøstlige Europa undgår problemerne. Fumoniserne har vist sig at være meget carcinogene og neurotoksiske i forsøg med dyr (Smith *et al.*, 1994), (Samson *et al.*, 2000).

Trichotecener

Fusarium-slægten er langt den vigtigste af de svampeslægter, som danner trichotecener. Omkring 24 arter af *Fusarium* med global udbredelse er producenter af trichotecener. Toksiciteten afhænger af hvilken kemisk konfiguration molekylet har. Trichotecenerne er en af de mest kemisk diverse af alle mykotoksinerne. De inddeles i to hovedgrupper, en makrocyklisk og en ikke-makrocyklisk gruppe, hvor den makrocykliske gruppe er langt den giftigste. Den ikke-cykliske gruppe indeholder nogle af de vigtigste mykotoksiner. Gruppen inddeles yderligere i type A- og type B-trichotecener. Typiske type A-trichotecener er T-2 toxin og diacetoxyscirpenol (DAS). Den mest almindelige trichotecen er Deoxynivalenol (DON), der tilhører type B-trichotecener. Hertil hører også nivalenol (NIV) (Smith *et al.*, 1994), (Samson *et al.*, 2000) (Tabel 2.1.2).

Tabel 2.1.2 Trichotecener, produceret af *Fusarium*-arter fra tempererede egne

Trichotecen	<i>Fusarium</i> -arter
Deoxynivalenol (DON)	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Nivalenol (NIV)	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i>
Diacetoxyscirpenol (DAS)	<i>F. equiseti</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. venenatum</i> , <i>F. sambucinum</i>
T-2 toxin	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>

(baseret på Hestbjerg, 1999; Elmholt & Kristensen, 2001)

Fusarium-arter er udbredte. Der er registreret naturlige forekomster af trichotecener i fødevarer og foder i Storbritannien, Canada, Danmark, Finland, Frankrig, Tyskland, Ungarn, Indien, Italien, Japan, Sydafrika, USA og Jugoslavien (Wilson & Abramson, 1992). Svampevæksten og produktionen af toksinerne kan ske ved lave temperaturer. Derfor findes trichotecenerne i områder med koldere klima. Produktionen af toksinerne sker allerede, mens kornet står på marken, men toksinerne er stabile og findes også på forarbejdede fødevarer.

De toksiske effekter af trichotecenerne er bl.a. en konsekvens af, at de kan passere cellemembranen og reagere med DNA, RNA og cellulære organeller. De er bl.a. toksiske ved at hæmme proteinsyntesen. Symptomerne af trichotecener er hudirritationer, blødninger, patologiske ændringer i de bloddannende organer og nedsat immunforsvar. Hvorvidt trichotecenerne er mutagene, er endnu ikke blevet konfirmeret (Smith *et al.*, 1994). DON er mindre giftigt, men udbredt. Det er karakteriseret ved toksiske effekter på fordøjelsessystemet og kendes som årsag til reduceret ædelyst og opkastning, heraf populærnavnet vomitoksin (Elmholt & Kristensen, 2001).

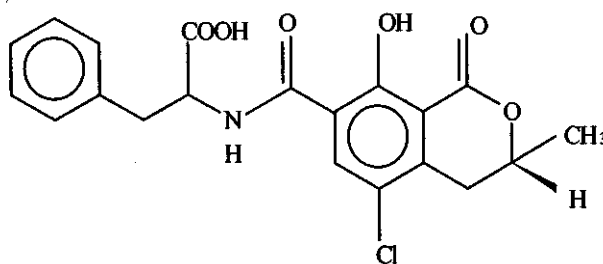
Zearalenon

Zearalenon produceres af en lille gruppe af *Fusarium*-arter. På grund af zearalenons lave, akutte toksicitet har man ment, at det ikke tilhører mykotoksinerne, men at en bedre placering er hos myko-østrogenerne. Et langtidsstudie viste dog begrænset evidens for carcinogenecitet hos dyr (Smith *et al.*, 1994). Zearalenon er registreret i alle verdensdele i hvede, byg, havre, rug, ris, majs m.m (Wilson & Abramson, 1992).

2.1.3 Ochratoksin A

Ochratoksin A (OTA) er et af de vigtigste mykotoksiner i dansk produceret korn (Jørgensen, 2000). OTA blev først isoleret fra *Aspergillus ochraceus* K. Wilh., og heraf kommer navnet ochratoksin A (Krogh, 1987).

Ochratoksin A, B og C er isocumarin-derivater bundet til L- β -phenylalanin, hvor OTA er langt det vigtigste og det eneste, jeg vil beskrive her. Ochratoksin A's empiriske formel er $C_{20}H_{18}O_6NCl$ (se fig. 2.1.1). Det klassificeres ud fra dets biosyntetiske oprindelse som en pentaketide i gruppen polyketider (Krogh, 1987).



Figur 2.1.1 Den kemiske struktur af ochratoksin A

Ochratoksin A er produceret af et relativt lille antal arter fra slægterne *Aspergillus*, *Petromyces*, *Neopetromyces* og *Penicillium* (Frisvad og Samson, 2000) (iflg. Larsen *et al.*, 2001). I korn er det kun produceret af *Penicillium verrucosum* Dierckx, *A. ochraceus* og *A. ostianus* (Elmholt & Kristensen, 2001).

OTA er detekteret i en række fødevarer og foderprodukter som cerealier, brød, øl, kød og osteprodukter (Larsen, 2001). Ochratoksin A er naturligt forekommende i cerealier som byg, rug, hvede, havre, ris og majs i specielt de tempererede klimatiske områder. Det er registreret i Norden, Storbritannien, Polen, Tyskland, Tjekkiet, og Canada (Frisvad, 1995). Kontaminering af cerealier i varmere klimatiske områder er ikke registreret. I stedet er OTA fundet i ris, kaffebønner,

krydderurter og rosiner som konsekvens af *Aspergillus* spp.-kontaminering (Heenan *et al.* 1998) (iflg. Walker, 1999). Eksempelvis har *A. niger* på vindruer og store OTA-kontaminationsværdier i rosiner og druer givet ophav til megen opmærksomhed de seneste år (Larsen *et al.*, 2001).

Lave koncentrationer af OTA er ikke ensbetydende med lave kontamineringsprocenter af svampe. OTA er dels varmemestabil og kan derfor forblive i fødevarerprodukter gennem forarbejdningsprocessen, dels kan svampene være gået til eller være udkonkurreret, således at kun toksinet kan detekteres (Pittet, 1998).

Modsat er høje koncentrationer heller ikke ensbetydende med høje kontamineringsprocenter, der foreligger undersøgelser, som viser, at innokulumpotentialet ikke giver en proportional udvikling af OTA, tværtimod var produktionen af OTA større ved lave end ved høje innokulumpotentiale (Chelack *et al.*, 1991) (iflg. Ominski *et al.*, 1994) (se uddybning i afsnit 2.4.2). Marquardt & Frohlich (1992) fandt heller ingen sammenhæng mellem den totale mængde svampemasse (målt i glucosaminkoncentration) og den producerede mængde OTA.

2.1.4 Hvorfor dannes mykotoksiner og hvad bruges de til?

Svampeinfektioner er en forudsætning for dannelsen af mykotoksiner, men forekomsten af svampe er ikke nødvendigvis ensbetydende med mykotoksinproduktion. Kun lidt vides dog om, hvorfor toksinerne produceres, og hvad der betinger dannelsen af dem (Elmholt & Kristensen, 2001).

En teori er, at dannelsen aktiveres ved en stresspåvirkning enten ved ændring af fysiske faktorer som temperatur, ilt, vandtilgængelighed, næringsstoffer, pH m.m eller ved biologiske forhold som tilstedeværelse af andre mikroorganismer. En anden teori går på, at dannelsen af mykotoksiner kan være en form for forsvars- eller konkurrencemekanisme. Janzen (1977) mener, at det er i en kamp mellem mikroorganismer og andre konsumenter, at svampe udskiller lugtende partikler og toksiner for at konkurrere om næringsstofferne. I vækstfasen kan en hæmning af konkurrerende organismer øge mulighederne for svampens egen udbredelse.

Studier af *P. verrucosum* sporer viser, at overfladen er fluorescent. Størmer *et al.* (1998) mener, at dette er citrinin, der er lokaliseret i sporevæggen. Citrinin kan have en funktion som beskyttelse mod UV-lys, da det har absorptions-maxima på 300-320 nm, hvilket svarer til bølgelængder, som ved havniveau er ansvarlige for solens mutagene evne.

Svampemetabolitter kan dannes enten ekstracellulært eller intracellulært. Intracellulære stoffer kan være affaldsstoffer, men også visse mykotoksiner. F.eks er viomellein og xanthomegnin intracellulært dannet (Filtenborg *et al.*, 1981) (iflg. Hestbjerg, 1993). OTA dannes ekstracellulært,

hvilket kan understøtte en antagonistisk virkning (Hestbjerg, 1993). *Penicillium verrucosum* danner dog toksinet både med og uden tilstedeværelsen af andre mikroorganismer.

Ifølge Frisvad (pers. medd. iflg. Hestbjerg, 1993) synes *Penicillium verrucosum* at øge OTA-dannelsen ved dyrkning på mere næringsrige substrater. Det har vist sig, at forekomsten af OTA ikke kun er et spørgsmål om dårlig lagring, men at der er en dynamisk, økologisk sammenhæng mellem de omkringliggende miljøbetingelser og produktionen af toksinet (Lillehoj & Elling, 1983). Mængden af OTA, der dannes, er afhængig af mange faktorer f.eks. vandaktivitet (a_w), temperatur, substrat, tilstedeværelse af konkurrerende mikroorganismer, svampe (isolatet) og kornets beskaffenhed (Marquardt & Frohlich, 1992) (se uddybende afsnit 2.4 om faktorer, der påvirker OTA produktionen).

2.1.5 Konsekvenser af OTA-optagelse

OTA er både nephrotoksisk, carcinogent, teratogent og immunotoksisk. Hvorvidt det er genotoksisk, er mere uklart (Walker, 1999).

På molekylært niveau går OTA ind og hæmmer phenylalanin-tRNA-ligase med det resultat, at proteinsyntesen og sekundært RNA- og DNA-syntesen hæmmes. OTA har også andre sekundære mekanismer såsom cytotoxicitet og induktion af oxidativ stress (Walker, 1999).

OTA er primært nephrotoksisk og har længe været et problem i svineindustrien, hvor hele slagtesvin kasseres på grund af porcin nefropathi (mugnefroser) (Smith *et al.*, 1994). Svin, som er monogastriske dyr, kan til forskel fra drøvtyggere ikke hydrolysere OTA. OTA kan ved hjælp af enzymer eller syre hydrolyseres til et forholdsvist uskadeligt α -ochratoksin (Wilson & Abramson, 1992). Hos køer, der er blevet udsat for store mængder OTA, kan det dog forekomme i mælken (Schwartz, 2002).

Undersøgelser med svin har vist, at ochratoksin er udskilt fra kroppen efter ca. en måneds fodring med ochratoksin-frit foder (Elling, 1979).

Schwartz (2002) fremkommer med en hypotese om, at ochratoksin A er årsag til det høje antal testikelkræfttilfælde i Danmark. I Europa ses en stor geografisk variation. Danmark er sammen med det tidligere Østtyskland det land, der har det højeste antal tilfælde af testikelkræft. Litauen og Finland har blot en tiendedel af Danmarks antal tilfælde.

Schwartz (2002) fremsætter en række kriterier for, at ochratoksin er det carcinogen, der er årsag til den højere forekomst: 1) Geografisk set skal OTA have større forekomst i Nordeuropa end i Central- og Sydeuropa, 2) det skal være specielt udbredt i Danmark og 3) på grund af et stigende antal tilfælde af patienter, skal udbredelsen af OTA også stige over tid. 4) Desuden ligger der i forudsætningerne for, at ochratoksin A skulle være årsag til testikelkræft, at det skal forårsage forringet sædkvalitet og 5) at der er korrelation med højere socioøkonomisk status.

Disse betingelser synes ifølge Schwartz (2002) at være opfyldt. Dels ligger Danmark i tempereret klimatisk område, hvor OTA-kontaminationen er høj, og undersøgelser af koncentrationen i blodet hos nordeuropæere viste, at danskere havde den højeste gennemsnitsværdi. Faktorer, som ville kunne forklare forskellen til de øvrige nordiske lande, er dels, at danskere er blandt dem, som har det største konsum af svinekød, dels at vi drikker meget kaffe, og endelig at vi har et stort forbrug af cerealier herunder rugbrød, som udgør den største risiko for OTA-kontamination i Danmark.

Schwartz (2002) henviser til overvågningsprogrammerne fra 1996 med store OTA-indhold i rug, specielt økologisk rug (se endvidere afsnit 2.8). Den tidsmæssige udvikling forklarer Schwartz (2002) med en ændring i kostvaner og en øgning af andelen af (specielt svine-) kød i kosten.

Hypotesen bygger desuden på en sammenhæng med socioøkonomisk status. Til grund for dette forhold ligger ifølge Schwartz (2002), at kvinder med højere social status enten har et større konsum af svinekød, eller at de ammer mere, og at de enten under graviditeten eller ved amningen overfører OTA til drengbørnene. Endelig henviser han til dyreforsøg, der viser en toksisk effekt af selv lave doser OTA på sædkvaliteten.

Schwartz (2002) bygger sine korrelationer på data om testikelkræft fra 1997, mens data angående konsum af svinekød og cerealier er fra 1980 og kaffekonsumeringsdata er fra perioden 1957-1965, men er anvendt ud fra en vurdering af, at kaffekonsumet fra 1950'erne til 1980 er relativt sammenlignelige.

Årsagen til tidsforskellen er, at det er blandt unge mænd, der ses en stigning i tilfælde af testikelkræft, og epidemiologiske data tyder på, at det er under graviditeten eller i de første leveår, årsagen til den carcinogene effekt skal findes.

Siden 1980'erne er der sket ændringer af kostvanerne. Mængden af rug i kosten er faldet og afløst af et større konsum af hvede. Danskerne indtager mere vin, mens forbruget af øl er faldet lidt.

Konsumet af svinekød er stagneret, men er stadig højt, ca. 65 kg pr. indbygger/år (Fagt & Trolle, 2001). Udviklingen er uheldig, hvis kontamineringen med OTA ikke er faldende i de pågældende fødevarer. Samtidig er forbruget af økologiske fødevarer steget. Schwartz (2002) kommenterer i en

note OTA-indholdet i økologisk korn, men knytter ikke forbruget til den socioøkonomiske status. De økologiske forbrugere er specielt yngre, veluddannede mennesker med en tendens til en overvægt af kvinder. Samtidig viser undersøgelser, at økologiske forbrugere spiser færre kødprodukter, drikker mindre øl og kaffe, men har et større konsum af cerealier og bælgfrugter (Jørgensen *et al.*, 2000).

En skandinavisk undersøgelse, der belyser sammenhængen mellem specifikke fødevarer og indholdet af OTA i blodet hos bloddonorer konkluderer dog, at der er ingen eller kun en meget svag korrelation mellem produkter med potentiale for OTA-kontaminering og resultaterne fra blodprøverne (Thuvander *et al.*, 2001). Undersøgelsen har dog ingen resultater fra danskere, og forbruget af rugbrød i de øvrige nordiske lande er minimalt. I undersøgelsen indgår mellembrodt brød (medium brown bread). Der er dog prøver fra forbrugere på Gotland. Tidligere undersøgelser fra Gotland viste et specielt højt indhold af OTA i blodplasma (Breitholtz *et al.*, 1991).

Lignende undersøgelser af tyske bloddonorer, der har tradition for konsum af rugbrød, kød og øl, konkluderer, at OTA-niveauet i blodserum ikke er forårsaget af specifikke fødevarer (Gareis *et al.*, 2000).

Hypotesen hos Schwartz (2002) om årsagssammenhæng mellem testikelkræft og specifikke fødevarer er derfor ikke underbygget i de øvrige undersøgelser.

Der er dog ingen tvivl om, at flere mykotoksiner er årsag til kroniske eller letale sygdomme, der opstår som følge af en langtidspåvirkning af et lavt infektionsniveau (Pittet, 1998). Derfor er det afgørende at få uddybet kendskabet til ochratoksin, registrere omfanget og iværksætte forebyggende foranstaltninger.

2.1.6 Regulativer for OTA

På baggrund af risikovurderinger anbefalede EU's "Scientific Committee on Food" en "tolerable daily intake" (TDI-værdi) så lav som mulig og ikke højere end 5 ng/kg legemsvægt/dag. Det svarer til den værdi, som en nordisk toksikologigruppe kom frem til i 1991. Denne værdi er siden blevet anvendt i Danmark (Smith *et al.*, 1994; Jørgensen, 2000).

"Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants" (JECFA) anbefaler på baggrund af deres evaluering i 1995 en "provisional maximum tolerable weekly intake" (PTWI) på 0,1 µg/kg legemsvægt (Boutrif, 1995). Det vil sige, at deres anbefalede værdi er ca. tre gange højere end EU's niveau ($0,1 \cdot 10^{-6} \text{g} = 0,0000001 \text{g}$ mens $5 \text{ng} = 5 \cdot 10^{-9} \text{g} = 0,000000005 \text{g} \rightarrow \text{weekly} (x 7)$ svarer til $0,000000035 \text{g}$ dvs. en tredjedel af JECFA). JECFA's PTWI-evaluering er baseret på en

nuleffekt ("no-observed-effect-level") i toksikologiske studier plus en sikkerhedsmargin, der betyder, at de divideres med 100. Den første faktor 10 skyldes, at det er ekstrapoleringer fra dyr, den anden tager højde for variation mellem individer. Denne tilgang kan dog ikke anvendes for toksiner, der har carcinogene effekter, skriver Boutrif & Canet (1998). I stedet anvendes der ved f.eks. aflatoxiner en værdi "så lav, som der rimeligvis kan opnås" (*as low as reasonably achievable*). JECFA har ikke tilføjet ochratoksin A i denne kategori trods det, at det er internationalt anerkendt, at det er carcinogent (Pitt *et al.*, 2000).

Et EU-regulativ har i april 2002 (EU 2002) sat grænseværdien for OTA til 3 µg/kg i korn og kornprodukter til humant konsum (se tabel 2.1.3). I Danmark blev der på baggrund af resultater fra de første overvågningsprogrammer i 1995 indført en maksimalgrænseværdi på 5 µg/kg for indholdet af ochratoksin A i korn og kornprodukter til humant konsum (Jørgensen, 2000). For slagtesvin har Danmark som det første land i verden siden 1978 foretaget kontrol for ochratoksin A (Elling, 1979). Alle slagtesvin kontrolleres for porcine nefropathi (mugnefrose). Hvis porcine nefropathi forekommer, analyseres nyrene. Ved indhold på mere end 25 µg OTA/kg kasseres hele slagtekroppen, mens kun organerne kasseres ved indhold på 10-25 µg OTA/kg (Smith *et al.*, 1994). Antallet af forekomster af mugnefrose er faldet i perioden fra 1983-1997 med 2190 total-kassationer i 1983 til 0 total-kassationer i 1997. Dette har fundet sted på trods af, at man i 1997 slagtede 20 mio. svin, svarende til 5 mio. flere end i 1983. På baggrund heraf overvejer man i fødevarerectoratet, om overvågningerne skal fortsætte i deres nuværende form (Smith *et al.*, 1994).

Der er dog lidt forskellige grænseværdier for OTA i fødevarer i og udenfor europæiske lande. Schweiz er et af de lande, som har lavest OTA-maksimumgrænseværdi på 2 µg/kg i cerealieprodukter. Holland har en grænseværdi på 0 µg/kg for alle mykotoksiner i cerealie- og bælgplanteprodukter. Hvordan dette overholdes i praksis, beskriver Boutrif & Cant (1998) ikke.

Tabel 2.1.3. EU-regulativ for mykotoksingrænseværdier

Mykotoksin	Produkt	Anvendelse	Grænseværdi (µg/kg)
Aflatoksin B ₁ *	Cerealier inkl. ris og cerealieprodukter	Humant konsum og	2
Aflatoksin total		som ingrediens i foder	4
Ochratoksin A **	Korn og cerealieprodukter	Humant konsum	3
Deoxynivalenol (DON)***	Cerealier og cerealieprodukter i detailhandelen	Til konsum	500

*Sat i værk jan. 1999, ** Sat i værk april 2002, ***Endnu kun et udkast ("a draft") (baseret på EU, 2002).

2.1.7 Mark- og lagersvampe

Svampeinfektion og -udvikling samt toksinproduktion kan forekomme i marken, under lagringen eller begge steder. Svampe fra *Alternaria*-, *Fusarium*- og *Cladosporium*-slægter trives bedst ved høje relative fugtigheder, hvorfor de ikke er konkurrencedygtige under lagerforhold. Her dominerer i stedet lagersvampe bl.a. arter af *Aspergillus* og *Penicillium*. Der sker derfor en succession fra mark til lagring. Marksvampe, som er tilstede ved høst og i starten af lagringsperioden, udkonkurreres af lagersvampe i løbet af lagringsperioden. Derfor varierer artsdiversiteten og toksinindholdet afhængigt af udviklingen i lager-økosystemet (Ominski *et al.*, 1994).

Denne klassificering i mark- og lagersvampe bygger på et koncept af Christensen (1957) (iflg. Wilson & Abramson, 1992). Klassificeringen er dog relateret til kontamineret korn i tempererede klimaer. I våde subtropiske og tropiske områder vil f.eks. *A. flavus*, som Christensen (1957) beskriver som en lagersvamp, være en marksvamp. Under ekstremt varme og tørre år i tempererede områder kan *A. flavus* ligeledes være at finde i markfungien. Der er ligeledes sammenfald inden for *Penicillium*-slægten, hvor f.eks. *P. verrucosum* er registreret både i mark- og lagerhabitater (Wilson & Abramson, 1992).

Hesseltine (1976) (iflg. Wilson & Abramson, 1992) inddeler mykotoksindannende svampe efter habitat. Hermed fremkommer han med tre grupperinger: svampe voksende på levende planter, svampe voksende i lagret plantemateriale og svampe voksende i plantemateriale under nedbrydning ('decaying'). Igen er der sammenfald med bl.a. *A. flavus*, der forekommer i to af grupperne. Desuden vil der utvivlsomt være forskel på f.eks. mikrofungi i lagret plantemateriale fra henholdsvis tempererede og tropiske egne (Wilson & Abramson, 1992).

Endelig har Hill (1979) (iflg. Wilson & Abramson, 1992) lavet en mere minutiøs klassificering i syv undergrupper, hvor han tager i betragtning, at mikroorganismene er påvirket af en kombination af temperatur, vandaktivitet og gennemluftning. Klassificeringen er dog foretaget på baggrund af studier i byg, hvilket gør den svær at anvende i en bredere sammenhæng. Desuden er der igen sammenfald mellem grupperne, hvorfor der ikke blev foreslået nogen skarp adskillelse mellem grupperne.

I mit projekt, hvor jeg analyserer på korn i Danmark, er jeg gået ud fra Christensens mark- og lagersvampe-begreber. I vort tempererede klima passer klassificeringen stor set ind. Desuden er den let applicerbar og anvendt i litteraturen.

I Danmark er de vigtigste svampeslægter, som danner toksiner, *Penicillium* og *Fusarium* (Elmholt & Kristensen, 2001).

I temperede klimatiske områder er det ifølge Frisvad (1995) *Fusarium culmorum* og *F. graminearum*, *Penicillium verrucosum*, *P. freii* og *P. cyclopium*, der er de vigtigste toksigene lagersvampe.

I det følgende vil jeg indskrænke opgaven til primært at omhandle *Penicillium verrucosum* og dens produktion af ochratoksin A.

2.2 Metoder til identifikation og detektion

Godt management og teknologisk udvikling inden for landbruget vil kunne mindske problemerne med vækst af *P. verrucosum* og dannelse af ochratoksin A, men herudover er det vigtigt at have effektive metoder til at udføre et komplet registrerende og forebyggende arbejde.

Historisk set er de oprindelige metoder til identifikation og detektion baseret på medier, der har været brugt i medicinforskningen.

Det vil sige substrater, der er tilpasset bakterier og patogene svampe, der trives med høje vandpotentialer, høje temperaturer og et lavt niveau af CO₂. Disse er forskellige fra de foder- og fødevarerbårne svampe, der trives med lave vandpotentialer og lave temperaturer. Derfor har det været nødvendigt at udvikle medier og metoder, der er tilpasset disse svampetyper. Siden 1984 er der blevet afholdt internationale forskermøder for at opnå optimale detektions- og isolationsmetoder og for at blive enige om standardiserede metoder (Samson *et al.*, 2000).

I det følgende vil jeg beskrive de mest gængse samt nyere metoder anvendt ved detektion og identificering af *P. verrucosum*. Jeg vil specielt lægge vægt på de metoder, der er anvendt i forbindelse med mit specialeprojekt. Desuden vil jeg beskrive metoderne vandbestemmelse og overfladesterilisering, som ikke har med identificering af *P. verrucosum* at gøre, men som har været anvendt i delprojekterne.

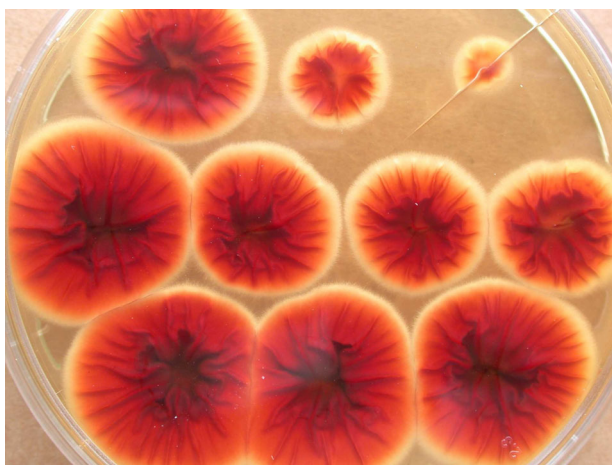
2.2.1 Direkte eksamination

Ved hjælp af stereolup eller transmissionsmikroskop og ved det blotte øje er det muligt ud fra bl.a. svampekoloniens farve, vækst, morfologi og substrat samt et bestemmelsesværk at identificere svampene.

2.2.2 Direkte udlægning på DYSG-agar

Ved mykologiske studier af hårde fødevarer f.eks. korn og nødder, mener Olsson (2000), at direkte pladespredning er den mest effektive metode til identifikation. For korn og nødder anbefales det dog, at prøverne bliver overfladesteriliseret for at få det egentlige infektionsniveau (Olsson, 2000; Samson *et al.*, 2000). Undtaget er korn, hvor hele kernen skal anvendes i produktionen, og hvor overfladekontaminanterne følger med i flere led. Her bør undersøgelserne foretages både med og uden overfladesterilisering (se afsnit 2.2.10).

Til detektion og isolation af *P. verrucosum* i jordprøver og fødevarerprøver har det vist sig, at Dichloran Yeast Extract Sucrose Agar (DYSG) er et effektivt substrat (Frisvad, 1983; Elmholt & Hestbjerg, 1996; Elmholt *et al.*, 1999; Samson *et al.*, 2000). DYSG er udviklet til detektion af *P. verrucosum* og blev introduceret af Frisvad *et al.* (1992). Det er en indikativ og selektiv agar, hvor også sekundære metabolitter produceres til identifikation (Frisvad *et al.*, 1992; Elmholt *et al.*, 1999). Den er indikativ, idet *P. verrucosum* danner en karakteristisk terrakotta-rød reversfarve (billede 2.2.1).



Billede 2.2.1 *P. verrucosum* på DYSG

Efter rose bengal er erstattet med 18% glycerol i DYSG, har DYSG fået bedre indikative egenskaber end Dichloran Rose bengal Yeast Extract Sucrose Glycerol agar (DRYES), skriver Elmholt (1996) i et kvalitativt studie af *P. verrucosum* på fire forskellige substrater (V8, YES, DRYES og DYSG). DYSG fremmer desuden produktionen af sekundære metabolitter bedre end DRYES (Frisvad *et al.*, 1992). DYSG er selektiv, idet vandpotentialet er lavt. Derved hæmmes svampe, der ikke er xerotolerante.

Screening af kerner for kontaminering af *P. verrucosum* foregår ved, at der bliver udtaget en repræsentativ delprøve fra hver kornprøve. Heraf udlægges en given mængde kerner på petriskåle med DYSG. Kernerne lægges ud efter en skabelon med 10 kerner pr. skål. Hertil benyttes en pincet, som steriliseres for hver ny skål. Ved udlægningen skønnes det, at der er et repræsentativt udsnit af små og store kerner. Der lægges ikke knækkede kerner ud, og det er tilfældigt, hvilken side af kernen der vender mod agaren. Skålene inkuberes i stakke med 10 stk. i en perforeret inkuberingsplastpose (Aps Soldane 170 x 300 M.P.). Petriskålene inkuberes retvendt i 7 dage ved 25 °C i mørke. Ud fra *P. verrucosums* karakteristiske rødfarvning af DYSG's reverse side bliver antallet af kontaminede kerner opgjort. Kontamineringsprocenten pr. prøve beregnes herudfra.

2.2.3 Pladespredning

Pladespredning er en udbredt metode for undersøgelse af fødevarer og foder (Samson *et al*, 2000). Det er en metode, der har været anvendt tilbage til 1920'erne. Metoden giver information om svampesporeindholdet i en given mængde jord, korn eller et andet emne (Parkinson, 1994).

"Forskrift for isolering af mikrosvampe ved pladespredning", Statens Planteavlsvforsøg (1993) er anvendt ved udførelse af metoden. I forskriften bruges jord, mens der i specialeprojektet analyseres for svampe i henholdsvis hessian og korn.

Forud for selve pladespredningen produceres en pilotpladespredning, idet denne indikerer fortyndingsniveauet. Valget af substrat er vigtigt, idet der findes flere selektive substrater for specifikke svampe. Ved pladespredning med potentiale for *P. verrucosum* anvendte jeg både DYSG og V8 for at få dels et resultat for mængden af *P. verrucosum* og dels et indtryk af artsdiversiteten. Kort beskrevet går metoden ud på, at der laves en suspension af en given mængde eksempelvis korn. Suspensionen homogeniseres, og der udtages 1 ml til et præparatglas med 9 ml steril fortyndingsmedium (opløsning med pepton og NaCl). Fortyndingen (10^{-1}) blandes vha. Whirlimixer. Herfra overføres 1 ml til det næste præparatglas med 9 ml fortyndingsmedium (fortynding 10^{-2}) og så fremdeles. Proceduren gentages, indtil den ønskede decimalfortyndingsrække opnås. Af hver fortynding fremstilles et vist antal petriskåle (gentagelser) ved at overføre 0,1 ml (eller andet volumen) til petriskålen. Ved brug af en steriliseret drigalskyspatel udplades fortyndingen. Petriskålene inkuberes ved den valgte temperatur og de valgte lysforhold, afhængigt af hvilken agar der er anvendt. Efter inkuberingen optælles antallet af kolonier (cfu).

Størstedelen af cfu stammer fra konidier eller andre sporer og ikke fra hyfefragmenter (Warcup, 1957). Metoden giver derfor ikke noget estimat for svampebiomasse, idet cfu-resultaterne mere er et udtryk for, hvorvidt svampen har sporuleret end for egentlig biomasseproduktion (Schnürer (1993) (iflg. Olsson, 2000).

Elmholt *et al.* (1999) studerede *P. verrucosum* ved pladespredning af jord på DYSG. Forfatterne fandt bl.a., at metoden viser et godt estimat for antal konidier i jordsuspensionen ved forskellige fortyndinger, hvis den rette statistiske metode anvendes.

I princippet kan gennemsnitsantallet af cfu pr. petriskål forventes at være proportionalt stigende med mængden af jord tilført (eller faldende fortyndingsgrad). Grafisk set danner sammenhængen en ret linje, der går gennem origo (0,0), hvor det forventede antal cfu (Y) er en funktion af mængden af jord (X) eller $Y = \lambda X$, hvor λ er et estimat for antal cfu pr. gram jord (Elmholt *et al.*, 1999).

Analysen af pladespredningen korresponderer dog ikke altid med den forventede udvikling. Den grafiske fremstilling af de observerede antal cfu korresponderer ikke altid med en ret linje gennem origo. I stedet flader kurven for observeret antal som funktion af mængden af jord ud. Denne udfladning sker pga. forskellige konkurrenceforhold f.eks. substratkaraktistika, svampeantagonisme eller overvoksning af svampekolonier. Elmholt *et al.* (1999) viste både, at konkurrence fra *P. verrucosum* påvirker antallet af andre skimmelsvampe, og at stærk konkurrence fra andre skimmelsvampe kan påvirke estimatet af antal *P. verrucosum*. Desuden viste substratsammenligninger af DYSG og V8, at DYSG reducerer antallet af cfu fra øvrige skimmelsvampe til 30% af antallet observeret på V8 pga. lavere vandaktivitet (Elmholt og Hestbjerg, 1996).

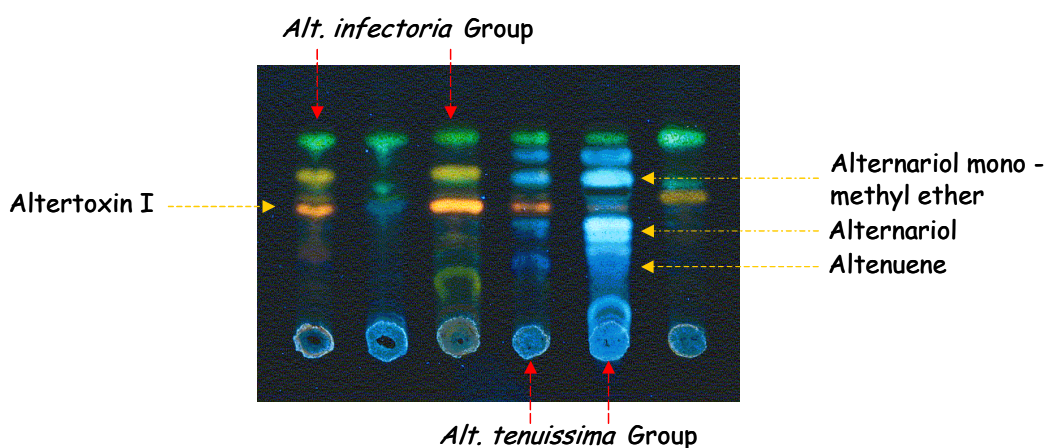
Ved vurdering af resultaterne fra forskellige fortyndinger er det vigtigt at være opmærksom på afvigelser fra proportionalitetskurven, idet resultater fra enten høje eller lave fortyndinger kan være misvisende for det egentlige indhold af cfu pr. gram jord. Optimalt set ønskes der resultater, der korresponderer med proportionalitetskurven, hvorved der fås et konstant antal cfu pr. gram jord uanset fortyndingsniveau. Ved statistiske metoder kan der dog korrigeres for denne afvigelse fra proportionalitetskurven (Elmholt *et al.*, 1999).

Med hensyn til metodens sensitivitet konkluderer Elmholt *et al.* (1999), at det er muligt at detektere *P. verrucosum* ved meget lave konidiekoncentrationer (200 cfu/g jord), selv når *P. verrucosum* kun udgør 0,3 % af cfu.

Metoden blev anvendt et par gange, primært fordi jeg skulle introduceres til den og lære nogle af kornets øvrige svampe at kende.

2.2.4 Tyndtlagskromatografi (Thin-layer chromatography, TLC)

TLC er en enkel screeningsmetode til detektion af sekundære metabolitter. Metoden har i mange år været anvendt i kemotaksonomiske studier. Kort beskrevet går den ud på først at reddykke den ønskede svamp. Til opformering af *P. verrucosum* og detektion af ochratoksin anvendes et meget næringsrigt substrat (YES) i overensstemmelse med Frisvad og Filtenborg (1989), der finder, at *P. verrucosum* producerer OTA i næringsrige substrater. Dernæst overføres svampesporerne v.h.a. en agarprop på en silica-gelplade. Pladen eluerer i en toluen-, acetone- eller methanolopløsning. Efter elueringen tørrer pladen og studeres i UV-lys. Udtrækkene sammenlignes med en standard for ochratoksin, citrinin m.m., som er påført parallelt med svampesporepropperne (Samson *et al.*, 2000). Metoden blev anvendt en enkelt gang som introduktion. (billede 2.1.2)



Billede 2.1.2 TLC på *Alternaria*

2.2.5 Højtryksvæskekromatografi (High performance liquid chromatography, HPLC)

HPLC er en mere kvantitativ metode til kemisk bestemmelse af sekundære metabolitter end TLC. Ekstrakter (5-25 μ l) af svampekulturer pumpes med højt tryk igennem meget tynde kolonner med modificeret kiselgel. For enden af kolonnen kan der monteres forskellige typer af detektorer. Diode Array-detektorer måler stoffernes evne til at absorbere UV-lys. Mange sekundære metabolitter har karakteristiske UV-spektra. Sekundære metabolitter kan derfor påvises, efterhånden som de kommer ud gennem kolonnen. Ved sammenligning med standarder kan metabolitterne identificeres (Frisvad *et al.*, 1989, 1998; Samson *et al.*, 2000; Jørgensen & Jacobsen, 2002).

Peter Have Rasmussen, Fødevaredirektoratet, anvendte HPLC (Jørgensen, 1997) ved analyse af prøverne i delprojekt I.

2.2.6 Molekylær bestemmelse (PCR, RAPD og AFLP)

PCR (Polimerase Chain Reaction), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) og AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) er eksempler på nyere molekulære metoder til bestemmelse og klassificering af svampe. Ved hjælp af metoderne laver man et såkaldt ”genetisk fingeraftryk”. Herved kan man analysere for bestemte genetiske egenskaber eller sammenligne aftrykkene og studere slægtskabet (<http://www.biotekinfo.dk/molmark.html>; Pedersen *et al.*, 1997; Samson *et al.*, 2000). Metoderne er ikke anvendt i mit projekt.

2.2.7 Bestemmelse af Ergosterol

Svampebiomasse kan bestemmes kemisk ved en ekstraktion af ergosterol eller chitin. Svampecellevæggen består primært af polysaccharider herunder chitin og glucan. Men chitin findes ud over i svampe også i andre organismer bl.a insekter, nematoder og protozoer (Gooday, 1990) (iflg. Olsson, 2000). Ergosterol er et lipid, der er specifikt for svampe, og kan derfor anvendes som svampebiomarkør. Ved kvantificering af ergosterol v.h.a. HPLC-metoden fremkommer et udtryk for indholdet af svampebiomasse i en given prøve. Resultatet viser dog ikke nogen artsspecifikation eller indikation for, om det er mark- eller lagersvampe. Desuden er der ingen sammenhæng med produktionen af mykotoksiner (Olsson, 2000). Schnürer & Jonsson (1992) fandt en positiv korrelation mellem antal svampekolonier (cfu) og ergosterolniveau, dog ikke ved bestemmelse af ergosterolindholdet i frosne prøver, hvor cfu-antallet var blevet optalt tidligere. På baggrund af egne og andre europæiske undersøgelser foreslår Schnürer & Jonsson (1992) en kvalitetskategorisering af korn baseret på ergosterolindhold (< 3µg ergosterol/g dry-weight svarer til fødevarekvalitet). Metoden er ikke anvendt i mit projekt.

2.2.8 Flygtige metabolitter –elektronisk næse

Faktorer, der fremmer svampevækst, befordrer også produktionen af flygtige metabolitter. På denne måde er lugten i et kornlager en meget vigtig indikator på kornets forfatning. Desuden er der fundet korrelation mellem mykotoksindannelsen og produktionen af specielle, flygtige komponenter (Olsson, 2000). Pasanen *et al.*(1996) (iflg. Olsson, 2000) fandt ved at sammenligne en toksigen og en ikke-toksigen variant af *P. verrucosum*, at sammensætningen af de producerede, volatile produkter var forskellig. Schnürer & Jonsson (1992) fandt dog ingen sammenhæng mellem kornlugt og ergosterolindhold. De problematiserer anvendelsen af flygtige svampemetabolitter, idet ikke alle

svampe har en markant lugt. F.eks har *P. verrucosum* en kraftig lugt, mens *A. flavus* ikke producerer nogen registrerbar lugt.

Lugten af kornet er en vigtig parameter i vurderingen af korn. Også i dag er det et af de primære kriterier for konsulenterne i vurderingen af kornets kvalitet (Rasmussen, DLG, centrallab.). For at opnå en mere objektiv og arbejdsmiljøvenlig metode er der behov for en alternativ metode. Dette har ført til udviklingen af en elektronisk næse. Ved hjælp af gassensorer, som er kemiske sensorer, oversættes det kemiske indhold af duftene til elektroniske signaler, der sammenlignes med kendte kompositioner (Olsson, 2000).

2.2.9 Bestemmelse af vandindhold

Vandindholdet i korn svarer til det tab i masse udtrykt i procent, som sker ved følgende bestemmelsesprocedure.

Til vandbestemmelsesanalysen anvendte jeg den internationale standard for korn og kornprodukter, ISO 712:1998(E) *Cereals and cereal products- Determination of moisture content- routine reference method*, med få modificeringer. Vi gik ud fra, at vore prøver lå i et interval mellem 7 og 17% vandindhold, og vi anvendte en 0,5 mm sigte, som var den, der ved test med forskellige sigtestørrelser kom nærmest partikelstørrelsesfordelingen i standardmetoden.

En repræsentativ kornprøve på ca. 5-6 g afvejedes i en varmestabil beholder med låg. Ved brug af en centrifugal mølle maledes kornet med 0,5 mm hulstørrelse. Prøven blev hældt tilbage i beholderen, og der blev lagt låg på. For hver prøve blev der foretaget tre gentagelser. Før hver maling rensedes møllen. Den kværnede prøve incl. beholder (m_0) tarreredes i et nyt bæger uden låg med 0,001g's nøjagtighed. Herefter blev prøverne sat til tørring ved 130°C i 120 min. målt fra det tidspunkt, hvor temperaturen igen var på 130°C. Prøverne blev taget ud og afkølet i exsikkator i 45 min. Herefter afvejedes de igen incl. beholder, (m_1). Vandindholdet som procent af massen (vådvægt) er da W;

$$W = (1 - m_1/m_0) 100\%$$

Proceduren blev indkørt og sammenholdt med prøver fra Bygholm (Kristensen, videnskabelig assistent).

Prøver i delforsøg II, der ikke umiddelbart analyseredes, blev frosset ned til -18°C i poser, hvor luften var blevet klemt ud. Før analyse blev prøverne gradvist tøet op (efter råd fra Thode, S., kemiker, Foulum). Proceduren blev testet i et pilotforsøg med meget acceptabel reproducerbarhed.

2.2.10 Overfladesterilisering

Overfladesteriliseringsproceduren tager udgangspunkt i Boley og Müller, 1986, Samson *et al.*, 1992, Axberg *et al.*, 1997 og pers. komm. fra Birgitte Andersen (forskningsassistent, DTU). Proceduren afprøvedes i et pilotforsøg, og ud fra de herved opnåede erfaringer blev den endelige procedure udarbejdet. Samson *et al.*, 1992, anbefaler en immersion i hypoklorit-opløsning på 0,4 % i 2 min., herefter evt. en gennemskylning med destilleret vand, men gennemskylning er ikke essentielt, og endelig udføres direkte udlægning på agarplade. Denne metode var dog uhensigtsmæssig, idet kernerne var våde, når de blev lagt på agaren. Herved mindede resultatet mere om en pladespredning. Axberg (1997) anvender en 2 % hypoklorit-opløsning (høj koncentration sammenlignet med de øvrige) i 10 min., herefter skylles med steriliseret, destilleret vand 3 gange, og siden lægges kernerne til tørre i en ovn med luftcirkulering ved 37 °C i 24-48 timer til vandindholdet er på 18%.

Den endelige procedure blev en sterilisering med 0,4 % hypoklorit med omrystning i 10 min. med 5 gange volumen af kornprøven. Herefter foretog jeg 3 gange skylninger med omrystning i 10 min. med autoklaveret postevand svarende til den oprindeligt tilsatte væskemængde. Herefter fordeltes kernerne på petriskåle og blev tørret i ovnen i stinkskab i 24 timer ved 37 °C. Vi fik en fornemmelse af, at steriliseringen eliminerede *P.verrucosum*, idet kerner med høj kontamineringsprocent havde en bemærkelsesværdig lav infektionsgrad. Vores forbehold over for overfladesterilisering blev bekræftet af andre erfaringer med, at *P.verrucosum* er følsom over for overfladesterilisering. (pers. komm. Frisvad & Lund, DTU iflg. Elmholt).

2.3 *Penicillium verrucosum*

2.3.1 Morfologi, taksonomi og toksiner

Klassificering af svampe var indtil begyndelsen af 1970'erne primært baseret på arternes morfologi. Slægten *Penicillium* er klassificeret ud fra sin anamorfe, dvs. den struktur, der varetager svampens ukønnede forering. Hos langt de fleste af *Penicillium*-arterne kendes ingen teleomorfe (struktur der varetager den kønnede forering). Teleomorfen kan enten være bortreduceret eller ukendt. *Penicillium*-arterne er derfor systematisk placeret i *Deuteromycotina* eller "fungi imperfecti" (Petersen, 1995). Enkelte af *Penicillium*-arterne er anamorfe stadier af *Eupenicillium* eller *Talaromyces* (sæksvampslægten kuglesæk).

*Penicillium*s konidier er sporer dannet ved mitotisk deling (ukønnet formering) fra specialiserede hyfer, phialider, hvorfra de hurtigt afkastes. Phialiderne er yderste del af konidioforen, hvis forgrenede del betegnes penicillus (penslen), hvoraf navnet *Penicillium* eller penselskimmel kommer. *Penicillium* er inddelt i fire underslægter på baggrund af penslernes morfologi:

<i>Penicillium</i> subgenus <i>Aspergilloides</i> :	Monoverticilliate arter, dvs. med et forgreningspunkt. Konidioforen består af en stilk med terminale phialider. Enkelte arter producerer pensler med metulae (to forgreningspunkter).
<i>Penicillium</i> subgenus <i>Biverticillium</i> :	Som navnet hentyder har biverticilliate to forgreningspunkter. Konidioforen består af en stilk, metulae og phialider.
<i>Penicillium</i> subgenus <i>Furcatum</i> :	Biverticilliate som <i>Bivertillium</i> men med længere metulae end phialiderne. Enkelte arter kan producere pensler med rami (tre forgreningspunkter).
<i>Penicillium</i> subgenus <i>Penicillium</i> :	Terverticillate dvs. med tre forgreningspunkter. Konidioforen består af stilk, metulae, rami og phialider. Konidioforen er normalt asymmetrisk. Pensler kan være med ramuli (fire forgreningspunkter).

Figur 2.3.1 Klassificering af penicillierne (iflg. Hestbjerg, 1993)

Penicillium verrucosum tilhører underslægten *Penicillium* med tre forgreningspunkter i penslen, de terverticillate peniciller (se fig.2.3.1).

Den taksonomiske historie for ochratoksinproducerende *Penicillium*, specifikt *Penicillium verrucosum*, starter med Ciegler *et al.* (1973), der deler *P. viridicatum* i tre undergrupper efter mykometabolitterne, vækstrate, farve m.m. Senere studerer Frisvad og Filtenborg (1983, 1989) samt Pitt (1987) igen kemotyperne af *P. viridicatum*, og de bliver enige om, at kemotype I og II er de eneste ochratoksinproducerende arter i slægten *Penicillium*. De bibeholder underinddelingen med to kemotyper, hvor kemotype II er den eneste, der producerer citrinin. Endelig foreslår Larsen *et al.* (2001) på baggrund af en biokemisk analyse og en clusteranalyse af 48 *P. verrucosum*-isolater at skelne mellem *P. verrucosum* og *P. nordicum*, hhv. kemotype II og I, på grund af en klar biosyntetisk og økologisk forskel mellem svampegrupperne. Bl.a. er der en forskel i profilen for den sekundære metabolitproduktion, reversfarven og forekomsten på hhv. svinekød (I) og plantemateriale (II).

Indledende RAPD-analyser tyder ligeledes på, at der er to genetisk forskellige grupper af *Penicillium*, der er i stand til at producere OTA (http://www.mycotoxin-prevention.com/progress_detoxfungi.htm).

Penicillium verrucosum er yderligere karakteriseret ved at producere verrucinin og verrucolon. Makroskopisk set producerer *Penicillium verrucosum* grønne konidier med en fløjlsagtig ("velvety") til svagt granulær overflade med klare, små, udsivende dråber på Czapek-agar. Som nævnt under metodebeskrivelsen danner den en karakteristisk terrakotta-rød revers på DYSG (Samson *et al.*, 2000).

2.3.2 Vækst

Det karakteristiske vækstmønster for penicillier, der invaderer afgrøder, er dannelse af tætte kolonier i små, afgrænsede substrater. De spreder sig ikke energisk med mycelier til det omkringliggende substrat, men vokser langsomt og spredes ved en stor produktion af sporer. Dette er en strategi, der gør, at penicillierne udnytter alle ressourcerne i substratet, inden de bevæger sig videre til næste næringsmedie (Wicklow, 1995). Dette stemmer overens med en undersøgelse, hvor der analyseres for OTA på kerneniveau (Shotwell *et al.*, 1975). Her viste resultaterne, at der var kerner, som havde ligget op ad hinanden, men som havde henholdsvis et meget højt indhold af OTA og slet ingen spor af OTA. Denne spredningsstrategi gør det ekstra vanskeligt at udtage en repræsentativ prøve, men desto vigtigere er det at være opmærksom på den store variation, et kornparti kan indeholde, og metoden, hvormed udtagningen foregår. Pitt (1979) (iflg. Wicklow, 1995) mener, at gruppen af terverticillate penicillia (som *P. verrucosum* tilhører) er en avanceret gruppe af svampe, der er tilpasset vækst i cerealier, madvarer og andre produkter med lav vandaktivitet, og at de producerer et højt antal konidier pr. konidiofor. Ifølge Samson *et al.* (2000) vokser *P. verrucosum* begrænset. Den opnår en størrelse på ca. 1 cm i diameter inden for 7 dage på Czapek-agar ved 25°C. Optimum for væksten ligger ved 20°C og med potentiale for vækst mellem 0°C og 31°C. Den er xerofil og i stand til at gro ved et vandaktivitetsniveau a_w ned til omkring 0,80. (se definition af a_w i afsnit 2.4.1) Væksten kan foregå over et pH-interval mellem 2,1 og 10,0 og med optimum mellem pH på 6,0 og 7,0 (Northolt, 1979; Pitt & Hocking, 1997).

Svampemyceliers (herunder *P. verrucosums*) måde at vokse på i korn gør, at de kan trænge igennem selv meget kompakte substrater. De vokser apikalt, det vil sige ved, at kun hyfespidsen udvides. Ved udskillelse af enzymer og derved nedbrydning af substrater til bl.a. stivelse og proteiner baner svampen sig vej og danner samtidig næringsstoffer til sin egen metabolisme.

Næringsstoffer som mono- og disaccharider optages tæt ved apex (hyfespidsen). Efterhånden som hyfespidsen vokser, forstærkes hyfevæggen. Det er blot den yderste mm. af spidsen, der er meget plastisk. Vækststrategien gør svampene mere mobile end f.eks. encellede bakterier og gær. En yderligere fordel har svampene, idet de evner at translokere metabolismeprodukter, cytoplasma og vand fra ældre dele af myceliet til nyere dele (Olsson, 2000).

2.3.3 Udbredelse

Penicillium verrucosum er udbredt i tempererede områder (Larsen *et al.*, 2001), bl.a. er der registreringer fra Canada (Mills *et al.*, 1995), (Abramson, 1998), Storbritannien (Scudamore & Wilkin, 1999), Tyskland, Sverige (Breitholtz *et al.*, 1991) og Danmark (Elmholt, 2003; egne resultater). Da det som tidligere nævnt nu er anerkendt blandt taksonomer, at *P. verrucosum* er den eneste svamp, der producerer ochratoksin i cerealier, er udbredelsen af *P. verrucosum* relateret til de lande med ochratoksin-produktioner, som ikke kan henføres til *Aspergillus*-kontaminationer (Frisvad, 1995). (se endvidere afsnit 2.1.3)

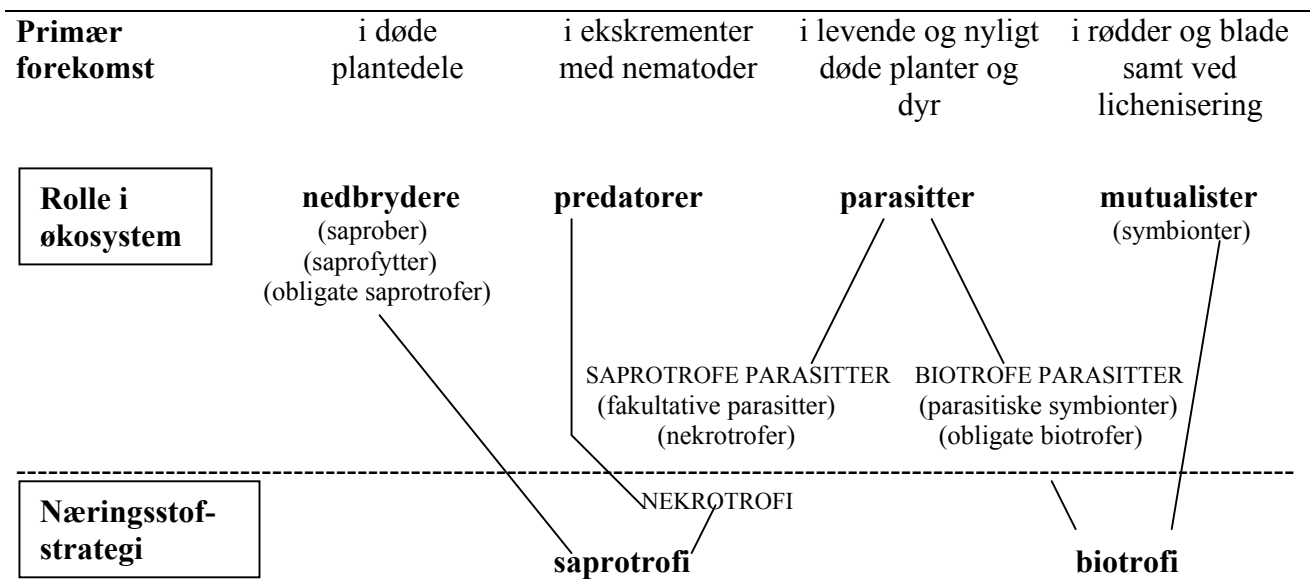
2.3.4 Forekomst

Hovedhabitatet for *P. verrucosum* er planteprodukter som beskrevet i afsnittene om taksonomi (2.3.1) og ochratoksin (2.1.3) (Larsen *et al.*, 2001).

2.3.5 Økologi, kontamineringsveje og livscyklus

Økologi

Organismers økologiske strategier kan betragtes ud fra to principper: enten ud fra deres rolle i økosystemet eller ud fra deres strategi for næringsstofoptagelse. De to principper kompletterer hinanden, idet rollen i økosystemet fortæller noget om organismernes levevis i tid og rum, mens deres næringsstofstrategi fortæller noget om organismernes fysiologi (Petersen, 1995). Opdelingen har klassisk taget udgangspunkt i organismernes rolle i økosystemet, hvor heterotrofe organismer inddeles i fire kategorier: nedbrydere, predatorer, parasitter og mutualister (se fig. 2.3.2).



Figur 2.3.2 Økologiske kategorier (iflg. Petersen, 1995)

Den nyere klassificering i økologiske strategier har udgangspunkt i næringsstofoptagelsen. Her opdeles overordnet i biotrofi og saprotrofi. De biotrofe organismer (gr. *'bios;* liv) udnytter direkte levende cellers indholdsstoffer f.eks simple sukkerstoffer, mens de saprotrofe organismer (gr. *sa'pros;* rådden) lever af døde celler. Til denne kategori hører også de nekrotrofe (gr. *ne'kros;* lig), der ligner de saprotrofe organismer, men her er værten i udgangspunktet levende celler, som de dræber. Til forskel fra en tydelig distinktion mellem de biotrofe og sapro-/nekrotrofe organismer er der ikke nogen klar fysiologisk afgrænsning mellem de nekrotrofe og ikke-nekrotrofe organismer, hvorfor Petersen (1995) henregner de nekrotrofe under de saprotrofe i bredeste forstand. Dette stemmer fint overens med Cooke og Rayner (1984), der skriver, at nekrotrofi er meget tæt relateret til og sommetider ikke til at skelne fra saprotrofi.

Om *P. verrucosum* dræber cellerne en for en eller først inficerer cellerne, når de er døde, er der meget få indici på. Elmholt (pers. komm.) har observeret *P. verrucosum* voksende på levende kimrødder, men om *P. verrucosum* levede af de levende celler eller af døde celler i ydre cellelag, vides ikke. Hvad der sker på celleniveau, ved man ikke (Elmholt, pers. komm.). Det tyder overordnet på, at lagersvampe dræber de levende celler, idet de nedsætter spireevnen i et kornparti (Abramson, 1998). Christensen (1973) (iflg. Wicklow, 1995) skriver, at lagersvampe enten langsomt eller hurtigt kan dræbe embryoet i kernerne og derfor bør regnes som fakultative parasitter. Antager man, at *P. verrucosum* parasiterer levende kerner (spiredygtige) og ikke kun lever i de overfladiske, døde cellelag, samt at infektionen af kornet er letal, må man ud fra Petersens

(1995) definition kunne kategorisere *P. verrucosum* som nekrotrofe eller saprotrofe parasitter, når man ser isoleret på deres tilstedeværelse i miljøer som kornlagre.

Lagersvampes økologi og livshistorie i kornmarker og deres rolle i naturlige plantesamfund ved man reelt meget lidt om (Wicklows, 1995). Lillehøj & Elling (1983) understreger vigtigheden af, at vi forstår økologien bag den naturligt forekommende OTA i fødevarer, og derfor er det essentielt at kende den toksinproducerende svamps cyklus fra jord til korn og tilbage til jord igen.

*P. verrucosum*s livscyklus er der meget lidt viden om, og spørgsmålene er mange: Hvornår finder kontamineringen sted, hvordan bringes *P. verrucosum* fra mark til lager, forekommer den i det hele taget i jorden, lever den som nedbryder i jorden, inficerer den kornet systemisk, findes den i naturlige habitater og føres til udefra, eller findes den kun i miljøer som lagre eller i mejetærskeren, hvor den overlever fra år til år ?

I begyndelsen af 70'erne var det den gængse holdning, at mykotoksinkontaminering udelukkende var en konsekvens af dårlig lagring. Da undersøgelser viste forekomster af ochratoksin og citrinin i bygprøver fra 10 forskellige områder i Sverige 2 uger før høst, ved høst, efter tørring og under lagring, vakte det opsigt (Hokby *et al.*, 1979). Konklusionen var, at ochratoksinkontamineringen måtte have fundet sted i marken. Yderligere var der ingen sammenhæng med en tidsafhængig udvikling, hvorfor der ikke kunne konkluderes noget om infektionstidspunktet, og det blev ikke påvist, at *P. verrucosum* var eller havde været tilstede. Det kan dog skyldes utilstrækkelige detektionsmetoder. Eller det er muligt, at ochratoksin blev dannet i jorden og translokeret gennem planten. Sådanne studier er ikke foretaget for *P. verrucosum*, men for andre mykotoksiner. Sutton *et al.* (1976) (iflg. Hestbjerg, 1993), har påvist zearaleon i majsplanter og Day & Mantle (1980) (iflg. Elmholt, 1999) har konstateret translokation af verruculogen. Lillehøj & Goransson (1980) (iflg. Lillehøj & Elling, 1983) har fundet *Penicillium* spp. med potentiale for ochratoksindannelse i dansk byg før høst. De fandt dog ingen ochratoksin, derfor er det tvivlsomt, om det var *P. verrucosum*. Desuden er der på baggrund af de seneste taksonomiske metoder sået tvivl om resultatet. Elmholt (2003) fandt som den første registreringer af *P. verrucosum* i dansk landbrugsjord i 11 ud af 64 undersøgte jorde. Konklusionen var, at *P. verrucosum* foretrækker lerjorde fremfor sandjord, samt at *P. verrucosum* ser ud til at forekomme med størst regelmæssighed i økologisk dyrket jord (Elmholt, 2003). I en undersøgelse, hvor inokuleret jord blev gravet ned i en periode på 13 måneder fra oktober 1994 til marts 1996 med flere frostperioder, fandt Elmholt & Hestbjerg (1999), at *P. verrucosum* kan overleve i jorden, formere og udvikle sig ved at nedbryde næringsstoffer i jorden

og sandsynligvis blive en integreret del af jordøkosystemet (Elmholt, 2000). De seneste forsøg i marken med naturligt kontamineret (m. høj kontamineringsprocent) udsæd tyder på, at *P. verrucosum* ikke er frøbåren (Elmholt, 2003), og derfor er teorien om systemisk infektion tvivlsom. Der er ingen tvivl om, at *P. verrucosum* trives under betingelserne i miljøer som lagre, og at den kan overleve her fra år til år. Dette er der belæg for i mine undersøgelser (se delprojekt I). I det følgende har jeg undersøgt betingelserne for *P. verrucosum*'s vækst og produktion af ochratoksin.

2.4 Økologiske faktorer der påvirker vækst og ochratoksin dannelse

Svampevækst og mykotoksinproduktion er en konsekvens af en vekselvirkning mellem svampen, dens vært og omgivelserne (Pitt *et al.*, 2000).

Allerede i 1960 skrev Christensen, at ødelæggelse af korn i lageret var påvirket af mange faktorer, hvor det tyder på, at de vigtigste er vandindhold, temperatur, hvilken svampeart der er dominerende, hvilken tid med hvilken rate svampen vokser, hvilken tilstand kornet er i, samt hvor og hvor meget kernerne er beskadiget (Quasen & Christensen, 1960). Der er et sammenspil mellem faktorerne, og det er måske forklaringen på, at noget korn kan opbevares ved 13-14% vandindhold i flere år uden at tage skade, mens andet korn lagret under samme betingelser mister spireevnen (Quasen & Christensen, 1960).

De indre og ydre økologiske faktorer vil være specifikke for ethvert lager, og denne individuelle profil vil være bestemmende for mykotoksinpotentialen. Profilen skal matche svampens vækst og mykotoksin dannende profiler (Frisvad, 1995).

Studier af *P. verrucosum* og OTA viser stor variation, og interaktioner mellem mange faktorer gør forskningen kompliceret. Jeg har valgt at inddele faktorerne, der påvirker vækst og ochratoksin dannelse, i hhv. fysisk/kemiske, biologiske og genetiske faktorer vel vidende, at et samspil finder sted på tværs af grupperingerne.

2.4.1 Fysisk/kemiske faktorer

Forekomsten af *P. verrucosum* og OTA kan betragtes i tid og rum. Nogle undersøgelser viser en årstidsvariation, mens andre finder en geografisk variation (Elmholt, 2003), og en stor variation findes selv inden for meget små afstande (Shotwell *et al.*, 1975). Vigtige fysisk/kemiske faktorer er desuden fugt, temperatur, vækstsubstrat, autoklavering, gassammensætningen CO₂ og O₂, pH, tid, håndtering, overfladebeskadigelse, hotspot m.m..

Den geografiske variation

Jørgensen *et al.* (1996) fandt ingen geografisk forskel i indholdet af OTA i de prøver, de havde taget hos forskellige møller i Danmark, mens der er fundet en geografisk forskel blandt tilfælde af porcin nephropati. Dette forklarer Jørgensen *et al.* (1996) med, at korn til møllerne kan være blevet transporteret fra den ene ende af landet til den anden, hvorved der er sket en nivellering. Årsagen til den geografiske variation i forbindelse med porcin nephropati, mener han, er, at korn til foder evt. bliver behandlet med mindre omhu end korn til konsum, og at korn til foder ofte anvendes på den gård, hvor det produceres (Jørgensen *et al.*, 1996). Nye undersøgelser af korn fra gårde fordelt over hele landet underbygger, at der kan være stor geografisk variation inden for den samme sæson (Elmholt ikke pub.). Samtidig viser nedbørsresultater, at der kan være stor differens i nedbøren trods det, at Danmark er et lille land (se endvidere delprojekt I).

Årstidsvariation

Årstidsvariation hænger ofte sammen med vejrtilstandene omkring høst. Mills (1995) beretter kun om sporadiske tilfælde af *P. verrucosum* i 1989, hvor det var et tørt høstår. I Danmark har der været korrelation mellem våde høstår og høje niveauer af OTA. F.eks. var 1987 et meget vådt høstår med et markant højere indhold af OTA end gennemsnitligt. Væksten af svampe og produktionen af mykotoksiner er relateret til temperatur og vandaktivitet under kornets vækst, høst og lagring (Jørgensen *et al.*, 1996).

a_w og temperatur

Det nævnes gang på gang, at specielt temperatur og vandaktivitet har stor betydning for forekomsten af *P. verrucosum* og OTA (Marquardt & Ronald, 1996). Temperatur er lige så vigtig som vandindholdet, skriver Christensen (1960). Vandaktiviteten, a_w , er udtryk for vandtilgængelighed for organismen og defineres ud fra det relative vanddamptryk, der ydes på et substrat. Jo lavere a_w er, des mindre vand er tilgængeligt for organismerne. En a_w på omkring 0,70 er minimum for de fleste lagersvampe (Ominski *et al.*, 1994). a_w svarer til "equilibrium relative humidity", e.r.h. (se yderligere afsnit 2.6) (Pixton & Warburton, 1971).

Harwig & Chen (1974) finder i et forsøg med inokuleret hvede og byg med *P. viridicatum* (dvs. *P. verrucosum*, idet den producerer OTA), at dannelse af ochratoksin A er mulig ved både 18% og 22% vandindhold opbevaret ved henholdsvis 86% RH ($a_w = 0,85-0,86$) og 90% RH ($a_w = 0,90-$

0,93) og ved både 12°C og 25°C, men også helt ned til 5°C, 25% vandindhold (95% RH, $a_w = 0,95-0,97$) blev der produceret OTA.

Northolt *et al.* (1979) undersøgte OTA-produktionen i agar og byg og fandt, at optimal vækst og produktion af OTA er ved en a_w -værdi på 0,97 (ved 4-31°C, optimum ved 24°C, i byg kun ned til 12°C). I denne undersøgelse blev der produceret OTA ved vandindhold på 23,6% ($a_w = 0,93$, v. 24°C) og 17,9% ($a_w = 0,91$, v. 24°C) men ikke ved 14,4% ($a_w = 0,86$, v. 24°C), mens der stadig var svampevækst ved 14,4% ($a_w = 0,86$, v. 24 °C) og helt ned til 0°C ($a_w = 0,95$).

Minimumsvandaktiviteten for vækst får Northolt *et al.* (1979) til at være 0,80 og mellem 0,83-0,86 for produktion af OTA.

Et lidt nyere studie med nedkølet lagring af hvede viser, at OTA allerede dannes ved 4°C, når vandindholdet er større end 20% (efter 100 dage). Ved 10°C dannes OTA, når vandindholdet er større end 18% (efter 160 dage) (Müller & Boley, 1992).

I endnu et nyere laboratoriestudie af Hetmanski (1997) (iflg. Scudamore & Wilkin, 1999) med inokuleret byg og hvede blev det vist, at OTA-produktionen begyndte efter 8 uger ved 17,3% vandindhold ved både 15°C og 20 °C, mens OTA-produktionen indledtes ved 16,3% inden for få uger i byg. Konklusionen for dette studie var, at OTA kunne dannes efter en given tid fra 16,5% vandindhold og en temperatur på mindst 15°C. Scudamore & Wilkin (1999) refererer til laboratoriestudierne og mener, at de ikke giver data nok til at forudsige risikoen ved lagring, men det bestyrker teorien om, at OTA sædvanligvis ikke udvikles, hvis kornet hurtigt bliver tørret ned til 16% uanset temperaturen.

OTA-dannelsen afhænger af en lang række faktorer og ikke alene af et højt vandindhold, men vandindholdet giver en klar indikation på risikoen (Scudamore & Wilkin, 1999). Vigtige faktorer for vandaktiviteten i kornet under lagringen er, hvordan de klimatiske betingelser har været under vækst og høst, og hvilke tørrings- og lagringsteknikker der er blevet brugt (Lacey & Magan, 1991) (iflg. Jørgensen *et al.*, 1996). Tørringsteknikker vil blive beskrevet i afsnit 2.5. Det fremgår af studierne, at forekomsten af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA er et samspil mellem flere faktorer. I nedenstående afsnit om *hotspots* vil jeg komme yderligere ind på undersøgelser, hvor flere faktorer er integreret i bl.a studier fra felten.

Kornhåndtering og lagringsbetingelser

Kornets kvalitet bl.a. med hensyn til hvor stor en del, der har taget skade under høst, har betydning for infektion af lagersvampe (Marquardt & Ronald, 1996). Mekanisk skade på kernerne gør det

muligt og nemmere at trænge igennem frøskallen. Undersøgelser viser, at svampe optræder hurtigere i beskadiget korn. En infektion af lagersvampe er derfor også relateret til måden, hvorpå kornet bliver håndteret, og hvor stor en beskadigelse der sker under tærskning og lagring (Wicklow, 1995).

Høstet korn med meget højt vandindhold kan, hvis det tørres hurtigt ned eller tørres ned ved høje temperaturer, stresses, hvorved frøhviden revner eller kernerne beskadiges på anden måde (Wicklow, 1995).

Flannigan (1978) finder, at der er langt større kontamineringsprocent af xerofile svampe (*Penicillium* spp.) ved mejetærsket byg og hvede end ved håndtærskede kerner. Desuden ser det ud til, at der er en sammenhæng mellem kontamineringen og de vegetative dele af kornet, men også sporer fra *Penicillium* spp. isoleret fra jordoverfladen og levninger fra sidste høst i både mejetærskerens tromle og tømningssnegl kan kontaminere kornet i mejetærskeren. Støv, kornrester og avner i kornsække viste sig derudover at være endnu en kilde til kontaminering af kornet (Flannigan, 1978).

Tid

Perioden, hvor kornet ligger lagret under forkerte forhold, er afgørende for udviklingen af svamp og OTA-produktionen (Marquardt & Ronald, 1996). Foreliggende undersøgelser viser forskellige udfald m.h.t. varighed afhængig af de fysiske og biologiske faktorer. Der kan derfor ikke siges noget entydigt om, hvor længe kornet kan ligge under uhensigtsmæssige forhold. Det vides heller ikke med sikkerhed, hvordan produktionskurven ser ud for dannelse af OTA. En undersøgelse af Madhyastha *et al.* (1990), hvor *P. verrucosum*s vækst og OTA- og citrinin-produktion blev fulgt efter 7, 15 og 30 dage ved 28°C på forskellige autoklaverede cerealiesubstrater viste, at OTA-produktionen var lineær: Den steg fra dag 7 og var ikke nået et plateau ved dag 30, mens citrininproduktionen i hvede nåede et maksimum efter 23 dage (beregnet).

I et længerevarende studie af Abramson *et al.* (1997) i 60 uger, hvor 2-radet og 6-radet byg blev fugtet op og placeret i et tørt lager, blev bl.a. effekten af tid observeret. Ochratoksin A blev detekteret i uge 8 for 2-radet byg og i uge 4 for 6-radet byg. Maksimum indtraf i henholdsvis uge 28 og uge 24. Maksimumværdien af OTA i 6-radet byg, der under hele forløbet havde et langt højere indhold, lå på 0,97 ppm. Årsagen til faldet i citrinin-niveauet menes dels at være en kemisk nedbrydning og dels enzymatisk aktivitet.

Vækstsubstratet

Vækstsubstratet har stor indflydelse på produktionen af OTA (Filtenborg *et al.*, 1990; Pitt and Samson, 1990 (iflg. Marquardt & Frohlich, 1992)). Madhyastha *et al.* (1990) undersøger substratspecificiteten og konkluderer, at *P. verrucosum* producerer mere OTA i cerealier end i ”oilseed” (sojabønner og jordnødder). I overvågningsprogrammerne fra 1996 finder Jørgensen *et al.* (2000), at rug er den afgrøde, som oftest er kontamineret og indeholder det højeste niveau af ochratoksin A. Abramson *et al.* (1980) (iflg. Marquardt & Ronald, 1996) rapporterede om OTA dannet i byg og hvede, men ikke i havre ved 21% fugtighed og 12-29°C i et kornlager.

Forskellige isolater (varianter) af samme art kan producere ulige mængder af OTA under samme betingelser (Marquardt & Frohlich, 1992). Eller forskellige isolater kan respondere forskelligt på de samme vækstmedier og betingelser (Harwig og Chen, 1974; Northolt *et al.*, 1979; Haggblom, 1982; Müller & Boley, 1991).

Et isolat kan desuden miste evnen til at producere OTA i et substrat, det tidligere har responderet på (Frisvad & Filtenborg, 1989). Desuden viste Filtenborg *et al.* (1990) (iflg. Frisvad, 1995), at en type gærekstrakt (i YES agar) fremmede ochratoksin- og citrinindannelsen, mens en anden type gærekstrakt fra samme firma hæmmede produktionen.

Müller og Boley (1991) undersøger effekten af autoklivering og overfladesterilisering på produktionen af ergosterol, OTA og citrinin. Hveden indstilles på 25% vandindhold, kontamineres med *P. verrucosum* og lagres ved hhv. 4°C og 10°C. Begge behandlinger havde en øget effekt sammenlignet med en ubehandlet kontrol. Specielt autokliveringen giver en øget OTA- og citrininproduktion. Dette kan sandsynligvis tilskrives den hydrotermiske påvirkning, der gør stivelsen mere tilgængelig. Müller og Boley (1991) konkluderer dog, at koldlagret, autoklaveret og overfladesteriliseret hvede ikke kan fortælle noget om vækst-kinetikken og produktionen af mykotoksiner fra *P. verrucosum* under reelle landbrugsbetingelser.

pH

Hydrogenionkoncentrationen i substrater kan påvirke de metabolske processer og dermed vækst, sporulering, mykotoksinproduktion samt temperatur- og fugtforhold (Magan & Lacey, 1984). Magan og Lacey (1984) fandt ved studier af bl.a. *Penicillium* spp., at en ændring af pH fra 6,5 til 4,0 gjorde, at minimum- a_w -værdien steg, og antallet af dage øgedes for sporulering.

CO₂ og O₂

Yderligere faktorer, der fører til svampevækst og mykotoksindannelse, er oxygen-tilgængeligheden og carbondioxid-koncentrationen (Marquardt & Ronald, 1996).

Undersøgelser viser, at toksinproduktion er mere følsom end svampevækst over for forskellige niveauer af atmosfæriske gasser. I de fleste tilfælde er lav O₂-koncentration (mindre end 1,0%) og/eller øgede CO₂-koncentrationer effektive hæmmere af svampevækst og udvikling af mykotoksiner (Paster & Bullerman, 1988) (iflg. Ominski *et al.*, 1994). Iben Haasum (1998) registrerer, at *P. verrucosum* er specielt følsom over for forhøjede niveauer af CO₂. Desuden er det observeret, at svampes følsomhed over for gassammensætninger er påvirket af vandaktivitetsniveauet (a_w) og temperaturen (Magan & Lacey, 1984a) (iflg. Ominski *et al.*, 1994).

Fungicider, jordbearbejdning m.m.

Fungicider, gødningshistorie, jordbearbejdning og sædskifte er faktorer, som evt. har indflydelse på tilstedeværelsen og samspillet af lagersvampe, men som jeg har valgt ikke at tage hensyn til.

Hotspots

Hotspots er steder, hvor samspillet mellem faktorer skaber optimale betingelser for vækst og dannelse af OTA. Det kan være lommer, hvor kornet i et lager ikke bliver ordentligt tørret ned, eller steder, der er svære at komme til at gøre rene. Hotspots kan desuden opstå, hvis f.eks. vandindholdet stiger i kornet, hvorved xerotolerante lagersvampe kan vokse og kontaminere kornet.

Metabolismeaktiviteten fra svampene kan være med til at hæve temperaturen og vandindholdet, således at yderligere svampeaktivitet bliver mulig. På denne måde stiger vandindholdet til et niveau, hvor også mindre xerotolerante svampe får gode betingelser, og potentialet for dannelsen af mykotoksiner øges. Denne udvikling kan fortsætte og resultere i, at kornet brænder sammen (Wicklow, 1995).

Der er ikke lavet mange studier, hvor man har undersøgt dannelsen af OTA ved marginale betingelser, som opstår i miljøer med tørring og lagring af korn i vore klimatiske områder. De fleste studier er lavet under laboratorieforhold og med det mål at maksimere OTA-dannelsen (Scudamore & Wilkin, 1999).

Shotwell *et al.* (1975) belyste et naturligt hotspot i et majsager, der var opstået p.g.a. et åbent vindue. Med enkelte kernebestemmelser illustrerede han stor variation. Trods mycelievækst mellem

tilstødende kerner kunne der være store forskelle i toksinindholdet (aflatoksin). Han demonstrerede desuden, at dårlige opbevaringsbetingelser kan føre til et højt niveau af mykotoksin på 6 uger. Fund af én kornprøve i et lager med OTA vil ifølge Scudamore (1999) betyde, at der er potentiale for svampevækst og dannelse af OTA i ethvert parti af det øvrige lager med samme kombination af temperatur og vandindhold som der, hvor prøven blev taget.

2.4.2 Biologiske faktorer

Hvor stort er sporetrykket, hvilke mikrobielle interaktioner findes, og hvilke vertebrater f.eks kornsnudebiller og små pattedyr som mus og rotter er i kornet? Svampevæksten og mykotoksindannelsen er også påvirket af interaktionen mellem disse faktorer (Marquardt & Ronald, 1996).

Antagonisme

Der er flere eksempler på, at *Penicillier* danner toksiner, der er giftige over for andre fungi eller bakterier. *Penicillium breviocompactum* Dierck, der producerer det først registrerede penicillin, viste sig at være dominerende både over for mark- og lagersvampe trods det, at det er en langsomt voksende svamp (Magan & Lacey, 1984) (iflg. Wicklow, 1995). Lignende observationer har vist, at mykotoksiner anvendes i kampen med bl.a. hurtigere voksende svampe (Wicklow, 1995).

Hvorvidt *P. verrucosum* anvender ochratoksin ved interaktioner med andre mikroorganismer, vides ikke. De undersøgelser, som foreligger, er ældre studier med *P. viridicatum*, og det er ikke klart, om isolaterne er ochratoksindannende. Undersøgelserne viste, at sporulering og vækst blev hæmmet ved placering i petriskåle med en række forskellige bakterier, mens metabolitter fra enkelte bakterier havde en stimulerende effekt på sporulering og inducerede dannelsen af vesikler (Moore-Landecker & Stotzky, 1973) (iflg. Petersen, 1995). Elmholt fandt ikke, at OTA iblandet agar hæmmede sporulering og vækst af andre skimmelsvampe (pers. medd.).

Laboratorieforsøg med andre OTA-producerende arter, her *A. alutaceus*, viste, at produktionen af OTA var påvirket af tilstedeværelsen af andre konkurrerende mikroorganismer. Produktionen af OTA var meget større i steriliseret byg end i ikke-steriliseret byg, og produktionen faldt, da ikke-producerende isolater blev genindført til den sterile byg (Chelack et al., 1991a) (iflg. Marquardt & Frohlich, 1992). Marquardt & Frohlich (1992) mener derfor, at tilsætning af mikroorganismer til korn kontamineret med OTA-producenter såsom *P. verrucosum* er en metode, hvormed produktionen af OTA kan minimeres. Modsat er det vigtigt at sterilisere sit substrat, hvis undersøgelserne skal fokusere på OTA-produktion (Marquardt & Frohlich, 1992).

Arbejder med kommerciel anvendelse af bakterier i biologisk kontrol af patogene mikrosvampe er i gang. De viser bl.a., at *Pseudomonas* sp. producerer cykliske lipopeptider, der har antagonistiske egenskaber over for plantepatogener (<http://www.ecol.kvl.dk/common/research/genmic/rhizosphere-microbiology-and-biological-control/index.php3>).

Succession

Wicklow (1995) beskriver, hvordan succesionen i lageret foregår. Hvis kornet har et meget lavt vandindhold, er det typisk (f.eks. *Eurotium* spp.), der invaderer kornet først. Efterhånden som de xerotolerante svampes metabolismeaktivitet øges, stiger vandindholdet og temperaturen som tidligere nævnt, hvorved nye kolonister får mulighed for at udkonkurrere de mest xerotolerante svampe. Ligeledes kan der opstå en stratificering af lageret, når vandindholdet er uens fordelt i lageret. Semeniuk *et al.* (1947) (iflg. Wicklow, 1995) registrerede, at *P. palitans* (syn. *P. verrucosum*) var eneste svamp i de øverste 30 cm i majs, der var lagret i metalbeholdere. Svampefungien kan også bestå af de ”sekundære” successionsarter fra starten af lagringen, hvis kornet f.eks ikke er blevet tørret ordentligt ned, eller hvis der er hotspots, hvor kornet af forskellige årsager ikke kan tørres ned. Det er dog ikke kendt, om de ”sekundære” successionsarter inficerer kerner, hvor der har været tidligere kolonister (Wicklow, 1995).

Mutualister

Det er et kendt fænomen, at infektion af en organisme kan forhindre kontamineringen af en anden. Således kan svampekolonister fungere som mutualister ved at forsvare planter mod yderligere svampeangreb eller andre herbivorer. Der findes flere eksempler herpå i marksituationer, men eksempler på kornresistens i lager kendes ikke (Wicklow, 1995).

Det kan godt være, at svampeinteraktionerne i kornet på høsttidspunktet ikke er relevante for kornet på lager, skriver Wicklow (1995). Han mener dog, at disse illustrerer, hvor kompleks en svampehistorie der følger kornet, når det skal lagres. Faktisk ved man meget lidt om livshistorien og økologien for ”lagersvampe” i marken og nærmest ingenting om deres rolle i naturlige økosystemer (Wicklow, 1995).

Insekt-interaktioner

Der findes også eksempler på, at det kan være en fordel, at der har været andre organismer før svampen. F.eks kan insekter være med til at lette kontamineringen af kernerne ved fysisk at bryde

frøskallen (seed coat) og lette gennemtrængningen til kernerne. Rasmussen (DLG, centrallab., pers. medd.) påpeger, at kornsnudebillerne (ex. *Sitophilus granarius*) og miderne udgør en vigtig faktor for svampekontamineringen. Han understreger, at det er vigtigt at holde lagertemperaturen nede, så metabolismeaktiviteten nedsættes. Ved temperaturer under 12°C har *Sitophilus granarius* intet stofskifte. Rasmussen (DLG, centrallab., pers. medd.) mener, at kornsnudebiller er en af de vigtigste årsager til udbredelse af svampe i kornlageret (en bille kan lægge op til 20-40 larver i kernerne). En af de få undersøgelser, der er foretaget om interaktioner mellem svampe og insekter, viser dog, at ekskrementer fra en bille (*Tribolium castaneum*) i hvede dels reducerede svampevæksten signifikant, og dels reducerede OTA-produktionen fra *Aspergillus alutaceus*. Hypotesen var, at ekskrementerne øgede svampekurrencen, hvorved OTA-producerende svampe udkonkurreredes (Blank *et al.*, 1995).

Synergieffekter mellem mykotoksiner

Der er muligvis en synergieffekt mellem mykotoksinerne og/eller mellem mykotoksiner og bakteriebårne sygdomme som *Salmonella*. F.eks kan mykotoksinerne medføre immunsuppression, hvilket kan føre til bakterieinfektion eller neoplastiske virkninger (Filtenborg, 1994; Frisvad, 1995; Abramson, 1998). Der er rapporteret om synergieffekter mellem citrinin og ochratoksin A hos fugle (Huff *et al.*, 1988) (iflg. Müller & Boley, 1992), og ved mus er det blevet rapporteret, at citrinin har en forstærkende effekt på den letale og muligvis også den cancerogene effekt af ochratoksin A (Kanisawa, 1984) (iflg. Müller & Boley, 1992).

Sporetryk

Undersøgelser med *A. alutaceus* (Chelack *et al.*, 1991) (iflg. Ominski *et al.*, 1994) og *A. flavus* (Karunaratne & Bullerman, 1990 & Odamtten *et al.*, 1987) (iflg. Ominski *et al.*, 1994) samt produktion af henholdsvis OTA og aflatoksin viser, at lavere inokulum (10^2 konidier/g frem for 10^5 konidier/g) gav et øget mykotoksinindhold. Muligvis er der en sammenhæng mellem mycelievækst og aflatoksinproduktion. Aflatoksinproduktionen er større, hvor populationen er mindre og har mere substrat at vokse i (Odamtten *et al.*, 1987) (iflg. Ominski *et al.*, 1994).

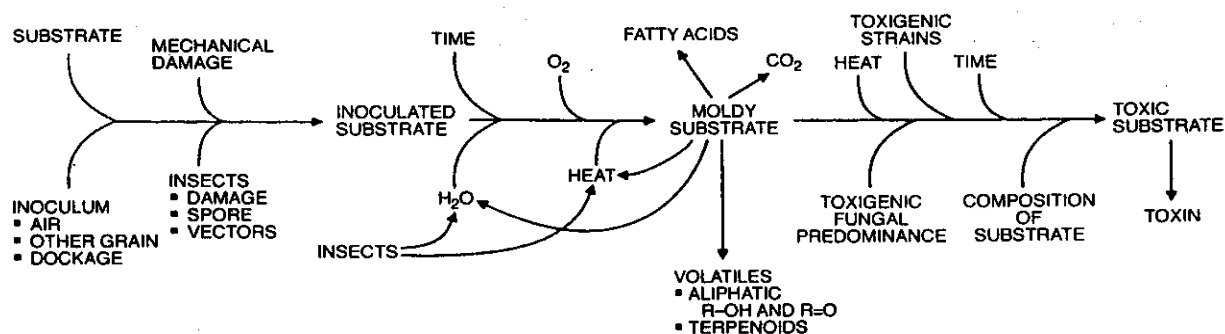
2.4.3 Genetiske faktorer

Frisvad (1992) (iflg. Frisvad, 1995) finder i en multivariabel, statistisk undersøgelse på baggrund af et HPLC-studie en kvantitativ forskel i produktionen af OTA mellem fire forskellige stammer af *P.*

verrucosum. I nye molekylærundersøgelser finder Lund, DTU (ikke pub.), en genetisk variation mellem *P. verrucosum* fra samme bedrifter og fra forskellige geografiske områder.

2.4.4 Opsummering af faktorer

Abramson (1998) skriver opsummerende, at svampevækst og mykotoksindannelse er et resultat af interaktion mellem flere faktorer (fig. 2.4.1). Følger man figuren kronologisk, vil kornet blive kontamineret af svampesporer fra luften, andet korn eller spild/rester. Mekanisk skade fra høstredskaber, insekter eller andre dyr kan yderligere være med til at sprede inokulum eller skabe bedre betingelser for kontamineringen af kornet. Svampevækst er herefter afhængig af tilstedeværelse af oxygen, tid, varme og fugt. Fugt og varme kan komme fra insekters og svampenes egen metabolismeaktivitet, mens fugt også kan komme fra eksterne steder. F.eks. kan fugt blive tilført udefra, hvis der er en utæthed, hvor regn og sne kan trænge igennem, eller hvis der dannes kondens. Abramson (1998) beskriver, hvordan processen fortsætter med en eventuel dannelse af mykotoksiner, hvis den rette toksigene art er til stede og har betingelser for at udvikle toksiner. Yderligere udvikling af svampen afhænger af varme, det rette substrat og tid, således at svampemetabolismen kan indgå i en sekundær fase, skriver han. Kemiske biprodukter fra svampevæksten udskilles og kan registreres som frie fedtsyrer, CO₂, ergosterol og specifikke alkoholer og ketoner, der bl.a. udgør svampens duftstoffer.



Figur 2.4.1 Faktorer der påvirker mykotoksindannelse i lagret korn (Abramson, 1998)

Abramson (1998) konkluderer, at det på grund af samspillet mellem disse mange faktorer er nødvendigt at studere svampevækst og mykotoksindannelse under naturlige lagerbetingelser. Når specifikke lagersituationer og procesbetingelser for vækst og mykotoksindannelse kan karakteriseres, er det muligt at udforme forebyggende procedurer og tidlige advarselsindikatorer.

2.5 Forskellige lagrings- og tørringsmetoder

Selvom man inden for landbruget allerede for 100 år siden blev klar over, at kornets vandindhold er vitalt for en sikker lagring, og man også i dag er bevidst om problematikken, er det stadigvæk 10-20% af korn høstet på verdensplan, der bliver ødelagt på grund af mikrobiel vækst. De to vigtigste faktorer er dårlige nedtørrings- og lagringsprocedurer (Olsson, 2000).

Lagertørring/planlagertørring og gennemløbstørring er de almindeligst anvendte anlæg til kornetørring i Danmark (Hougaard, landbrugstekniker, Foulum, pers. kom). I mit monitoringsprojekt (delprojekt I) var det et lagertørringsanlæg, der blev benyttet. Ud fra en spørgeskemaundersøgelse i PREMYTOKS-projektet (FØJO II) er det også det mest almindelige tørringssystem blandt økologer (Høj, pers. komm.). På eksperimentel basis har Kristensen (videnskabelig assistent, Bygholm) gjort forsøg med et nyt tromletørringssystem, og de hidtidige resultater viser en meget effektiv reduktion af svampesporer.

Lagertørring/planlager

Princippet i lagertørring er, at tørring og lagring foregår samme sted. Det kræver dog store krav til styring af luftfugtigheden, skriver Høj (1995), da det er eneste måde, hvorpå der kan opnås ensartet vandindhold fra bund til top i kornlaget. Tørreprocessen foregår ved, at der blæses luft op gennem kornlageret. Tørring kan foregå med eller uden varmetilførsel. Tørring uden varmetilførsel kan aktualiseres, hvis blot luftens temperatur er ca. 5° C lavere end kornets temperatur. Hvis temperaturen er tilstrækkelig lav, mener Høj (1995) ikke, at det er nødvendigt at tørre kornet ned til et bestemt vandindhold. Tørring uden varmetilførsel vil være begrænset til morgen- og nattetimer med lave temperaturer, så det skal tages i betragtning, at tørring kun kan foregå i ca. 12 timer i døgnet. Tørring med varmetilførsel anbefales, hvis man skal have bragt vandindholdet i kornet ned til et bestemt niveau. Tilsættes der for megen varme, er der risiko for at kornet ”overtørres” i de nederste lag, mens der dannes kondens i de øverste kornlag. Der stilles specifikke krav til dimensionering herunder afstand mellem luftkanaler samt til blæserens kapacitet og kornets lagtykkelse. Fordelen ved planlager er, at det kan udformes primitivt og har stor modtagekapacitet. Ulempen er, at det er et langsomt tørringsforløb (afhængig af blæserens ydelse og kornets lagtykkelse) med tørring i gennemsnitligt flere uger, og det kræver god styring at sikre en ensartet nedtørring.

Scudamore & Wilkin (1999) anbefaler, at målet for tørringsprocessen skal være at minimere den tid, hvor kornet har over 16 % vandindhold og en højere temperatur end 20 °C.

Gennemløbstørringsanlæg

Gennemløbstørring er en hurtig tørringsmetode (få timer) med forholdsvis høj temperatur (40-60 grader) afhængigt af kornets vandindhold og opholdstiden i tørreriet. Der sker en kontinuerlig tørring og køling af kornet, mens en løbende påfyldning og tømning foregår. Fordelen ved anlæggene er, at de kan håndtere store mængder vådt korn og tørre ned hurtigt. Ulemperne er, at de kræver betjening og fortløbende tilsyn, at de kræver flytning af kornet, har begrænset kapacitet, og endelig at de har et stort energiforbrug. Ofte er tørreriet tilknyttet et planlager, hvor nedkølingen fortsætter.

Af øvrige tørrerier kan portionstørrerier og omløbstørrerier nævnes. Forskellen mellem tørrerityperne ligger i kornets opholdstid i tørreriet i forhold til temperaturen (Høj, 1995).

Tromletørreri

Tromletørreriet består i princippet af en tørretromle og en køletromle, hvor kornet ledes igennem. Der er mulighed for regulering af tørrelufttemperatur (0-1000°C), tørre- og køleluftmængder og opholdstid. Dette giver mulighed for at påvirke korntemperaturen og kølehastigheden (Kristensen & Søgaard, 2001).

Resultater i forsøgstørreriet viste, at tromletørringen havde markant effekt på svampeindholdet. En reduktion af svampesporer med en faktor 105 var mulig uden at spireevnen blev forringet, hvis tørrelufttemperaturen var 250 °C, og korntemperaturen efter tørring lå på 60°C (tabel 2.5.1) (Kristensen & Søgaard, 2001).

Tabel 2.5.1 Faktor for reduktion af svampekim ved behandling i tromletørreri

	Tørrelufttemperatur = 250°C	Korntemperatur = 60°C
Gærsvampe	644	12
Skimmelsvampe	105	11
<i>Fusarium</i>	273	7

(iflg. Kristensen & Søgaard, 2001)

2.6 Fysiske faktorer under lagring

De vigtigste fysiske faktorer under lagring er vandindhold, temperatur og relativ luftfugtighed (RH). Herudover har de fysiske rammer også en effekt ved lagringen af korn. Rammerne har jeg valgt ikke at komme nærmere ind på. De nævnte fysiske faktorer gennemgås, men jeg vil pointere, at det ikke er her, hovedvægten af projektet ligger. Området er omfangsrigt og et projekt i sig selv. For overskuelighedens skyld har jeg opdelt afsnittet, så vandindhold og temperatur gennemgås hver for

sig vel vidende, at der er et vitalt samspil. Jeg tager udgangspunkt i Pixtons (1982) publikation, der netop beskriver vigtigheden af disse faktorer på lagrede produkter.

Vandindhold

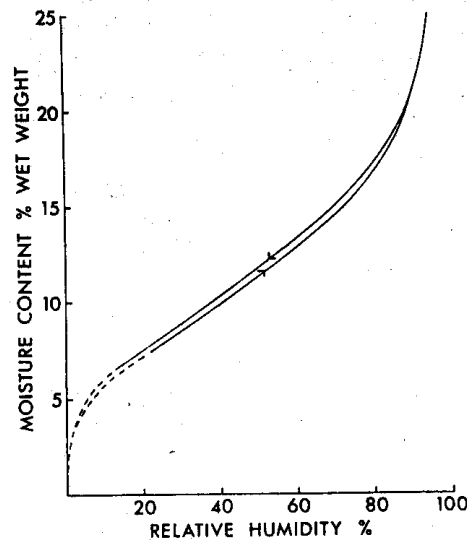
Basalt set består et produkt af vand og tørstof, hvor mængden af vand kan variere, mens mængden af tørstof er konstant. Man skelner mellem to måder, hvorpå vand kan være forbundet med produktet (Pixton, 1982).

1. Adsorberet vand: Adsorberet vand er det vand, der er bundet ved molekylær tiltrækning
2. Absorberet vand: Det vand der er løst bundet af kapillærkræfterne i de små ekstracellulære kapillærer af kernerne

Adsorberet og absorberet vand er det, man tilsammen kalder for det "frie" vand, og det er det, der er interessant i forbindelse med vandindhold og bevægelse af vand i et kornlager.

De fleste lagrede produkter incl. korn er hygroskopiske, d.v.s., at de vil optage eller afgive fugt til den omgivende atmosfære, indtil der opstår en ligevægt. Når ligevægten er indstillet, vil der ikke ske nogen ændring af vandindholdet i kernerne. Den relative fugtighed (RH) i ligevægt med et produkt (f.eks korn) betegnes som e.r.h. (equilibrium relative humidity). E.r.h. defineres som det damptryk, som udøves af vand i produkter (eks. korn), og udtrykkes som procent af det mættede damptryk af rent vand ved samme temperatur. Vandaktivitet (a_w) er en anden måde at udtrykke e.r.h. på ($0,95 a_w = 95\%$ e.r.h.). (se endvidere afsnit 2.4.1). I forbindelse med lagring af korn er e.r.h. en vigtigere parameter end vandindholdet (%) (Pixton, 1982).

Hvis en kornmængde oprindeligt havde et vandindhold på omkring det kritiske niveau (ca. 13,5 %) eller mere, er vandbevægelsen større og hurtigere, end hvis vandindholdet var lavere (omkring 11-12 %). Når f.eks RH stiger fra 50 til 65 %, stiger vandindholdet kun lidt, men hvis RH stiger fra 65 til 80%, stiger vandindholdet i korn hurtigt (Christensen, 1957). Dette kan forklares ved forholdet mellem RH og vandindhold (se fig. 2.6.1).



Figur 2.6.1 Desorbtion-/adsorptionsforholdet mellem vandindhold og relativ fugtighed (RH) for korn (iflg. Pixton, 1982)

Kurven beskriver sorbtion (både ad- og desorbtion) af vand ved et produkt som funktion af RH ved en given temperatur. Det er en sigmoidformet kurve, der udtrykker bindingsenergien mellem vand og f.eks korn. Forholdet mellem vandindhold og RH er ikke det samme ved adsorbtion som ved desorbtion p.g.a. molekylegenskaberne. Desorbtionskurven er tættere på vandindholdsaksen, d.v.s., at ved samme vandindhold skal der et lavere RH-niveau til at afgive vandmolekylerne, end der skal til for at binde dem. Den nederste del af kurven udtrykker det først bundne vand. Når vandindholdet stiger, danner vandmolekylerne et første ”monolag”. Dette lag er fuldstændigt ved en RH på 20%, herefter dannes der flere lag, der er mindre tæt bundet til kernen. Dvs., at bindingsenergien falder. Fra 75% RH til mætning er kurven konkav mod vandindholdet. Her ligger forklaringen på, at vandindholdet stiger hurtigt, mens RH kun stiger lidt jævnt før ovenfor nævnte eksempel. I dette område vil kapillærerne fyldes, og det er her vandet bliver lettere tilgængeligt for mikroorganismer. Vandbindingsevnen er meget lav (Pixton, 1982).

Forholdet mellem RH og vandindhold, som det er illustreret i sigmoidkurven, er essentielt for lagring af alle fødevarer. Dertil kommer så påvirkningen af temperatur og forskellen mellem substraterne, d.v.s. deres individuelle evne til vandbinding afhængigt af molekylesammensætningen. Mens stivelsesholdigt korn er i ligevægt med 70% RH ved ca. 14 % vandindhold, vil olieholdige afgrøder skulle ned på 6% RH, og sukkerholdige produkter f.eks sultaner vil kunne holde en ligevægt med RH 70% ved 21% vandindhold (Pixton, 1982).

Temperaturen

Temperaturen påvirker e.r.h., hvorved vandbindingskurven forskydes. Ved en stigning på 10 °C stiger e.r.h. med 3% inden for intervallet 20-80 % e.r.h. (Pixton, 1982) I ethvert lager eller en hvilken som helst beholder vil der, hvis der opstår en temperaturgradient, være en transport af fugt fra varmere til koldere dele af lageret. Selv om kornet, da det blev lagret, havde et homogent vandindhold, kan der opstå en ulige fordeling under lagringsperioden. Desuden er der en større transport af fugt (vanddamp) ved store end ved små temperaturforskelle (Christensen, 1957). Ved enhver RH indeholder luft mere vanddamp ved en høj temperatur end ved en lavere temperatur. Hvis korn varmes op, må det afgive vand til det varme, intergranulære rum. Ligeledes kan det absorbere vand, hvis det er blevet kølet ned, hvorved en konstant rh opretholdes (Pixton, 1982). Vandindholdet i kornet vil tilpasse sig den omgivende luft med hensyn til temperatur og damptryk. Når fugtig luft afkøles, falder damptrykket, og der vil ske en kondensering. Herved kan der afsættes vand til koldere områder af kornlageret.

Korn er en dårlig varmeleder, hvilket bevirker, at varmen ikke forsvinder hurtigt fra opvarmede områder. Desuden kan temperaturen stige yderligere, hvilket som tidligere nævnt skyldes metabolismeaktiviteten i både kornet og mikroorganismene. Men Pixton (1982) mener ikke, at det er mikroorganismeaktiviteten, der har betydning for mængden af vand i et kornlager. Derimod er det det eksisterende vand i kornet, der er hovedkilden til fugtproblemerne. Noget af vandet afgives fra overfladen, når varm, fugtig luft stiger, men varmere områder i kornet vil kontinuerligt absorbere vand fra den luft, der passerer. Heller ikke den omgivende luft er årsag til tilførsel af store mængder vand, men udgør en meget lille del sammenlignet med volumen af vand i f.eks korn. Hvis lageret udsættes for høje RH, er det kun i de øverste 15 cm, vandindholdet forøges, dels fordi diffusionen er langsom, og dels fordi lageret fungerer som en stor buffer.

Praksis

I praksis kan store temperaturudsving f.eks. i forbindelse med efterårets kolde nætter og varmere dagtimer resultere i transport af vand/fugt. Også springet fra vinter til forår med højere lufttemperaturer og måske opvarmning af siderne i siloen til følge kan føre til en temperaturgradient og være ophav til vandbevægelse.

I en del siloer dannes der kondens om foråret, og vandet drypper ned i toplaget. Heller ikke Christensen (1957) mener dog, at denne kondensering eller andre former for utætheder spiller den store rolle - i hvert fald ikke ved store kornlagre. Den største årsag til områder med høje

vandindhold i planlagre skyldes specielt transporten af fugt/vanddamp fra et område til et andet (Christensen, 1957). Ved et planlager (floor-dried bulk of grain) er temperaturen og vandindholdet stratificeret på det vertikale plan, fordi enhver kølings- og tørringseffekt starter nedefra og bevæger sig opad. Top-laget af kornet vil derfor være i størst risiko, fordi det er der, det tørrer senest (Scudamore & Wilkin, 1999). Seitz *et al.* (1982) finder, at svampeinvasionen er størst i toppen af et lager, der bliver luftet nedefra. Gennemluftning af kornet er dog vigtig for at holde en ensartet temperatur og mindske bevægelsen af vand, men er også den mest anvendte måde, hvorpå temperaturen reduceres homogent i lageret (Wicklow, 1995). Sommetider kan det være nødvendigt at lukke af for nogle luftkanaler for at koncentrere luften i bestemte områder af kornlageret. Mekaniske fejl kan også forårsage, at der ikke kommer luftgennemstrømning i nogle sektorer (Scudamore & Wilkin, 1999). Dette er yderligere med til at danne en temperatur- og fugtgradient i lageret.

Optagelse af vand fra den omgivende luft har dog iflg. Christensen (1957) en effekt på vandindholdet. Vintermåneder med høje RH er vanlige. Korn, der er i kontakt med den omgivende luft, indstiller sig forholdsvis hurtigt på en ligevægt med denne. Hvis der yderligere er cirkulation i lageret, er der risiko for, at kornet gradvist optager vand fra fugtig luft. Dette kan være årsag til, at man i tempererede områder har problemer med at holde kornet tørt og dermed frit for mikroorganismer.

Sauer & Burroughs (1980) undersøger muligheden for at udligne vandindholdet ved at blande vådt og tørt majs (fra 11-26% vandindhold) inkuberet ved 28°C og med RH på 78-85%. De konkluderer, at det er en rimelig god måde at spare tørringsudgifter på, så længe gennemsnitsvandindholdet er lavt nok til at undgå svampeinfektion. Det oprindeligt tørre korn indstillede sig på samme eller en lidt højere værdi af vandindhold end det oprindeligt våde korn. Desuden fandt de, at RH i det intergranulære rum frem for vandindholdet er den kritiske faktor, der begrænser svampeaktivitet. Yderligere konkluderer de, at selv meget små forskelle (1%) i RH kan være bestemmende for svampeinfektion og mykotoksinproduktion.

Pixton (1982) problematiserer praksis med at udligne vandindholdet ved at blande våde og tørre partier korn. Dels vil der ikke p.g.a. hysteresis (forskul i vandindhold ved absorption og desorption ved samme RH) indstilles en ligevægt, dels er diffusionen så langsom, at man risikerer, at svampekontamineringen når at indtræffe, og endelig kan det føre til udvikling af lokale hotspots.

Vandindholdet har også indflydelse på, hvordan kornet fordeler sig i lageret. Hvis det er for vådt, er den fysiske pakning sværere, og kornet flyder/løber heller ikke så let, hvilket kan forårsage dannelser af uhensigtsmæssige ”pyramider”. Desuden svulmer kernerne op, hvorved de ændrer volumenvægt. Når de svulmer op, vil luftrummet imellem kernerne også øges, således at kornet alt i alt optager mere plads (Pixton, 1982).

2.7 Fysiske faktorer i korn

Der mangler viden om, hvordan svampeinfektion påvirkes dels af kornets naturlige barriere (bl.a. avner og frøskal), dels af kornets histopatologiske forsvar samt af kornets ændring af næringsstofsammensætning og vitaminindhold, f.eks. nedbrydningen af vitamin-E, når kornet ældes på lageret (Wicklow, 1995).

Det egentlige frø er omsluttet af frøgemmet (frugtskal el. pericarp) og herudover af avner. Det egentlige frø består af den levende kim, næringsstoffer (frøhvide) og en frøskal (testa). Inderavnerne kan omslutte frugten (det egentlige frø og frøgemmet) enten løst som hos hvede og rug, eller de kan være sammenvoksede som hos byg. Ved havre omslutter avnen frugten og sidder ret fast, men ved hård tærskning falder en del af avnerne af (Hoseney & Faubion, 1992). Betragter man kornarternes generelle struktur, ses det, at der er basale forskelle (se fig. 2.7.1). F. eks er kimen i rug specielt udsat, idet aleuronelaget (som omslutter kim og frøhvide lige under testa) er ét cellelag, mens det hos havre består af flere cellelag.

Species	Caryopsis Type	Ventral Furrow	Starch Granules	Aleurone Thickness	Protein Bodies in Mature Endosperm
Barley	Covered	Present, not prominent	Simple	Multiple	No
Corn	Naked	Absent	Simple	Single	Yes
Oat	Covered	Present, not prominent	Compound	Multiple	Yes
Pearl millet	Naked	Absent	Simple	Single	Yes
Rice	Covered	Absent	Compound	Multiple	Yes
Rye	Naked	Prominent	Simple	Single cell	No
Sorghum	Naked	Absent	Simple	Single	Yes
Triticale	Naked	Prominent	Simple	Single cell	No
Wheat	Naked	Prominent	Simple	Single cell	No

^aAdapted from Rooney et al (1983).

Figur 2.7.1 Strukturelle karakteristika for korn (Hoseney & Fabion, 1992)

Beskadigelse under håndteringen er en faktor, der kan føre til nedsat spireevne eller større følsomhed over for svampeinfektion (Hoseney & Faubion, 1992).

I praksis kan korn begynde at spire, hvis det bliver vådt enten før høst eller under lagring, hvorved hydrofile kolloider i kornet påvirkes. Som følge af det osmotiske tryk kan det føre til, at frøskallen sprækker. Sprækker i frøskallen øger ligeledes risikoen for infektion af svampe (Wicklow, 1995). Axberg *et al.* (1997) har studeret byg- og hvedesorter og fandt, at der muligvis er genetiske betingelser for, om kornsorter er modstandsdygtige over for svampeangreb. Axberg *et al.* (1997) fandt en sammenhæng mellem lavt, totalt proteinindhold kombineret med et højt amyloseindhold og akkumulering af OTA. Dels ligevægtsindstiller sorter med højt amyloseindhold sig på et højere vandindhold. Dels giver et lavere proteinindhold en dårligere beskyttelse af frøhviden (endosperm). Häggblom og Ghosh (1985) (iflg. Ominski *et al.*, 1994) viste, at der var en positiv korrelation mellem proteinkoncentrationen i byg og produktionen af OTA for *P. verrucosum* ved både 12°C og 25°C. Det ovenfor nævnte studie med 2-radet og 6-radet byg (Abramson *et al.*, 1997) viste også en signifikant forskel mellem sorterernes indhold af OTA.

Undersøgelser af to hvedesorter, en hård (Hereward) og en blød (Apollo) inokuleret med *P. verrucosum*, viste ikke nogen stor procentvis forskel i det samlede indhold af OTA, men en forskel i fordelingen. Hvor den bløde hvede havde en større koncentration i melet, var fordelingen i den hårde hvede mere spredt i mel og ydre lag som avner (*bran, offal*). Dette menes at hænge sammen med, at det er nemmere for svampen at trænge gennem den blødere endosperm i Apollo. Desuden viste fuldkornsmel et større indhold af OTA end fint mel. Dette var i overensstemmelse med en reduktion af OTA til en tredjedel ved rensning af kornet, hvorved pericarp blev fjernet. (Osborne *et al.*, 1996).

Chelkowski *et al.* (1981) skriver i et forsøg med hvede, rug og byg, at et lavt zinkniveau gør kernerne mere resistente.

I forædlingen af afgrøder til foder og konsum kan egenskaber i kornet, som tidligere udgjorde enten en kemisk eller fysisk barriere, være blevet bortreduceret. Fremavling af afgrøder, som er mere smagfulde og har færre uønskede egenskaber såsom impermeabel eller tyk frøskal, tilstedeværelse af tanniner, protease-hæmmere, lectin m.m., har gjort afgrøderne mere sårbare for bl.a. svampepatogener (Wicklow, 1995). Spelt er en oprindelig kornart, der sandsynligvis er opstået ved en krydsning mellem gedeøje og emmer. Det menes, at almindelig hvede er opstået fra spelt. Spelt adskiller sig morfologisk fra hvede ved et længere strå (op til 180 cm), lange bløde blade, løsere aks samt fastsiddende yderavner, der skal fjernes ved afskalning før anvendelse til konsum. Spelt har et højere indhold af protein, fedt, jern og zink end almindelig hvede. Glutenindholdet er også højere,

men har en anderledes, mere blød struktur. I de senere år har spelt fået fornyet interesse, specielt i økologiske jordbrug. Det menes, at mennesker med allergi over for hvede uden problemer kan fordøje speltprodukter. Der mangler dog undersøgelser herom (Nielsen og Mortensen, 1997; Økologisk rådgivning, 2001).

2.8 Økologisk/konventionel dyrkning af brødkorn

De økologiske foreninger i Norden har tilsluttet sig følgende definition af økologisk jordbrug:

”Med økologisk jordbrug forstås et selv bærende og vedvarende agroøkosystem i god balance. Systemet baseres mest muligt på lokale og fornyelige ressourcer. Økologisk jordbrug bygger på et helhedssyn, som omfatter de økologiske, økonomiske og sociale sider i jordbrugsproduktionen både i lokalt og i globalt perspektiv. I det økologiske jordbrug betragtes naturen således som en helhed med sin egen værdi, og mennesket har et moralsk ansvar for at drive jordbruget, således at kulturlandskabet udgør en positiv del af naturen.” (Kristensen, 2000 s.8)

De mere specifikke krav, der stilles, er beskrevet i Plantedirektoratets Vejledning for økologisk jordbrugsproduktion. For planteproducenterne er det specielt såsæd, gødning og plantebeskyttelsesmidler, der håndteres forskelligt af hhv. økologer og konventionelle jordbrug. For økologerne gælder det, at der skal anvendes økologisk sædefrø¹. Det indebærer, at såsæden ikke må være bejdsset eller gasset, og at der ikke må benyttes genmodificeret udsæd. Vedrørende gødsning må der ikke anvendes handelsgødning (Plantedirektoratet, 2000), (Jørgensen, 2000). Det er tilladt at anvende ikke-økologisk husdyrgødning² både i form af komposteret fast husdyrgødning, gylle og ajle og fra biogasanlæg³, således at andelen udgør 70 kg N pr. hektar (planperioden 2001/2002). Plantebeskyttelse skal foregå uden anvendelse af pesticider⁴. I stedet må der forebygges og bekæmpes ved sortsvalg, sædskifte, mekaniske dyrkningsmetoder, flammebehandling og ved etablering/vedligeholdelse af læhegn m.m. for at beskytte skadevoldernes naturlige fjenders habitater eller ved direkte at udsætte skadevoldernes naturlige fjender (Plantedirektoratet, 2000).

¹ I specielle tilfælde gives der dispensation (Plantedirektoratet, 2000, s.11).

² Husdyrgødning fra ekstensive husdyrbrug og fra husdyrbrug, der ikke er jordløse, er tilladt uden forudgående tilladelse, ved anden form for gødning kan der gives tilladelse efter anerkendelse fra Plantedirektoratet (Plantedirektoratet, 2000, s.14).

³ Der må ikke være iblandet spildevandsslam (Plantedirektoratet, 2000, s.18).

⁴ I særtilfælde kan der efter godkendelse fra Plantedirektoratet gives tilladelse til at anvende specielle plantebeskyttelsesmidler for økologiske arealer, herunder forskellige ekstrakter, mikroorganismer og naturligt forekommende mineraler. Brug af syntetisk fremstillede pesticider er ikke tilladt (Plantedirektoratet, 2000, Tabel 3.6; Kristensen, 2000).

Ud over de nævnte forskelle m.h.t. udsæd, gødning og pesticidanvendelse er der den forskel mellem økologisk og konventionel dyrkning, at de økologiske producenter har flere ”brændpunkter”, hvor kornet har en potentiel risiko for at blive kontamineret med *P. verrucosum*. Et af disse punkter er anvendelsen af egen, ubejdset udsæd, dels fordi det er ubejdset, og dels fordi udsæd fra kornfirmaer ofte er af en bedre kvalitet, eftersom den bliver rensat og sorteret. Herudover er risikoen for lejesæd større hos økologer, idet det ikke er tilladt at anvende vækstregulerende midler (”stråforkortere”) ved økologisk dyrkning. Lejesæd kan føre til et højere vandindhold i kernerne og dermed en øget risiko for svampekontaminering. Sortsvalget er desuden anderledes i økologisk jordbrug sammenlignet med konventionelle. Der findes ingen undersøgelser med sortsvalgets betydning for *P. verrucosum* (Elmholt & Kristensen, 2001), og som tidligere nævnt har forædlingen ikke været fokuseret på sorter med modstandsdygtige egenskaber over for svampe, men der er en tydelig tendens til, at *P. verrucosum* har større forekomst hos nogle arter end andre. Større forekomst af ukrudtsfrø kan under lagring give problemer med fugt, idet urenheder og lette frø samler sig i en tæt bræmme, der forhindrer konvektionen. Endelig er det uvist, hvilken effekt sædskifte har på svampediversiteten og dermed på væksten af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA .

Siden 1986 har Fødevarerdirektoratets OTA-målinger i økologisk og konventionelt korn og mel været en del af direktoratets overvågningssystem. Overvågningen har været foretaget i tre overvågningsperioder, og på baggrund af de tidligere erfaringer har man løbende ændret prøvesammensætningen. Ændringerne har medført, at man nu koncentrerer sig om prøver af de vigtigste afgrøder (hvede og rug) i både hele kerner og mel samt om sammenligningen mellem konventionelle og økologiske produkter. Desuden har man bevæget sig tættere på primærproducenterne ved at udtage kernerne hos møller eller kornfirmaer. Melet bliver dog stadig udtaget i detailledet.

I alle perioder er der en tendens til, at indholdet af OTA er højest og hyppigheden af OTA-forekomster størst i økologiske kerner og mel, specielt i rug. Der skal dog tages forbehold for, at der i de første overvågningsperioder blev taget væsentligt færre prøver af de økologiske produkter end af de konventionelle, hvorfor sammenligningsgrundlaget er usikkert (Jørgensen *et al.*, 1996; Jacobsen & Jørgensen, 1999; Jørgensen *et al.*, 2000; Jørgensen & Jacobsen, 2002).

Fødevarerdirektoratet konkluderer i deres rapport, at årsagen til forskellene mellem økologiske og konventionelle produkter menes at være relateret til tørrings- og lagringsforholdene og ikke til selve dyrkningsformen (Jacobsen & Jørgensen, 1999). Dette begrundes med, at dannelsen af OTA

forekommer efter høst, hvis kornet er for vådt eller ikke tørres tilstrækkeligt ned. Det udelukkes dog ikke, at der kan være eventuelle forskelle i dyrkningsformerne, der kan gøre økologisk dyrket korn mere modtageligt for vækst af *P. verrucosum* og dannelse af OTA. Dannelsen af OTA synes dog at kunne undgås, hvis tørrings- og lagerforhold er optimale (Elmholt, 2003). Elmholt (2003) forklarer, at forskellene kan skyldes, at nogle små, økologiske jordbrug anvender utidssvarende tørringsanlæg. På baggrund af andre nordiske undersøgelser, der sammenligner konventionelle og økologiske produkter mht. mykotoksinerne DON og aflatoxin M₁ i fødevarer, fandt Jørgensen *et al.* (2000), at *”der ikke synes at være principielle forskelle i økologisk/biodynamisk og konventionelt producerede fødevarer med hensyn til indhold af mykotoksiner”* (Jørgensen *et al.*, 2000, s. 38)

2.9 Forebyggelse

Der er forskellige strategier til at undgå dannelsen af OTA. Primært er der forebyggelse mod og nedsættelse af vækst af *P. verrucosum*. Faktorer, som influerer på væksten af *P. verrucosum*, specielt vandaktivitet og temperatur, kan kontrolleres under håndteringen af primærprodukterne ved landmandspraksis eller ved anvendelse af mere specialiseret måleudstyr. Pixton (1982) skærper opmærksomheden om udtagningsprocedurerne. Udtagning af prøver til vandbestemmelse er problematisk, skriver han, og estimerne skal behandles med megen forsigtighed. Der vil aldrig være en jævn fordeling af fugt og varme i et lager, og det vil altid være den højeste værdi, der fortæller, hvor ”sikkert” lageret er.

For generel forebyggelse mod mykotoksindannelse anbefaler Marquardt & Ronald (1996), at man også i marken skal forebygge ved bl.a. at undgå spild af korn, således at inokulum-potentialet reduceres til næste års afgrøde. Desuden anbefaler han sædskifte for at nedsætte overførsel af sygdomme, og endelig er muligheden for at udvikle afgrøder, som er resistente over for svampeinfektioner, en løsning på langt sigt.

Endelig er der en række procedurer, der kan anvendes, når kornet er blevet kontamineret med OTA. Kornet kan anvendes udelukkende til fodring af køer, eller der kan tilføres vitamin C i kosten for at nedsætte den toksiske effekt (Marquardt & Frohlich, 1992). Tilførsel af diverse antimikrobielle midler og bestråling er dog metoder, som ikke stemmer overens med den økologiske målsætning, og som derfor ikke er anvendelige i den økologiske driftsform.

På baggrund af den tredje, internationale konference med FAO/WHO/UNP, om mykotoksiner findes, at der er et klart behov for konsensus både med hensyn til risikovurdering og procedurerne, der anvendes til fastsættelse af grænseværdierne. Walker (1999), der fremlægger ochratoksin-

problematikken på konferencen, skriver, at cerealier er den primære kilde til optagelse af OTA, og at produkter som rosiner og krydderier har så høje værdier af OTA, at der burde gribes ind over for produktionen og lagringsfaciliteterne. For at beskytte menneskets velfærd sker dette bedst ved forebyggelse og årsagsbekæmpelse, dvs. ved at minimere kontaminering med OTA-producerende svampe og betingelserne, der giver ophav til produktion af toksinet. Han anbefaler et program, der har til formål at identificere og kontrollere årsagerne til kontaminationen. (Walker, 1999).

3. Delprojekt I: Monitoringsprojekt i økologisk landbrug

Formålet med monitoringsprojektet var at uddybe tidligere undersøgelser af et økologisk landbrug med henblik på at finde årsager til forurening med *P. verrucosum*.

3.1 Baggrund for forsøgsopstilling

3.1.1 Lokalitet

Prøverne blev udtaget på et deltidsladbrug 15 km nord for Ribe. Gården blev omlagt i 1989 og har været drevet økologisk siden. Den har 19 ha i rotation. Området er karakteriseret ved sandede jorde (Elmholt, 2003). Prøveudtagningerne blev foretaget af kornhøsten i efteråret 2000 og efterfulgt året efter med udtagninger fra høsten 2001.

3.1.2 Tørringsfaciliteter

Lagring af kornet foregår på et lagertørringsanlæg/plantørringsanlæg. Kornet ligger direkte på betongulv og oven på tørringsanlæggets sidekanaler (billede 3.1.1). Tørringen foregår ved, at der via hovedkanalen blæses luft ud gennem sidekanalerne, hvorved luften blæses op gennem kornet.



Billede 3.1.1 Oversigt over plantørringsanlæg med hovedkanal og sidekanaler samt bund af sidekanal

Tørringsanlægget bestod i år 2000 af en hjemmegjort hovedkanal med tilhørende sidekanaler. Hovedkanalen er bygget af spånplader med plastbeklædt inderside. Sidekanalerne er sat sammen af

brædder og en bund af masonit med større og mindre huller. Alle sidekanalerne er beklædt med hessian- eller kunsthessiansække, hvoraf de ældste har været anvendt i op til 20 år. Hessianet tages ikke af ved rengøring, men udskiftes når det ”falder fra hinanden”.

Plantørringsanlæggets dimensioner er ca. 20 meter i længden, ca. 4,5 m i bredden og 2 m i højden. Sidekanalerne er dimensioneret således, at hver sidekanal er 376 cm lang, 22 cm bred og 24 cm høj og hævet ca. 9 cm over gulvet. Centerafstanden er 80 cm (afstanden fra midte til midte af sidekanalerne).

I år 2001 er de gamle sidekanaler, på nær 2, der er blevet vasket og beklædt med nyt kunsthessian, udskiftet med nye metalbuer af typen G500. Den første halve meter af alle sidekanalerne er dog bevaret grundet tilpasningsproblemer til den oprindelige hovedkanal.

Blæseren er fra J.C. Løkkes Maskinfabrik, en model ”Superheat” med en kapacitet på 7,5 kW.

3.1.3 Prøvetagningsåret 2000

Vejrforholdene i vækståret 1999–2000 var karakteriseret af en mild vinter med meget regn og et forår meget varmere end gennemsnittet, mens sommeren var noget koldere og med mindre nedbør end gennemsnitligt. Lokalt i området omkring den observerede bedrift var sommermånederne klimatisk stort set som i resten af landet. Det var lidt koldere og med mindre nedbør bortset fra i juni, hvor nedbørsmængden var 33 mm højere end landsgennemsnittet (tabel 3.1.1) (Sørensen, *et al.*, 2000).

Tabel 3.1.1 Klimaværdier fra Danmark, Sønderjylland og gridelement 29¹⁾

	Gennemsnit			2000				2001			
	Temperatur	Nedbør		Temperatur		Nedbør		Temperatur		Nedbør	
	normal °C	Danmark mm	S.Jylland mm	Danmark °C	Grid 29 °C	Danmark mm	Grid 29 mm	Danmark °C	Grid 29 °C	Danmark mm	Grid 29 mm
Juni	14,3	55	62	13,7	13,1	53	86	12,8	12,4	62	64
Juli	15,6	66	75	14,9	14,5	42	40	17,5	16,9	47	67
August	15,6	67	76	15,2	14,6	48	46	17,0	16,6	91	104

¹⁾Data fra Danmarks JordbrugsForskning (http://130.226.243.190/vejr/get_grid.html). Gennemsnitsværdier og værdier for de to prøvetagningsår. Gridelement 29 dækker lokalområdet for den observerede bedrift.

Høstforholdene var ikke optimale. August var præget af mange byger, der gav afbrydelser i høsten. På den observerede bedrift blev rugen (Dominator) høstet den 23. august og havren (Petra) den 27. august. Udsæden, der er typiske, økologiske sorter (Priesholm, rådgiver v. Økologisk Landsforening, pers. medd.), var indkøbt og sået hhv. 1. november 1999 og 20. april 2000. Forfrugten for rugen og havren var henholdsvis havre og ærter.

Der blev i alt høstet 13,6 tons rug og 17,6 tons havre. Transporten fra korngrav til planlageret foregik ved hjælp af en lodret snegl tilsluttet en aspiratør og et vandret sneglesystem. Tørringen foregik uden varmetilførsel, eftersom avleren vurderede, at vejrforholdene var udmærkede til tørringen. Blæseren var ude af drift i 7 dage fra d. 10. september til d. 17. september. Rugen lå lagret i en højde på mellem 45 og 60 cm placeret længst væk fra blæseren, mens højden i havren, der var placeret tættest på blæseren, var mellem 110 og 125 cm. På baggrund af analyser foretaget ved møllen havde rugen og havren et vandindhold på henholdsvis 16-17% og 14-16% (bedriftslederen, pers. komm.).

3.1.4 Prøvetagningsåret 2001

I vækståret 2000-2001 var vinteren mild med nedbør omkring normalen. Foråret var præget af en mild og solrig maj, men en kold og våd juni måned. Juli var lun og solrig med meget mindre nedbør end normalen, mens august var præget af mange tordenbyger. På landsplan var nedbørsmængden 24 mm højere end normalt, og temperaturen var 1,3 °C over normalen. Området omkring den observerede bedrift var i særdeleshed påvirket af en stor nedbørsmængde: 104 mm faldt der i august, hvilket er 37 mm over normalen (tabel 3.1.1). Bygerne besværliggjorde høsten, og mange steder var kornet ikke høstet ved udgangen af august (Sørensen og Thysen, 2001). Rugmarken blev sået den 23. oktober 2000 og havremarken den 5. maj 2001. Til udsæd anvendtes indkøbt Dominator (rug) og Revisor (havre). Der blev anvendt samme rugsort som året før, mens havren var en ny sort.

Rugen blev høstet den 12. september. Havren blev høstet i to omgange, første gang den 24. august og anden gang den 6. september. Forfrugten for rug var byg og ært i helsæd, mens der var kløvergræs før havren. Der blev i alt høstet 22,9 tons havre. Rugmængden er ikke opgivet af landmanden. Ved lagring var placeringen af rug og havre ændret fra det foregående år. Rugen lå tættest på blæseren, mens havren var placeret længst væk. Rugen var lagret i en højde på mellem 83 og 88 cm og havren i en højde på mellem 95 og 115 cm. Sidekanalerne ind til rugen var blokerede, idet landmanden mente, at rugen ikke behøvede yderligere nedtørring. Tørringen foregik med varmetilførsel, hvorved temperaturen blev hævet ca. 4°C i forhold til udetemperaturen. Der blev blæst med varmetilførsel i havren ca. 12 dage.

3.2 Materialer og metoder

3.2.1 Prøvetagningsprocedure

Prøvetagningsproceduren er udarbejdet på baggrund af Plantedirektoratets retningslinier for prøveudtagning af frøpartier (Plantedirektoratet, Pedersen, D.V., pers. medd.).

Som prøvetagningsinstrument anvendtes på anbefaling af Dot Pedersen, Plantedirektoratet, et prøvetagningsspyd også kaldet en kanalsøger (Rationel Kornservice, Gammelby Møllevej 4, 6700 Esbjerg). Prøvetagningsspyddet består af to 2 m lange, omkring 3 cm i diameter, metalrør, som er indskudt i hinanden og lukket i den nedre ende. Igennem begge rør er der på den ene side en række huller. Hullerne er placeret forskudt i det inderste rør således, at spyddet ved prøveudtagning fyldes nedefra.

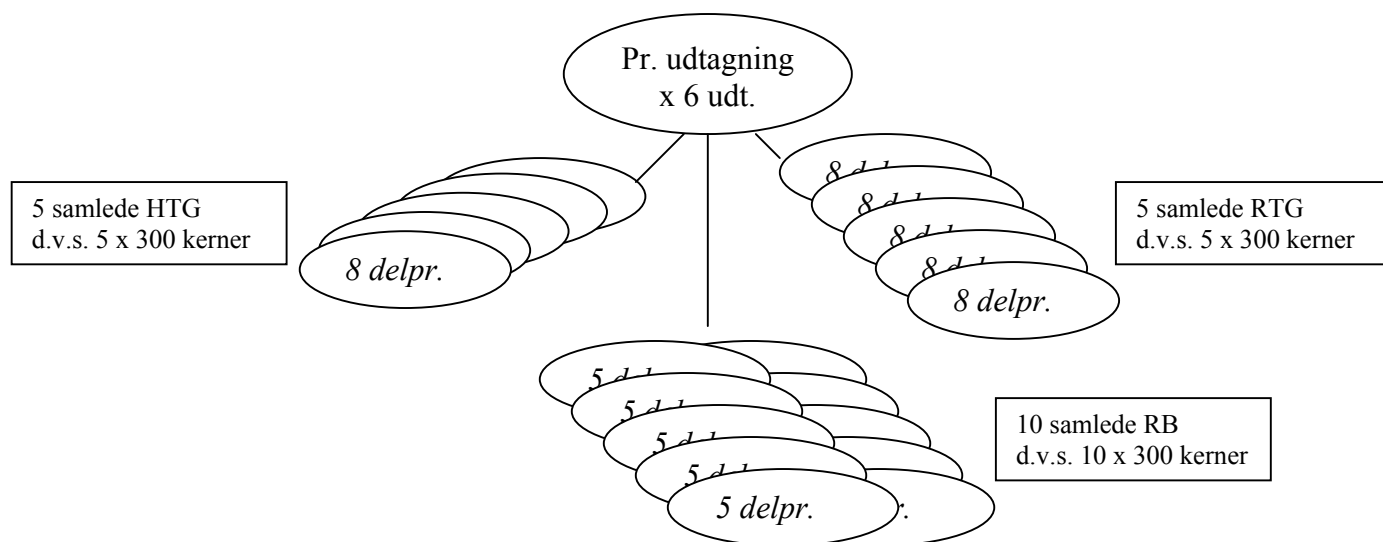
Ved prøveudtagning føres spyddet ned i kornet, det åbnes ved at dreje inderrøret og fyldes ved, at korn fra de respektive dybder løber ind i røret. Herefter lukkes røret igen ved at dreje inderrøret, nu i modsat retning. Prøvetagningsspyddet tømmes ved at kipse røret, således at kornet løber ud i øvre ende af spyddet og ned i en pose eller spand. Før hver prøveudtagning blev spyddet vasket og afsprittet.

Pr. definition udgør hvert hul i prøvetagningsspyddet en ”primærprøve” (p.p.), d.v.s., at prøvetagningsspyddet udtager 8 p.p., forudsat at alle 8 huller er nede i kornmaterialet ved hvert prøvetagningsstik. Ifølge retningslinierne skal der som minimum udtages 40 såkaldte primærprøver fra partier med over 20 ton (appendiks 2.1). Primærprøverne skal udtages forskellige steder i partiet og samles i en fælles prøve, der siden neddeles til en arbejdsprøve, hvorudfra analyserne foretages. Ud fra en vurdering af, at der ca. var 20 ton rug henholdsvis havre i lageret, skulle der min. udtages 5 prøvetagningsstik (delprøver) med 8 huller for hvert stik ($8 \text{ huller} \times 5 = 40 \text{ p.p.}$) for både havre og rug.

Den endelige udtagningsprocedure beskrives detaljeret i nedenstående afsnit. Antallet af primærprøver er brugt som udgangspunkt, men begrebet er ikke anvendt videre, idet definitionen af primærprøver findes problematisk. Det vurderedes, at f.eks. 8 primærprøver fra et prøvetagningsstik ikke er uafhængige på samme vis, som primærprøver fra 8 forskellige prøvetagningsstik. Prøver fra et prøvetagningsstik benævnes her som én delprøve.

I år 2000 blev der 6 gange fordelt over en lagringsperiode på 68 dage udtaget 130 delprøver (90 fra rugen og 40 fra havren). D.v.s. i alt 780 delprøver. Delprøverne blev samlet til 20 prøver pr.

udtagninggang. Herved fremkom i alt 120 samlede prøver (figur 3.2.1 og tabel 3.2.1). Fra hver samlede prøve analyseredes 300 kerner for kontaminering af *P. verrucosum*. D.v.s., at der i alt blev analyseret 36.000 kerner.



Figur 3.2.1 Flowskema over antal prøver pr. udtagning

Tabel 3.2.1 Udtagningstidspunkter og antal prøver fra høståret 2000

	1.udtagning	2.udtagning	3.udtagning	4.udtagning	5.udtagning	6.udtagning
Dato	29.august	11.september	21.september	3.oktober	25.oktober	13.november
RUG (høstet 23. aug.) Udtaget antal dage efter høst	6	19	29	41	63	74
HAVRE (høstet 27. aug.) Udtaget antal dage efter høst	2	15	25	37	59	70
Interval til sidste udtagning	-	13	10	12	22	11
Antal delprøver	130	130	130	130	130	130
Samlede prøver	20	20	20	20	20	20

I år 2001 blev der udtaget færre prøver. To gange fordelt over en periode på 69 dage blev der udtaget 72 delprøver. D.v.s. i alt 144 delprøver svarende til 24 samlede prøver. Fra hver samlede prøve analyseredes igen 300 kerner for kontaminering af *P. verrucosum*. Hermed analyseredes 7.200 kerner i år 2001. Udtagningerne begrænsedes til 2 prøveudtagningssange, én ved starten af lagringsperioden og én kort tid før kornet blev solgt (tabel 3.2.2).

Tabel 3.2.2 Udtagningstidspunkter og antal prøver fra høståret 2001

	1. udtagning	2. udtagning
Dato	16. september	24. november
RUG (høstet 12. sep.) Udtaget antal dage efter høst	4	73
HAVRE (høstet 24. aug.) Udtaget Antal dage efter høst	23 (10)*	92 (79)*
Interval til sidste udtagning	-	69
Antal delprøver	72	72
Samlede prøver	12	12

**Havren år 2001 blev høstet af to omgange. Derfor er der to angivelser for antal dage efter høst ved første og anden udtagning. I figurerne er antallet af dage efter høst beregnet ud fra første høsttidspunkt.*

Udtagningerne foregik i 2 forskellige niveauer, et niveau i den øverste del af kornlageret ml. 46 og 82 cm over gulvniveau i alt et lag spændende over 36 cm, hvor de såkaldte ”top-gennemsnitsprøver” (HTG og RTG for hhv. havre og rug) blev udtaget, og et niveau i den nederste del af lageret ml. 13 og 24 cm. over gulvniveau i alt et lag på 11 cm, de såkaldte ”bundprøver” (RB og HB for hhv. rug og havre).

Top-gennemsnitsprøverne i rugen og havren (RTG og HTG)

For hver kornart blev der valgt 5 tilfældige sidekanaler. Ved brug af prøvetagningsspyddet blev der ovenpå hver af sidekanalerne udtaget 8 uafhængige delprøver (8 stik) med lige stor afstand imellem (42 cm) (billede 3.2.1). Spyddet er forsynet med 8 huller. Ved top-gennemsnitsprøverne var kun de tre nederste huller åbne. De resterende huller blev tapet til for at kunne sammenligne rug og havre, som var lagret i to forskellige dybder. De 8 delprøver blev blandet til én samlet prøve fra hver sidekanal. Herved blev der udtaget 5 samlede prøver fra hhv. rug og havre for hver udtagningsgang. Prøverne blev opbevaret i en CRYOVAC-pose 19 x 35 cm (Hestbech, Stenstrup-Jensen, Hvidkærvej 52, Postboks 105, 5250 Odense SV) og herefter yderligere i en papirpose. Under transporten blev prøverne opbevaret i bilen ved rumtemperatur. Prøverne blev herefter opbevaret i kølerum ved 2°C.



Billede 3.2.1 Prøvetagning, top-gennemsnitsprøver (HTG og RTG)

Grundet dybden på ruglageret blev de tre huller ikke helt udfyldt, men kun et eller to huller. Herved medtages en del af overfladelaget i prøverne fra rugen, hvilket ikke er tilfældet for havren. Mængden af udtagne kerner pr. prøve er dog højere for rugen end for havren p.g.a. dens højere volumenvægt og evne til nemmere at løbe ind i kornspyddet. Havren er knapt så "fritløbende" bl.a. p.g.a. dens avner. Således var antallet af kerner pr. prøve større i rugen end i havren.

Bundprøver i rugen (RB).

Ved brug af prøvetagningsspyddet blev der langs hver side af de 5 udvalgte sidekanaler i rugen taget 5 uafhængige delprøver ved at stikke med 62 cm mellemrum. Her var kun det nederste hul på prøvetagningsspyddet åbent. De 5 delprøver samledes til én prøve. Således fremkom der 2 samlede prøver for hver sidekanal, én fra hver side. Herved blev der udtaget 10 samlede bundprøver fra rugen for hver udtagningsgang.

Prøverne blev opbevaret i CRYOVAC- pose og herefter i papirpose, ligeledes ved 2°C (billede 3.2.2).



Billede 3.2.2 Prøvetagning, bundprøver (RB)

3.2.2 Proceduren for prøveudtagning i år 2001

Proceduren for prøveudtagning i år 2001 svarede til proceduren fra år 2000 m. h. t. antal delprøver pr. sidekanal for bundprøver og top-gennemsnitsprøver. Ud fra en vurdering af resultaterne fra år 2000 blev sidekanal 4 og 6 udvalgt i havren. Rugen lå primært henover sidekanal 23 og 24, som ikke havde været anvendt året før. Prøverne blev opbevaret i et andet kølerum end året før, men ligeledes ved 2°C.

Analyserne af kornprøverne fra år 2000 blev udført mellem 13.09.2000 og 24.12.2000, mens analyserne af prøverne fra år 2001 blev foretaget i perioden 11.01.2002 og 21.01.2002 (appendiks 2.2 og 2.3).

3.3 Analysemetoder

3.3.1 Mikrobiologisk analysemetode for *P. verrucosum*

Kornprøverne blev screenet for kontaminering med *P. verrucosum* ved direkte udlægning. Metoden er beskrevet i metodeafsnit 2.2.2. Fra hver kornprøve blev der udlagt 300 kerner på DYSG. I gennemsnit gik der henholdsvis 62 og 102 dage fra prøverne blev udtaget, til de blev lagt ud i år 2000 og år 2001 (min. 16 dg. og max. 149 dg.) (appendiks 2.2 og 2.3).

3.3.2 Statistik for data fra år 2000

I den statistiske analyse undersøges datasættene fra år 2000 ved test i binomialfordelingsmodellen, normalfordelingsmodellen og ud fra den grafiske fremstilling af modellerne. SAS-udskrifterne er vedlagt som appendiks 2.13.

Datasættet antages at være binomialfordelt $\chi \sim b(300, p)$. Procentværdierne (p) (app. 2.4 og SAS-udskrift appendiks 2.13) henviser til optællingen af antal kontaminerede kerner ud af 300 kerner/prøve. Procentværdierne omregnes til logitværdier ($\text{logit} = \log(p/(1-p))$) for at kunne anvendes i additivitetsmodellen. Desuden transformeres værdierne yderligere ved hjælp af en anvendt ligning ($x = \arcsin(\sqrt{p})$) for også at kunne anvendes i en model baseret på normalfordelingen. Denne transformation af data foretages, da der for nogle af prøverne kun er få observerede antal kontaminerede kerner.

Dataopstilling

Data for RTG (rug 1) og data for HTG (havre) karakteriseres ved kanal (positionen for top-gennemsnitsprøverne) og udtagning (udtagningstidspunkt). (Værdierne ses i SAS-udskrifterne, app. 2.13, side 1-2).

Tredje datasæt er for RB (rug 2). Værdierne karakteriseres ligeledes ved position (bundprøvernes position) og udtagning (udtagningstidspunkt), desuden angives det, hvilke positioner der hører til hvilke sidekanaler. Eksempelvis tilhører pos. 1 og pos. 2 sidekanal 3. Værdierne bliver transformeret og behandlet på samme måde som rug 1 og havre. (SAS side 3-4)

Endelig opstilles et datasæt for de samlede rugdata (rug 3) (SAS side 31-32). Her sættes rug 1-værdierne ind mellem rug 2-værdierne, således at værdierne kommer fortløbende: sidekanal, bund mellem sidekanaler, sidekanal, bund mellem sidekanaler o.s.v. Værdierne er omregnet og transformeret på samme vis som de øvrige datasæt.

Den grafiske kontrol af modellerne angives ved hjælp af plot. I nogle af plottene mangler der punkter. Det skyldes, at nogle værdier i datasættene er 0. Log-værdierne er derfor ikke-eksisterende.

Modeltest

Datasættene testes i modellen for additivitet i binomialfordelingen. Konklusionerne fra additivitetsmodellen i binomialfordelingen kontrolleres senere i en tosidet henholdsvis tresidet variansanalyse baseret på normalfordelingen. Til undersøgelse af om værdierne beskriver en normalfordeling, foretages en probitanalyse.

Det viser sig i tilfældet for rug 1- og rug 2-datasættet, at modellen for additivitet i binomialfordelingen ikke er valid (SAS side 5-6 og 9-10). Eksempelvis er værdien for rug 1 (1,7374) højere end den i tabel angivne ($\chi^2_{.95}(20)/20 = 1,5705$). Årsagen kan være, at nogle af data-værdierne er små. Med disse forbehold fortsættes dog med at anvende modellen.

Ud fra fraktildiagrammerne (plot 9 for rug 1, plot 12 for havre og plot 25 for rug 3) kan det konkluderes, at der ikke findes grund til at betvivle normalfordelingsmodellen.

Datasæt for RTG (rug 1)

Datasættet undersøges for betydningen af forskellige sidekanaler og udtagningstidspunkter.

Ud fra additivitetsmodellen i binomialfordelingen testes der, om sidekanalerne har samme virkning uanset udtagningstidspunkt eller modsat, om udtagningstidspunktet har samme betydning uanset sidekanal. Med andre ord undersøges der, om det gælder, at der er samme virkning af en faktor

uanset niveauet af en anden. Herefter kontrolleres resultaterne i en variansanalyse baseret på normalfordelingen (SAS side 6).

Datasæt for HTG (havre)

Havre-data behandles på samme måde som data fra rug, top-gennemsnitsprøver. De testes ligeledes i en additivitetsmodel i binomialfordelingen og for henholdsvis kanalernes og udtagningens indflydelse (SAS side 7-8) samt i normalfordelingsmodellen.

Datasæt for RB (rug 2)

Testene anvendes endelig på rug 2-datasættet, og proceduren gentages (SAS side 9-10, plot 5-6).

Datasæt for RTG og RB (rug 3)

I det følgende testes det samlede datasæt for rug (rug 3) i en normalfordelingsmodel. Det undersøges, om det er af betydning, fra hvilket kanalsystem prøverne er blevet taget, og om udtagningstidspunkt, position og kanal har haft en indflydelse. Et kanalsystem betragtes her som prøverne taget omkring en specifik sidekanal, dvs. ovenpå og langs med begge sider i bunden f.eks. pos.1 - sidekanal 3 - pos.2 (SAS side 31-46).

Endvidere er data trukket ud for hvert kanalsystem. Herved fremkommer et mere tydeligt billede af de enkelte kanalsystemer. Der testes for, hvorvidt det er position eller udtag, der har betydning for de enkelte kanalsystemer.

I plot 15-24 kan de grafiske udtryk for hvert kanalsystem vurderes. Her er de transformerede værdier afbildet op ad y-aksen, mens der ud ad x-aksen henholdsvis afbildes position og udtag.

Forskelle mellem rug og havre samt vekselvirkning mellem udtagning og art

Dels undersøges betydningen af art, dvs., hvorvidt arten har nogen betydning for kontamineringsprocenten. Dels undersøges betydningen af kanal og udtagning samt vekselvirkningen mellem udtagning og art (SAS side 19-24). Datasæt for RTG (rug 1) og for HTG (havre) anvendes, idet disse er ensartede med hensyn til udtagningsmetode.

Her testes først i en tresidet variansanalyse i normalfordelingen, hvorefter der foretages et tjek af de foregående modeller, idet datasættet testes i en binomialfordelingsmodel (SAS side 25-30).

3.3.3 Statistik for data fra år 2001

Datasæt for år 2001 indeholder ikke observationer nok til, at de statistiske modeller er anvendelige og kan kontrolleres.

3.3.4 Vandbestemmelsesanalyse

På grund af en nivellering af år 2000-prøvernes vandindhold med kølerummets luftfugtighed blev der ikke bestemt vandindhold af rugkernerne fra år 2000. Havreprøverne blev bestemt ved brug af retningslinierne beskrevet i metodeafsnit 2.2.9.

3.3.5 Ochratoksin A-analyse

Analyserne blev foretaget af Peter Have Rasmussen, Fødevaredirektoratet, ved brug af retningslinier som beskrevet i metodeafsnit 2.2.5.

OTA-analyser blev foretaget på RB og RTG ved 5. udtagning (63 dage efter høst) år 2000, i HTG ligeledes ved 5. udtagning (59 dage efter høst) år 2000. Desuden blev der foretaget OTA-analyser i RTG for to sidekanaler ved 1.-5. udtagning år 2000 for at danne et tidsforløbsstudie. Desuden blev der foretaget analyser af RB, RTG og HTG i prøverne fra år 2001 fra sidste udtagning (henholdsvis 73 dage (rug) og 92 el. 79 dage efter høst (havre)).

3.3.6 Luftanalyser

Luftanalyser blev foretaget som små delforsøg. Dels blev luftstrømmen op gennem kornet analyseret, og dels blev luften inde i hovedkanalen og sidekanalerne undersøgt. Ved et for-forsøg under første prøveudtagning (29.08.2000) blev der opstillet enkelte agarskåle i hovedkanalen (5 min.) oven på kornet (10-80 min.) og i lagerrummet (3 timer) for at se, om svampesporer fandtes her. Til alle prøverne blev der anvendt DYSG-agar. Før forsøgsdelen blev stillet op, blev der af sikkerhedsmæssige grunde blæst i 5 min.

Luften i hovedkanalen og sidekanalerne blev undersøgt både år 2000 og år 2001. Analyserne foregik, mens blæseren var tændt i 3 min. Det var kun kanaler dækket af rug, som blev undersøgt. For at DYSG-skålene ikke skulle blæse væk, blev de sat fast på mursten med klæbepuder. I hovedkanalen blev der sat to mursten med hver to DYSG-skåle før og efter sidekanal nr. 3,4,5 og 6 (billede 3.3.1 og 3.3.2).



Billede 3.3.1 DYSG-agar gjort klar til at blive sat ind i sidekanal



Billede 3.3.2 Luftprøver i hovedkanal

I sidekanalerne placeredes murstenene en armslængde inde, 2 og 2 efter hinanden. Lågene på DYSG-skålene fjernedes, umiddelbart før blæseren blev sat i gang, og skålene blev dækket til igen, efter blæseren tre min. senere var blevet slukket.

DYSG-skålene blev opbevaret i inkuberingsposer og inkuberet ved 25°C i 5 dage. Skålene blev ikke opgjort med antal cfu (colony forming units), men blev fotograferet for at give et indtryk af infestationsniveauet.

3.3.7 Pilotpladespredning af hessian

Pilotpladespredningen blev foretaget som et delforsøg med det formål at undersøge om hessianet, som beklædte sidekanalerne, kunne være kilde til forurening med *P. verrucosum*.

Fem sidekanaler blev udvalgt, fire hessianbeklædte kanaler og en kunsthessianbeklædt kanal. De fire hessianbeklædte kanaler har henholdsvis været dækket af rug og havre. Disse var udvalgt efter, hvor høj kontamineringen havde været i kornprøverne. Kunsthessianet har været dækket med rug. Hessianstykkerne blev klippet på tilfældigt udvalgte steder, efter at kornlageret var tømt.

Forskriften for isolering af mikrosvampe ved pladespredning, beskrevet i metodeafsnit 2.2.3, blev benyttet ved pladespredningen. Undtaget herfra er substratfremstillingen, hvor der er anvendt hessian i stedet for jord. DYSG-agar er anvendt som substrat.

Hessiansubstratfremstillingen foregik ved homogenisering på en ”stomacher”. Fem gram klippet hessian + 100 ml. postevand afvejes og overføres til en stomacherpose (code: 174538, lot.nr. E1197A AA). Homogenisering sker af to gange 60 sek. ved normal speed. Hessianstykkerne sies fra, og suspensionen hældes på 100ml. ”blue cap”-flasker og rystes på rystemaskine i 30 min. ved lav hastighed. Herefter følges forskriften med decimalfortyndingsrække, udpladning og inkubering.

3.4 Resultater

I det følgende gennemgås resultaterne henholdsvis for den mikrobiologiske analyse, målingerne af vandindholdet, OTA-analyserne, luftanalyserne og hessiananalysen.

RTG er det gennemgående datasæt til illustration af resultaterne. For at undgå gentagelse er figurerne fra RB og HTG vedlagt som appendiks.

Standard error of the mean (SEM = Std afv./kv.rod (n)) er anvendt i figurerne, idet dette usikkerhedsmål tager højde for, at antallet af prøver i bl.a. rug- og havredatasættene er forskelligt (Elmholt, pers. komm; <http://davidmlane.com/hyperstat/>)

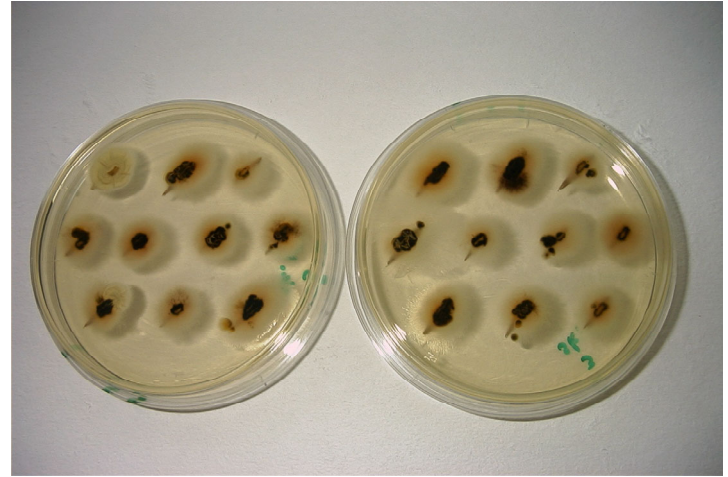
Havren år 2001 blev høstet af to omgange. Derfor er der to angivelser for antal dage efter høst ved første og anden udtagning. I figurerne er antallet af dage efter høst dog beregnet ud fra første høsttidspunkt.

3.4.1 Kontaminering med *P. verrucosum* år 2000

Resultaterne for år 2000 viser, at der var 116 positive prøver (96,6%) (appendiks 2.4). Samtlige rugprøver var kontaminerede, mens der i havre, top-gennemsnitsprøverne, var 4 prøver (13,3% af havreprøverne) uden tilstedeværelse af *P. verrucosum*. I det følgende vil resultaterne fra den mikrobiologiske analyse for hvert datasæt blive præsenteret i sammenhæng med resultaterne fra statistikanalyserne, udpluk er vist ved billede 3.4.1-3.4.4.



Billede 3.4.1 Første prøveudtagning år 2000 (29.08.2000), HTG sk. 16, forside



Billede 3.4.2 Første prøveudtagning år 2000 (29.08.2000), HTG sk. 16, reversside



Billede 3.4.3 Sjette prøveudtagning år 2000 (13.11.2000), RTG sk.6, forside

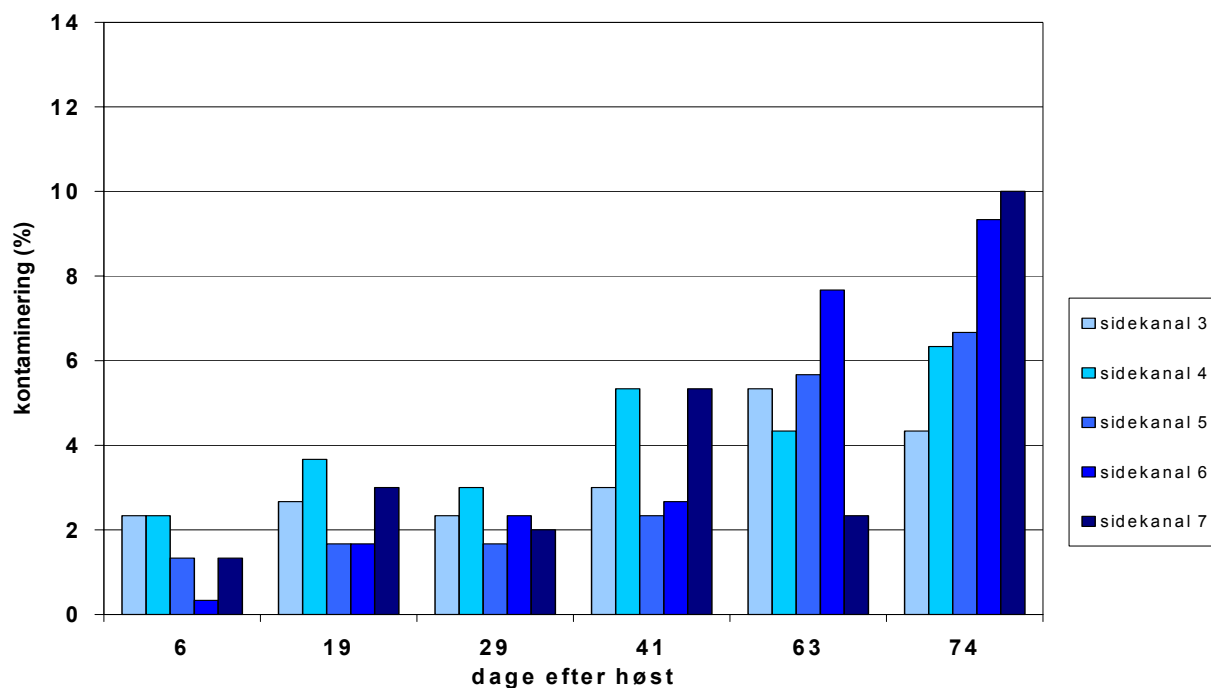


Billede 3.4.4 Sjette prøveudtagning år 2000 (13.11.2000), RTG sk.6, reversside

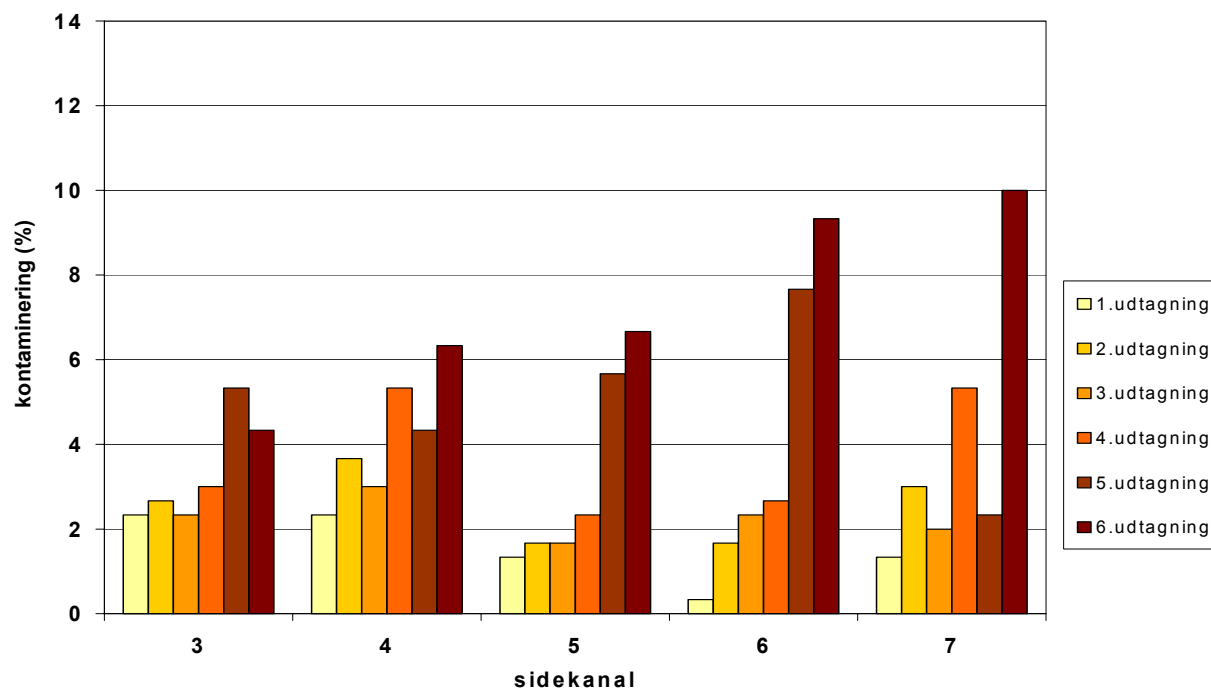
Datasæt for rug, top-gennemsnitsprøver (RTG)

RTG (rug 1 i SAS-udskriften) viser kontamineringsprocenter fra 0,3 % til 10,0 % og en middelværdi på 3,7 % (appendiks 2.4 og 2.6).

I figur 3.4.1A og B er datasættet for RTG illustreret. Resultaterne viser udviklingen i kontamineringen af kerner med *P. verrucosum* i forhold til tid og udvikling for hver sidekanal. I figur 3.4.2A og B er middelværdierne for RTG illustreret tilsvarende. Udviklingen i løbet af lagringen viser, at der er en markant højere kontamineringsgrad i slutningen af forløbet end i begyndelsen.

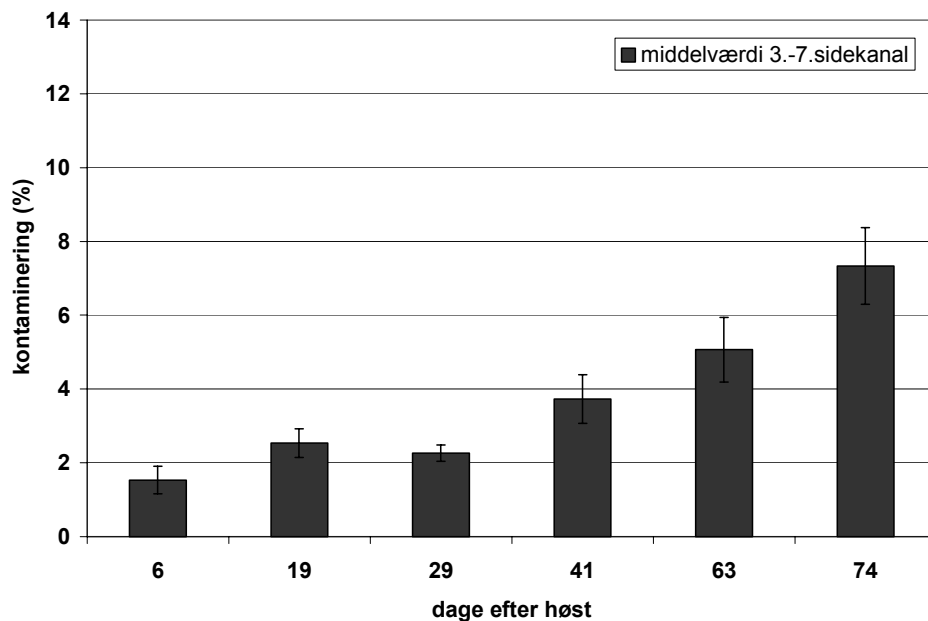


Figur 3.4.1A

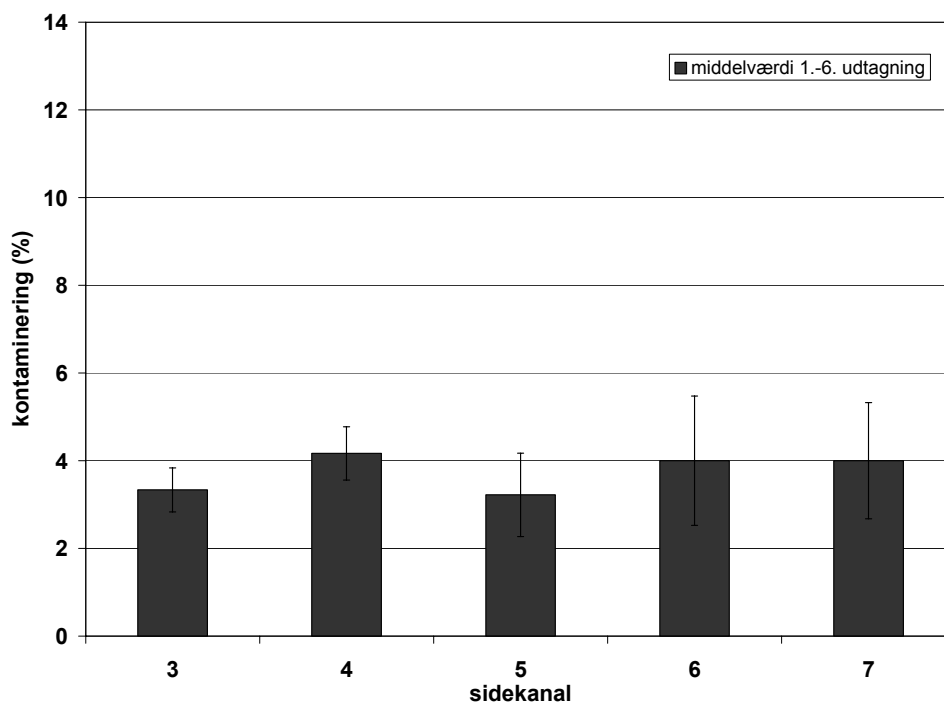


Figur 3.4.1B

Figur 3.4.1: Samlet datasæt for RTG år 2000. Resultaterne viser udvikling i kontaminering af kerner med *P. verrucosum*. (A): Kontaminering i forhold til tidspunkt efter høst. (B): Kontaminering i forhold til hver sidekanal. Resultaterne er angivet som kontaminerede kerner i procent af udlagte kerner ($n = 300$).



Figur 3.4.2A



Figur 3.4.2B

Figur 3.4.2 Middelværdier år 2000 beregnet ud fra datasættet RTG (Figur 3.4.1), d.v.s. middelværdier, der viser udvikling i kontaminering af kerner med *P. verrucosum*. (A): Middelværdi af alle prøverne fra sidekanalerne for hvert udtagningstidspunkt efter høst (middel, \pm SEM, $n = 5$ sidekanaler). (B): Middelværdi af prøverne fra tidsperioden 1.-6. udtagning (68 dage) for hver sidekanal (middel, \pm SEM, $n = 6$ udtagninger).

I den statistiske analyse i modellen for additivitet i binomialfordelingen viser χ^2 -testen, at virkningen af kanalerne kan "testes væk", idet testsandsynligheden er større end 0,05, mens virkningen af udtagningerne ikke kan testes væk, eftersom testsandsynligheden er mindre end 0,05. Slutmodellen for data i rug 1 er således en model, hvor det gælder, at kontamineringen af prøverne afhænger af udtagning, men ikke af sidekanal.

I den grafiske fremstilling, plot 1, "RUG 1 binomial", er logit-værdierne ud ad y-aksen, og udtagene er ud ad x-aksen (SAS-udskrifterne, app.2.13). Kurverne viser forløbet for hver af sidekanalerne (udvikling fra venstre mod højre). I plot 2, "RUG 1 binomial", er der byttet om på rækker og kolonner, således at sidekanal er ud ad x-aksen, og kurverne illustrerer udviklingen for hver udtagning (udvikling nedefra og op). Som test af additivitetsmodellen skal kurverne forløbe parallelt. Ud fra slutmodellen bør kurverne for kanalerne (plot 1) nu kunne opfattes som parallelle, mens kurverne for udtag (plot 2) ikke er parallelle. Dette vurderes at være bekræftet, og dermed er modellen verificeret.

Ved test i normalfordelingsmodellen bliver resultaterne som tidligere, at kanalerne kan testes ud, mens udtagningerne ikke kan (SAS side 12-14). Dette bekræftes i den grafiske fremstilling baseret på normalfordelingen (plot 7-8, "RUG 1 NORMAL"). Det er hermed konfirmeret, at udtagning har betydning. *Slutmodellen for data i rug 1 er da en model, hvor det gælder, at kontamineringen af prøverne afhænger af udtagning, men ikke af sidekanal.*

Det betyder, at kanalerne ingen indflydelse har for prøverne og dermed, at det er underordnet, om sidekanalerne er beklædt med hessian eller kunsthessian, hvorimod udtagningstidspunktet har en betydning.

Datasæt for havre, top-gennemsnitsprøver (HTG)

Generelt havde havreprøverne lave kontamineringsprocenter fra 0,0-3,3%. Middelværdien er på 1,1% (appendiks 2.4 og 2.6). Appendiks 2.9, figur 3A,3B,4A og 4B, illustrerer resultaterne. Der ses en tendens til, at kontamineringsprocenterne stiger indtil femte udtagning og derefter falder lidt. I de statistiske analyser (havre) bliver modellen for additivitet godkendt. Værdien (1,3239) er mindre end den i tabel angivne ($\chi^2_{.95}(20)/20 = 1,5705$). Med hensyn til testene for betydningen af henholdsvis kanaler og udtag bliver resultaterne som for rug, top-gennemsnitsprøverne: Kanaler kan testes ud, mens udtag ikke kan. *Slutmodellen for havredata er da en model, hvor det gælder, at kontamineringen af prøverne afhænger af udtagning, men ikke af sidekanal.*

I plot 3 og 4, "HAVRE binomial", er konklusionerne illustreret grafisk.

Samme konklusion fremkommer ved analysen baseret på normalfordelingen (SAS side 15-18 og plot 10+11, "HAVRE NORMAL"). Det betyder, at der er sket en udvikling i tid. Derimod har det været underordnet, på hvilke kanaler prøverne er blevet taget.

Datasæt for rug, bundprøver (RB)

RB (rug 2 i SAS-udskrifterne) har kontamineringsprocenter fra 1,7-18,7 % og middelværdi på 7 % (appendiks 2.4 og 2.6). Appendiks 2.9, figur 1A,1B,2A og B, illustrerer resultaterne. Der er en tendens til, at kontamineringsprocenterne stiger indtil femte udtagning og derefter falder igen.

Desuden kan det fremhæves, at sidekanal 3 og 4 viser kontamineringsniveauer på højde med de øvrige sidekanaler trods det, at de er dækket af kunstthessiansække (appendiks 2.9, figur 1B).

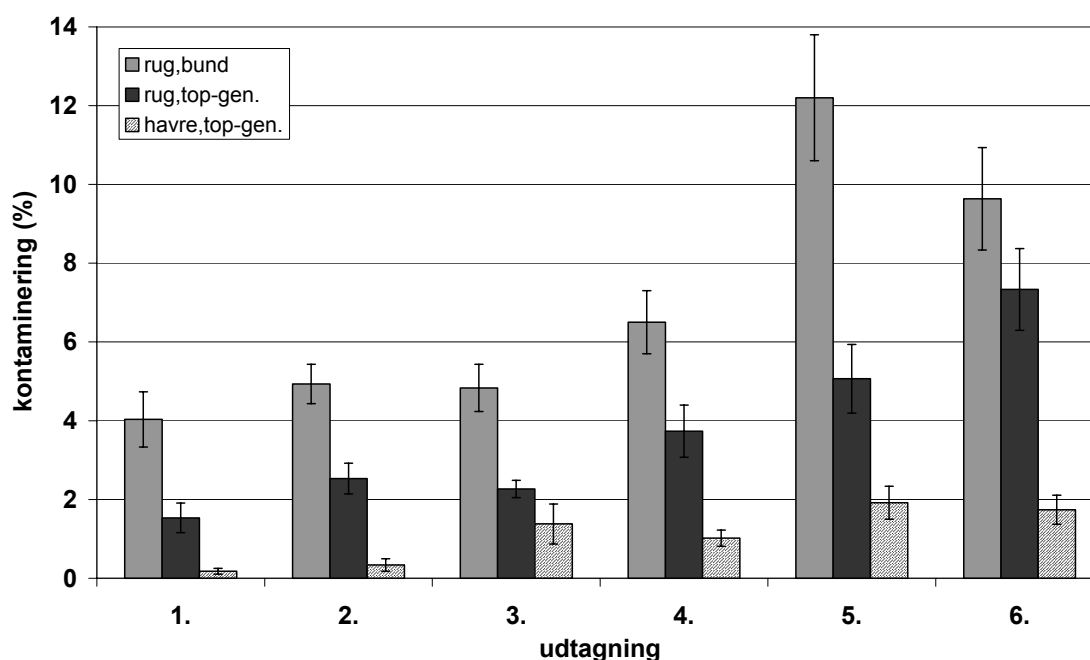
De statistiske tests for betydningen af henholdsvis position og udtag viser, at både position og udtag har indflydelse. *Slutmodellen for data i rug 2 er da en model, hvor det gælder, at kontamineringen af prøverne afhænger både af udtagning og sidekanal.*

Dette illustreres desuden ved den grafiske fremstilling, plot 5 og 6, "RUG 2 binomial".

Det betyder, at både positionerne og udtagningstidspunkterne har en betydning. Det er med andre ord af en vis betydning for kontaminering med *P. verrucosum*, hvor i bunden af plansiloen kornet ligger.

Datasæt for rug, top-gennemsnits- og bundprøver (rug 3)

RB har generelt højere kontamineringsprocenter end RTG. Figur 3.4.3 viser middelværdierne for både RB og RTG i forhold til udviklingen i kontaminering med *P. verrucosum*.



Figur 3.4.3 Middelværdier år 2000 fra henholdsvis RB (appendiks 2.9, Fig. 2A,B), RTG (Fig.3.4.1A) og HTG (Appendiks 2.9, Fig.4A,B). Resultaterne viser udvikling i kontaminering med *P. verrucosum* for hver udtagning (middel, \pm SEM, $n = 10$ for RB, $n = 5$ for RTG, $n = 5$ for HTG). For udtagningstidspunktet henvises til tabel 3.2.1.

Resultaterne, som er testet i en normalfordelingsmodel, viser, at både kanalsystem, udtag, position og kanal har indflydelse. Slutmodellen for det samlede datasæt i rug er derfor en model, hvor det gælder, at kontamineringen af prøverne afhænger af både kanalsystem, udtag, position og kanal. Plot 13 og 14, "ALT RUG NORMAL", illustrerer den grafiske fremstilling.

Med andre ord gælder det for de samlede rugprøver, at både udtagningstidspunkt, position og kanal (bund + top, gennemsnit) har en effekt, samt at hele kanalsystemet har en betydning, dvs., at det ikke er ligegyldigt ved hvilket samlet kanalsystem, prøverne blev taget.

Analyserne for hvert specifikt kanalsystem viser:

For kanal 3 (SAS s.38) at både udtag og position har betydning.

For kanal 4 (SAS s. 40) at position har betydning, mens udtag ikke har indflydelse.

For kanal 5 (SAS s.42) at udtag har betydning, mens position ikke har betydning.

Sandsynlighedsparameteren for position ligger dog tæt på 0,05, hvorfor konklusionen ikke er så sikker.

For kanal 6 (SAS s. 44) har både udtag og position betydning.

For kanal 7 (SAS s. 46) har tilsvarende både udtag og position betydning.

De grafiske fremstillinger illustrerer forløbene (Plot 15-24).

Forskelle mellem rug og havre samt vekselvirkning mellem udtag og art

Generelt har havreprøverne lavere kontamineringsprocenter end rugprøverne (appendiks 2.4 og 2.6), hvilket blev bekræftet ved de statistiske analyser og ses i ovenstående figur 3.4.3.

Den første statistiske analyse, variansanalyse i normalfordelingen, viser, at model for kanal samt model for vekselvirkningen mellem udtag og art kan testes væk (SAS side 21-24). *Den foreløbige slutmodel for data i rug 1 og havre er da en model, hvor det gælder, at kontamineringen af prøverne afhænger af udtagning og art.*

Dette betyder, at kanalerne og vekselvirkningen mellem udtagning og art ikke har haft en betydning, mens udtagningstidspunktet og arten har haft en betydning for kontaminering med *P. verrucosum*.

Den efterfølgende test i en binomialfordelingsmodel (SAS side 25-30) viser til forskel fra før, at vekselvirkningen mellem udtag og art ikke kan testes væk. Ellers viser resultaterne det samme: *at udtagningstidspunkt og art har betydning, mens kanal ikke har betydning.*

Ifølge sidste test er der sket en udvikling i tid, og der er forskel på rug og havres kontamineringsgrad. Med hensyn til vekselvirkningen mellem udtag og art kan det tolkes som et tegn på, at udviklingen af *P. verrucosum* er foregået forskelligt afhængigt af art. Her har udviklingen været hurtigere i rug end i havre. Det betyder evt. at, havre og rug opfører sig forskelligt ved udtagningen.

Slutmodellen er derfor ikke entydig, eftersom testene fremkommer med to konklusioner. Ifølge *P. Blæsild* er den ene test ikke bedre end den anden.

3.4.2 Kontaminering med *P. verrucosum* år 2001

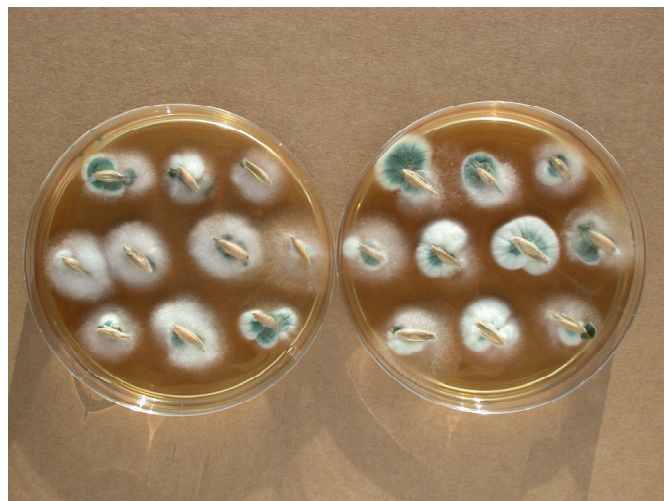
Resultaterne for år 2001 viser, at alle 24 prøver var positive. I appendiks 2.10 er det samlede datasæt for år 2001 illustreret. Desuden er resultaterne vedlagt i appendiks 2.5 og 2.7. Udpluk er vist ved billede 3.4.5-3.4.8. Der er specielt sket en markant stigning i antallet af kontaminerede kerner fra første til anden - og sidste - udtagning for rugprøverne (appendiks 2.10, fig. 2A,2B,2C, 5A og 6A).



***Billede 3.4.5 Første prøveudtagning 2001
(16.09.2001), HB sk.6, forside***



***Billede 3.4.6 Første prøveudtagning 2001
(16.09.2001), HB sk.6, reversside***

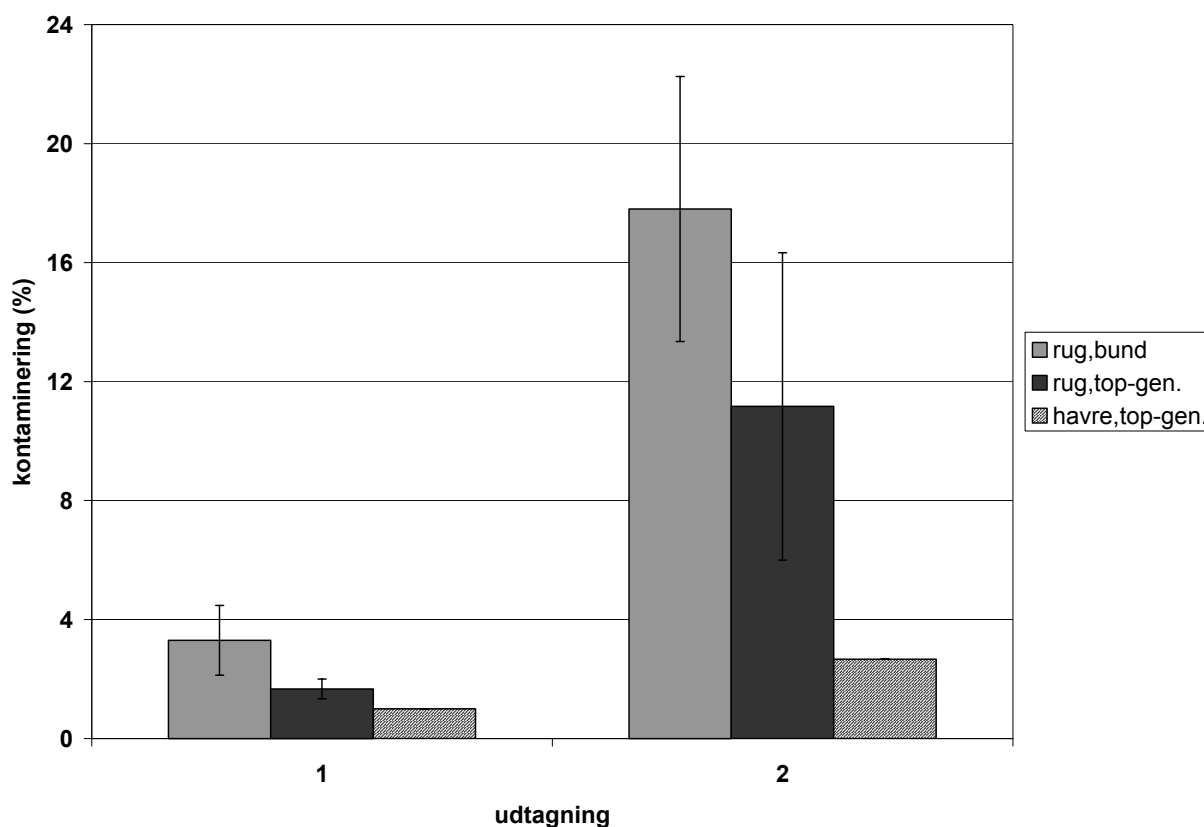


***Billede 3.4.7 Anden prøveudtagning 2001
(24.11.2001), HB sk.6, forside***



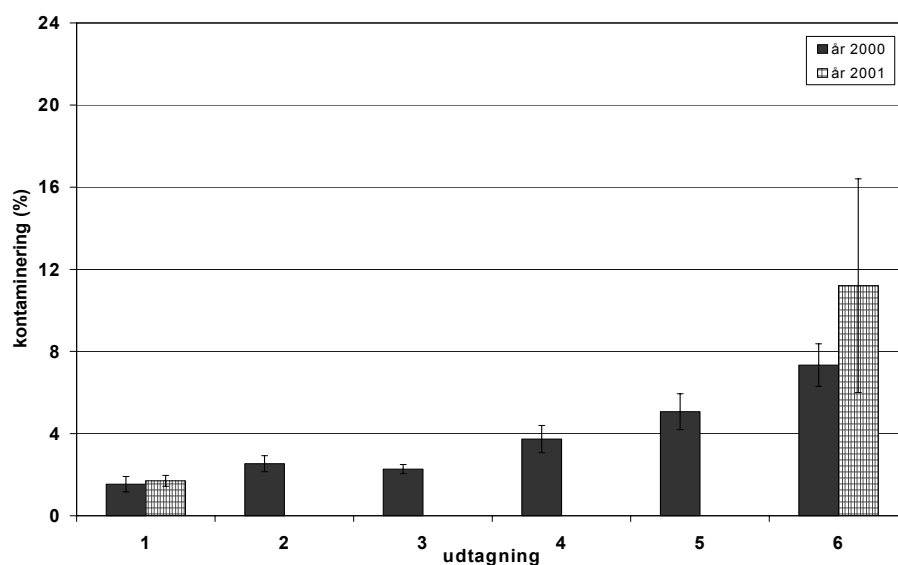
***Billede 3.4.8 Anden prøveudtagning 2001
(24.11.2001), HB sk.6, reversside***

I figur 3.4.3 er middelværdierne for RTG, HTG og RB samlet. De viser en tendens som i år 2000. RB har højeste kontamineringsprocenter, og HTG har laveste. I appendiks 2.10, fig. 7 ses det dog, at HB har kontamineringsprocenter, som er større end rugprøverne ved første udtagning.



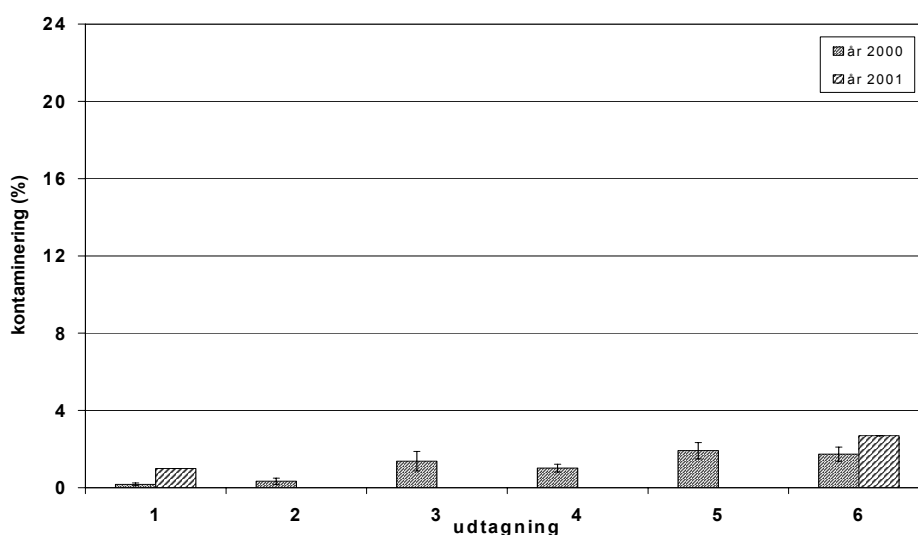
Figur 3.4.3 Middelværdier år 2001 for henholdsvis RB (appendiks 2.10, Fig. 1A,5A), RTG (appendiks 2.10, Fig. 1B, 6A) og HTG (appendiks 2.10, Fig.3B,6B). Resultaterne viser udvikling i kontaminering med *P. verrucosum* for hver udtagning. Resultaterne bygger på et noget mindre datamateriale end året før (figur 3.4.3). (middel, \pm SEM, $n = 4$ for RB, $n = 2$ for RTG, $n = 2$ for HTG). Havren år 2001 blev høstet af to omgange. Derfor er der to angivelser for antal dage efter høst ved første og anden udtagning. I figurerne er antallet af dage efter høst beregnet ud fra første høsttidspunkt. For udtagningstidspunktet henvises til tabel 3.2.2.

Figur 3.4.4 sammenligner middelværdierne fra udtagningerne hhv. år 2000 og 2001 for RTG. Ved sidste udtagning er kontamineringen i år 2001 større end i år 2000. Der skal dog tages højde for, at antallet af prøver er forskelligt ($n=2$ i år 2001 og $n=5$ i år 2000) samt, at der er en stor spredning ($s = 7,3$) (appendiks 2.7) ved sidste udtagning i år 2001. Udtagningstidspunkterne for hhv. år 2001 og 2000 er sammenlignelige. Første udtagning er henholdsvis 4 dage efter høst (år 2001) og 2 dage efter høst (år 2000), mens sidste udtagning er henholdsvis 73 dage efter høst (år 2001) og 70 dage efter høst (år 2000).



Figur 3.4.4 År 2000 og 2001 middelværdier for RTG. Resultaterne viser udvikling i kontaminering med *P. verrucosum* for hver udtagning i år 2000 sammenholdt med resultaterne i år 2001 (middel, \pm SEM, $n = 5$ for år 2000, $n = 2$ for år 2001). For udtagningstidspunktet henvises til tabel 3.2.1 og 3.2.2.

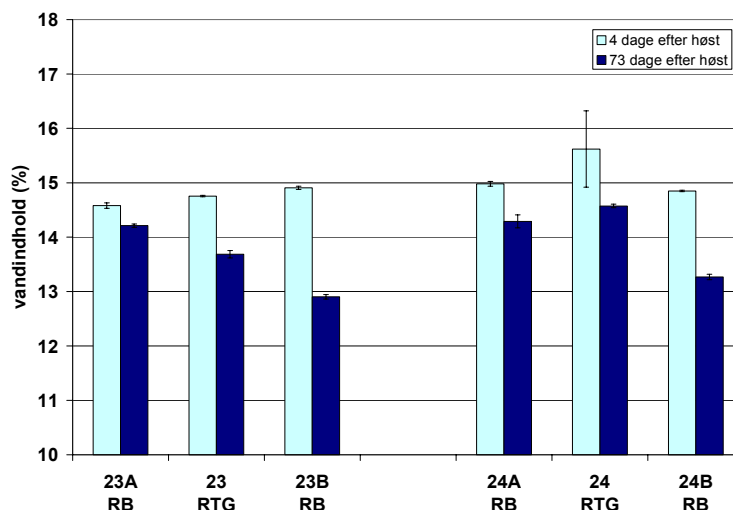
Figur 3.4.5 sammenligner tilsvarende middelværdierne for udtagningerne hhv. år 2000 og år 2001, men for HTG. Her er der en svag tendens til, at kontamineringsprocenterne fra år 2001 er større end kontamineringsprocenterne år 2000. Spredningen er nul for HTG år 2001 (appendiks 2.7). Der skal dog igen tages forbehold for, at antallet af prøver er forskelligt ($n=2$, år 2001 og $n=5$, år 2000). Generelt er kontamineringsprocenterne lavere for havre end for rug begge år.



Figur 3.4.5 År 2000 og 2001 middelværdier for HTG. Resultaterne viser udvikling i kontaminering med *P. verrucosum* i gennemsnit for hver udtagning i år 2000 sammenholdt med resultaterne i år 2001 (middel, \pm SEM, $n = 5$ for år 2000, $n = 2$ for år 2001). For udtagningstidspunktet henvises til tabel 3.2.1 og 3.2.2.

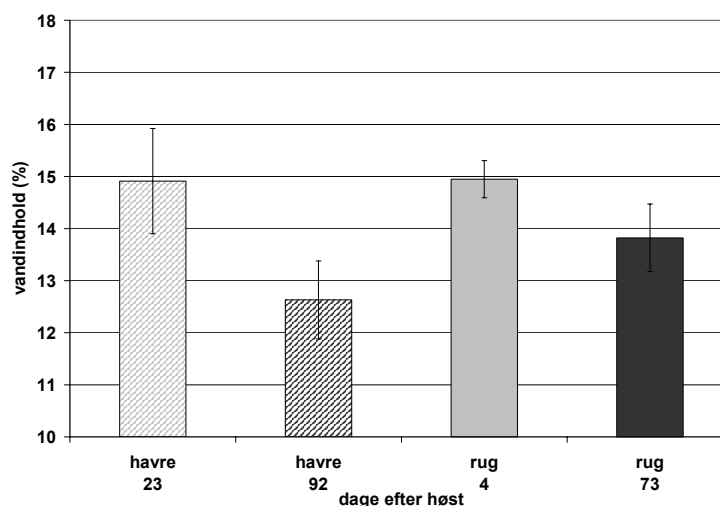
3.4.3 Vandprocentanalyse

Vandindholdet i samtlige rugprøver fra år 2001 ses i figur 3.4.6 og appendiks 2.11. Ved første udtagning ligger indholdet mellem 14,6% og 15,6%, mens kornet ved anden udtagning ser ud til at være blevet tørret lidt ned. Her ligger vandindholdet mellem 12,9% og 14,6%.



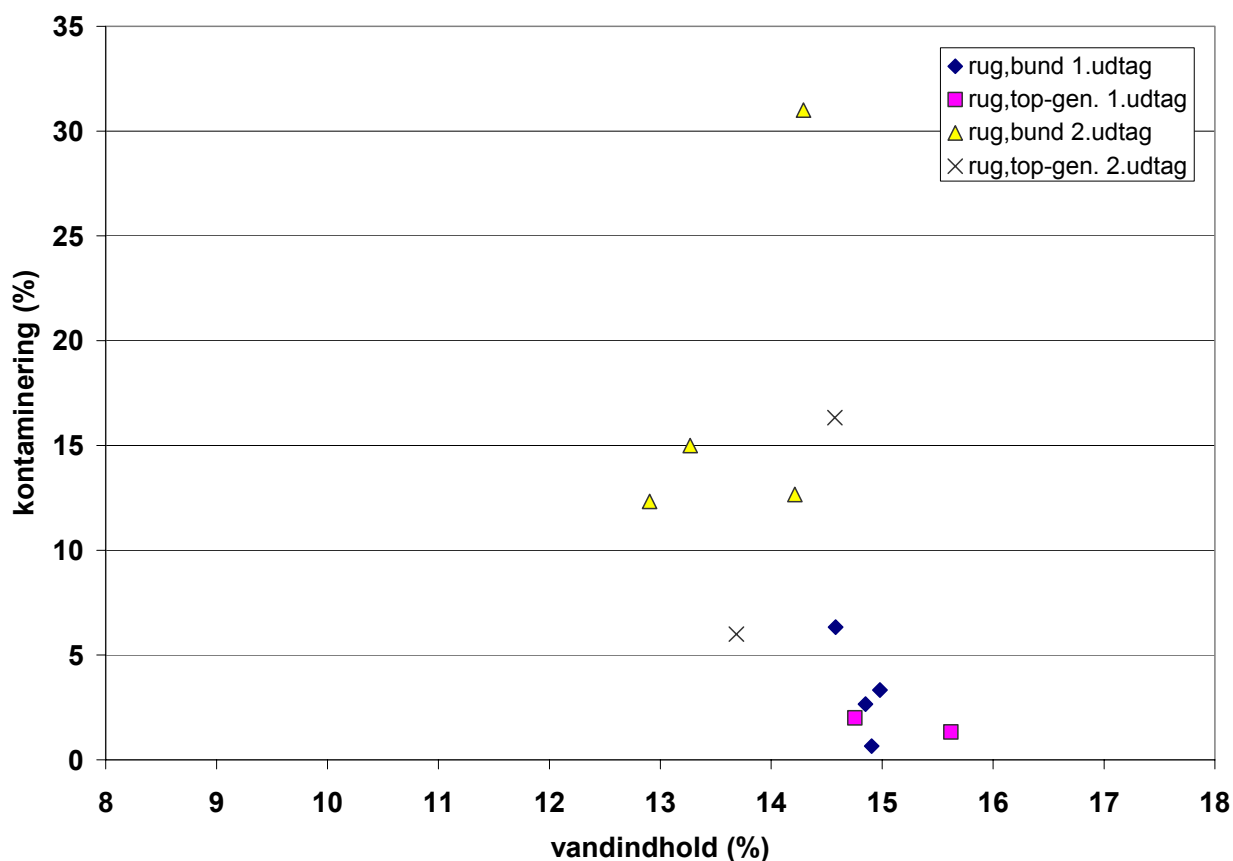
Figur 3.4.6 Vandindhold i procent år 2001 for samtlige RB og RTG (sidekanal 23 og 24) ved 4 og 73 dage efter høst, hhv. 1. og 2. udtagning.

I appendiks 2.11, figur 1 ses et lignende billede af havreprøverne fra år 2001. Her ligger vandholdet mellem 13,8% og 16,0% i første udtagning, mens det ligger mellem 11,8% og 13,9% i anden udtagning. Havreprøverne er dermed blevet tørret mere ned end rugen, hvilket er illustreret i figur 3.4.7, hvor middelværdierne for det samlede datasæt i rugen og havren er anvendt.



Figur 3.4.7 Middelværdier år 2001 beregnet ud fra samlede datasæt i rugen og havren (fig. 3.4.5) og (appendiks 2.11.2, Fig.1). Resultaterne viser middelvandindholdet for havre og rug, 23 dage efter høst og 92 dage efter høst for havren og 4 hhv. 73 dage efter høst for rugen, (middel, \pm SEM, n = 6 positioner).

Figur 3.4.8 viser vandindholdet sammenholdt med kontamineringen af *P. verrucosum* for rugprøverne i år 2001. Det er RB-prøver i anden udtagning med det laveste vandindhold, der har de højeste kontamineringsprocenter.



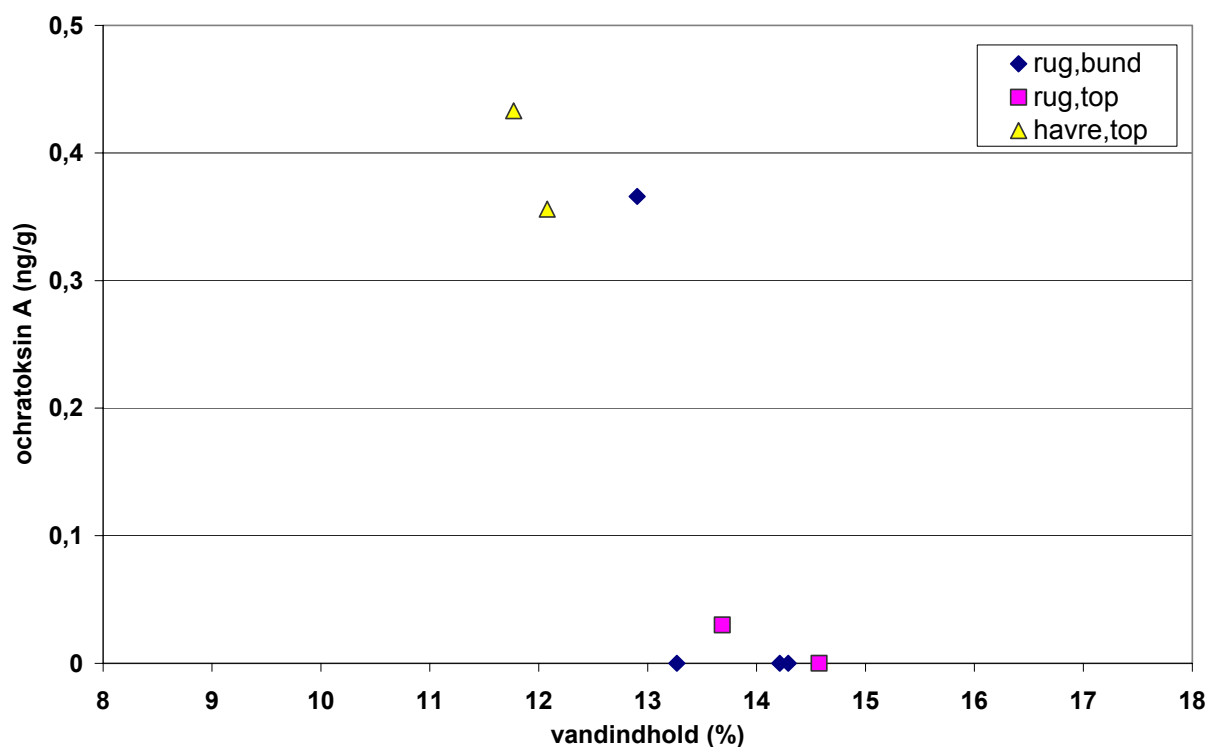
Figur 3.4.8 Vandindhold i procent sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i samtlige rugprøver år 2001.

Appendiks 2.11, fig. 2 viser tilsvarende kontamineringsprocenten i forhold til vandindholdet for havreprøverne. Ligeledes ses det, at prøver med lavt vandindhold (13,9%) godt kan have kontamineringsprocenter på omkring 16%.

Vandindholdet i HTG år 2000 blev analyseret trods vor viden om, at prøverne var blevet opbevaret u hensigtsmæssigt. Resultaterne er vedlagt som appendiks 2.12. Der ses en svag tendens til, at vandindholdet faldt lidt indtil 37 dage efter høst for herefter at stige igen (app. 2.12, fig. 2), men spredningen gør dette usikkert.

3.4.4 Okratoksin A- analyser

Figur 3.4.9 viser forekomst af OTA i forhold til vandindholdet i RB, RTG og HTG ved anden udtagning i år 2001 (tabel 3.4.1). Det er HTG med det laveste vandindhold, der har det højeste indhold af OTA. Forekomsten af OTA ligger dog under grænseværdien (5 ng/g for korn og kornprodukter til humant konsum) for alle resultaterne.



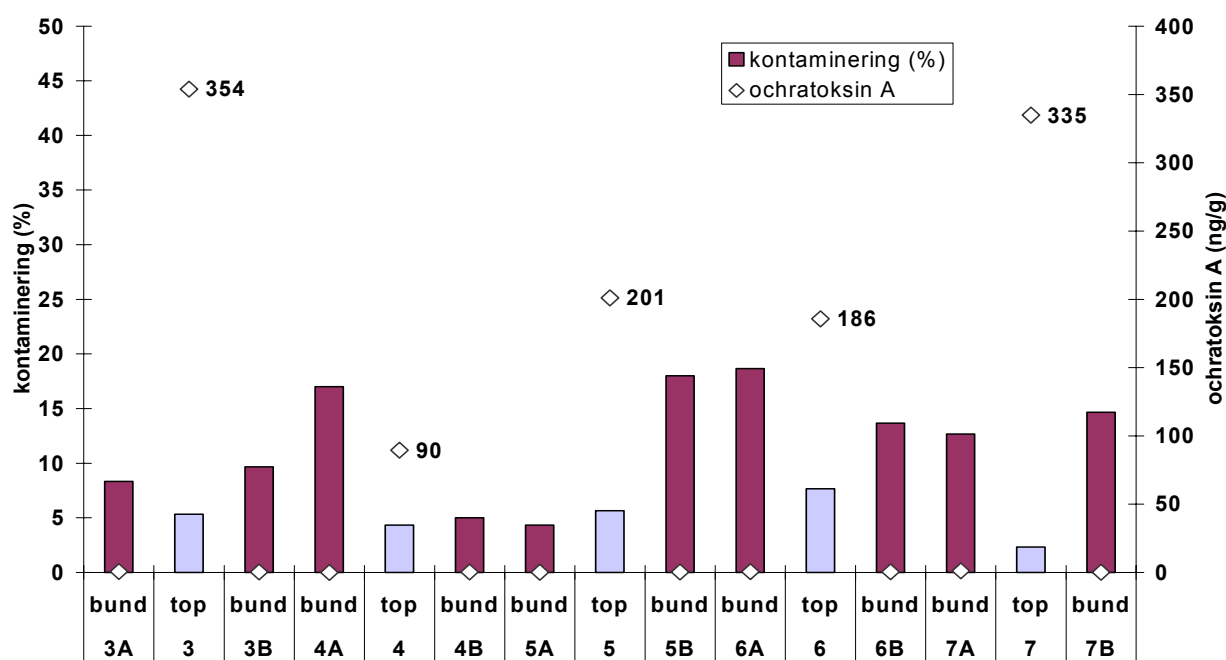
Figur 3.4.9 OTA-forekomst år 2001 sammenholdt med vandindhold i RB, RTG og HTG ved 2. udtagning henholdsvis 73 dage for rugprøverne og 92 dage efter høst for havreprøverne.

Figur 3.4.10 viser sammenhængen mellem forekomst af OTA og kontaminering med *P. verrucosum* fortløbende i RB og RTG fra 3. –7. kanalsystem 63 dage efter høst (5. udtagning) år 2000 (tabel 3.4.1). Det er markant, at forekomsten af OTA i samtlige RTG er langt højere end forekomsten af OTA i RB, og at værdierne ligger mellem 85 og 349 ng/g over grænseværdien på 5 ng/g.

Tabel 3.4.1 Forekomst af OTA i udvalgte rug- og havreprøver fra 2000 og 2001

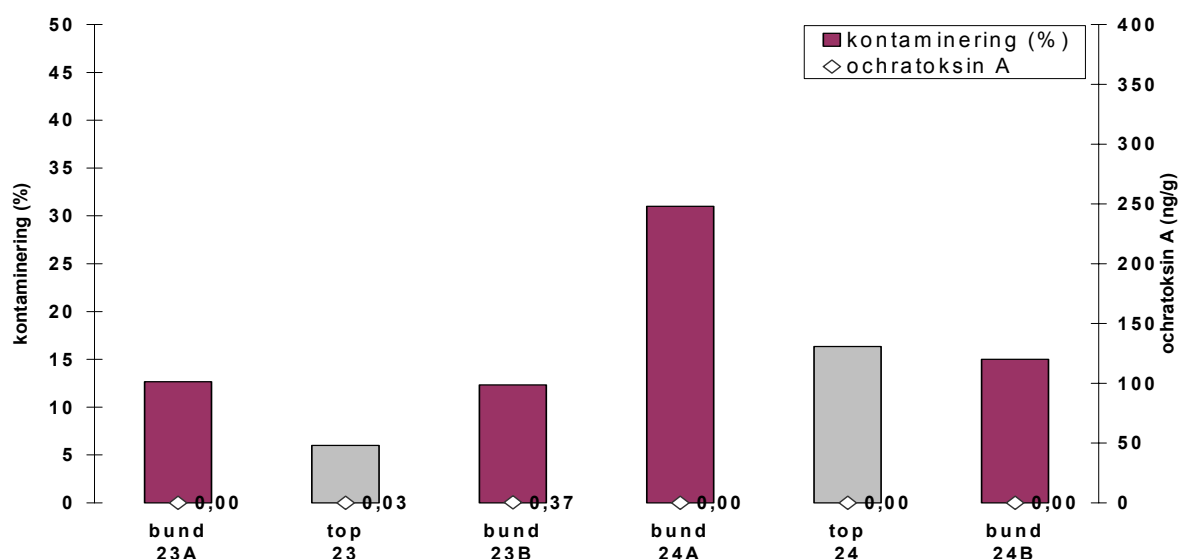
Kornart	Høstår	Udtagning (dage efter høst)	Prøve nr.	Top/bund	Kontaminering (%)	Vandindhold (%) gennemsnit	OTA* (ng/g)	OTA- gentagelse (ng/g)
Rug	2000	5.udt., 63 dage	3A	bund	8,3	-	0,7	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	3	top	5,3	-	354,0	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	3B	bund	9,7	-	0,3	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	4A	bund	17,0	-	0,1	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	4	top	4,3	-	89,6	51,8
Rug	2000	5.udt., 63 dage	4B	bund	5,0	-	0,3	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	5A	bund	4,3	-	0,1	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	5	top	5,7	-	201,0	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	5B	bund	18,0	-	0,2	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	6A	bund	18,7	-	0,5	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	6	top	7,7	-	185,7	209,9
Rug	2000	5.udt., 63 dage	6B	bund	13,7	-	0,4	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	7A	bund	12,7	-	1,1	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	7	top	2,3	-	334,9	
Rug	2000	5.udt., 63 dage	7B	bund	14,7	-	0,2	
Havre	2000	5.udt., 59 dage	13	top	2,3	13,3	3,7	
Havre	2000	5.udt., 59 dage	15	top	2,3	13,3	4,4	
Rug	2001	2.udt., 73 dage	23A	bund	12,7	14,2	0,0	
Rug	2001	2.udt., 73 dage	23	top	6,0	13,7	0,0	
Rug	2001	2.udt., 73 dage	23B	bund	12,3	12,9	0,4	
Rug	2001	2.udt., 73 dage	24A	bund	31,0	14,3	0,0	
Rug	2001	2.udt., 73 dage	24	top	16,3	14,6	0,0	
Rug	2001	2.udt., 73 dage	24B	bund	15,0	13,3	0,0	
Havre	2001	2.udt., 92 (79) dage	4	top	2,7	11,8	0,4	
Havre	2001	2.udt., 92 (79) dage	6	top	2,7	12,1	0,4	

* Detektionsgrænsen er på 0,05 ng/g.



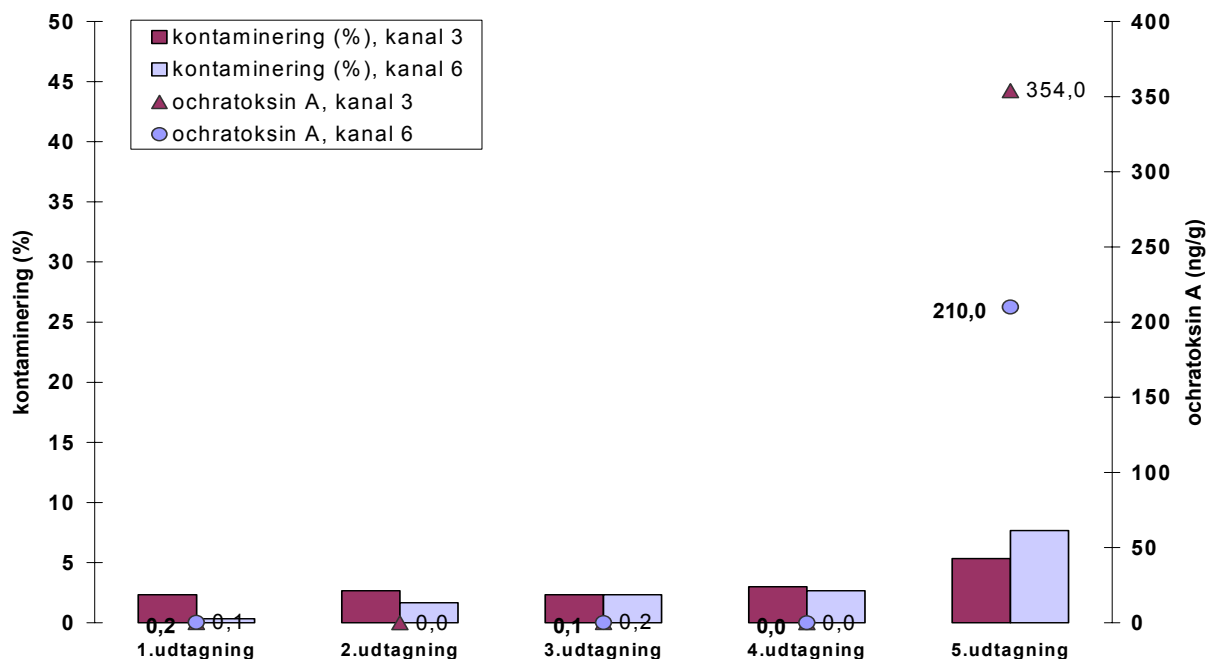
Figur 3.4.10 OTA-forekomst år 2000 sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i RTG og RB 63 dage efter høst. Grænseværdien er 5ng/g. OTA-værdierne på x-aksen ligger mellem 0,05 og 1,06 ng/g OTA.

Figur 3.4.11 viser tilsvarende figur for RB og RTG fra år 2001. Trods høje kontamineringsprocenter er forekomsten af OTA meget lille mellem 0,03 og 0,37 ng/g. OTA er dog detekteret 73 dage efter høst (tabel 3.4.1).



Figur 3.4.11 OTA-forekomst år 2001 sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i RTG og RB 73 dage efter høst.

Figur 3.4.12 viser udviklingen fra 6 - 63 dage efter høst (1.-5.udtagning) år 2000 i forekomsten af OTA og kontaminering med *P. verrucosum* for RTG ved 2 sidekanaler. Efter 63 dage er der sket en markant stigning i forekomsten af OTA, igen til langt højere værdier end grænseværdien på 5 ng/g, til værdier på 210 og 354 ng/g (tabel 3.4.2).



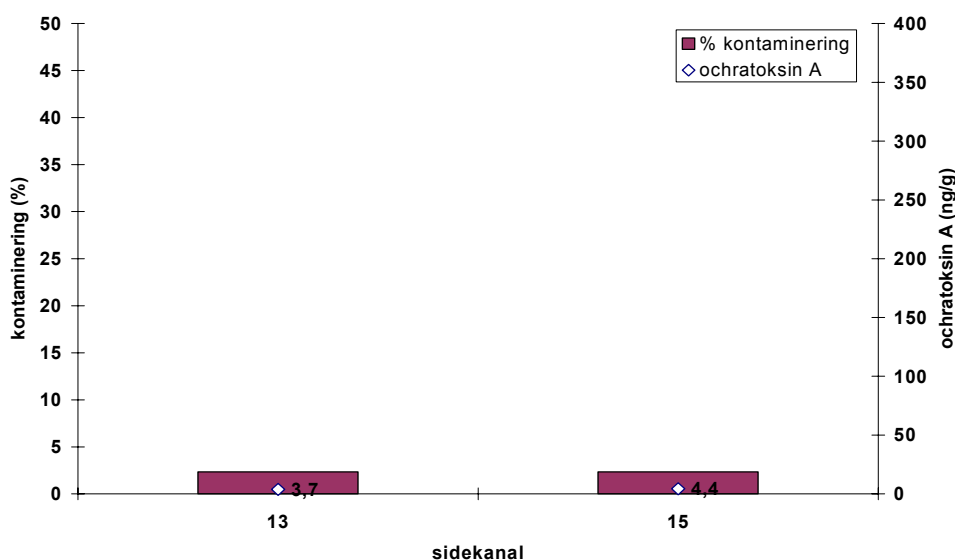
Figur 3.4.12 Udvikling fra 1.-5. udtagning år 2000 i forekomst af OTA i RTG sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum*, for to udvalgte sidekanaler. For udtagnings tidspunktet henvises til tabel 2. Prøven fra 2. udtagning, sidekanal 6 er ikke eksisterende.

Tabel 3.4.2 Forekomst af OTA i en tidsserie af rugprøver fra 2000

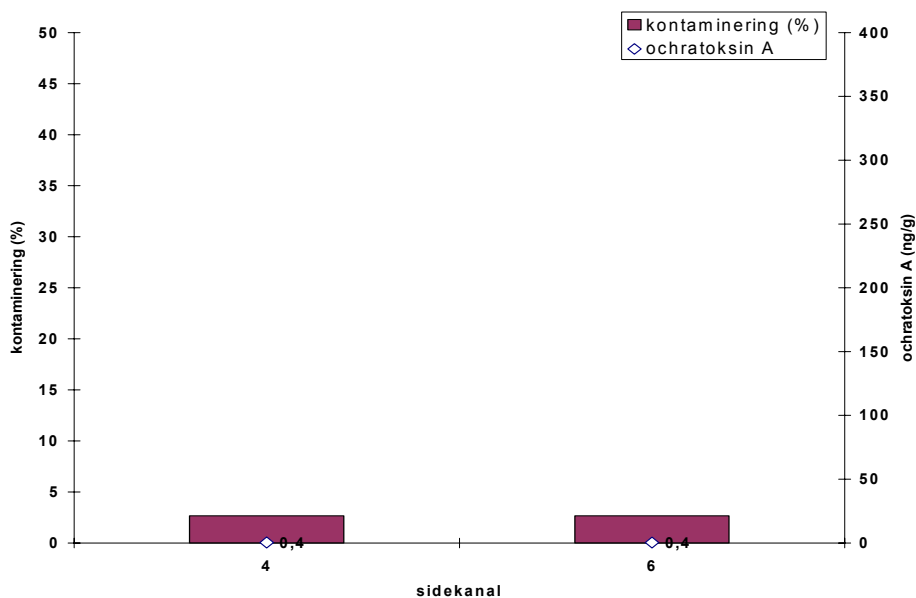
Kornart	Høstår	Udtagning (dage efter høst)	Prøve nr.	Top/bund	Kontaminering (%)	Vandindhold (%) gennemsnit	OTA (ng/g)
Rug	2000	1. udt., 6 dage	3	top	2,3	-	0,1
Rug	2000	2. udt., 19 dage	3	top	2,7	-	0,0
Rug	2000	3. udt., 29 dage	3	top	2,3	-	0,2
Rug	2000	4. udt., 41 dage	3	top	3,0	-	0,0
Rug	2000	5. udt., 59 dage	3	top	5,3	-	354,0
Rug	2000	1. udt., 6 dage	6	top	0,3	-	0,2
Rug	2000	2. udt., 19 dage	6	top	1,7	-	*
Rug	2000	3. udt., 29 dage	6	top	2,3	-	0,1
Rug	2000	4. udt., 41 dage	6	top	2,7	-	0,0
Rug	2000	5. udt., 59 dage	6	top	7,7	-	209,9

*Prøven ikke eksisterende

Figur 3.4.13 og 3.4.14 viser sammenhængen mellem forekomst af OTA og kontaminering med *P. verrucosum* i HTG for henholdsvis år 2000 og 2001. Begge år er OTA tilstede men i mængder, der ligger under grænseværdien. År 2000 er værdierne dog omkring 10 gange indholdet i år 2001, mens kontamineringsprocenterne ca. er de samme (tabel 3.4.1).

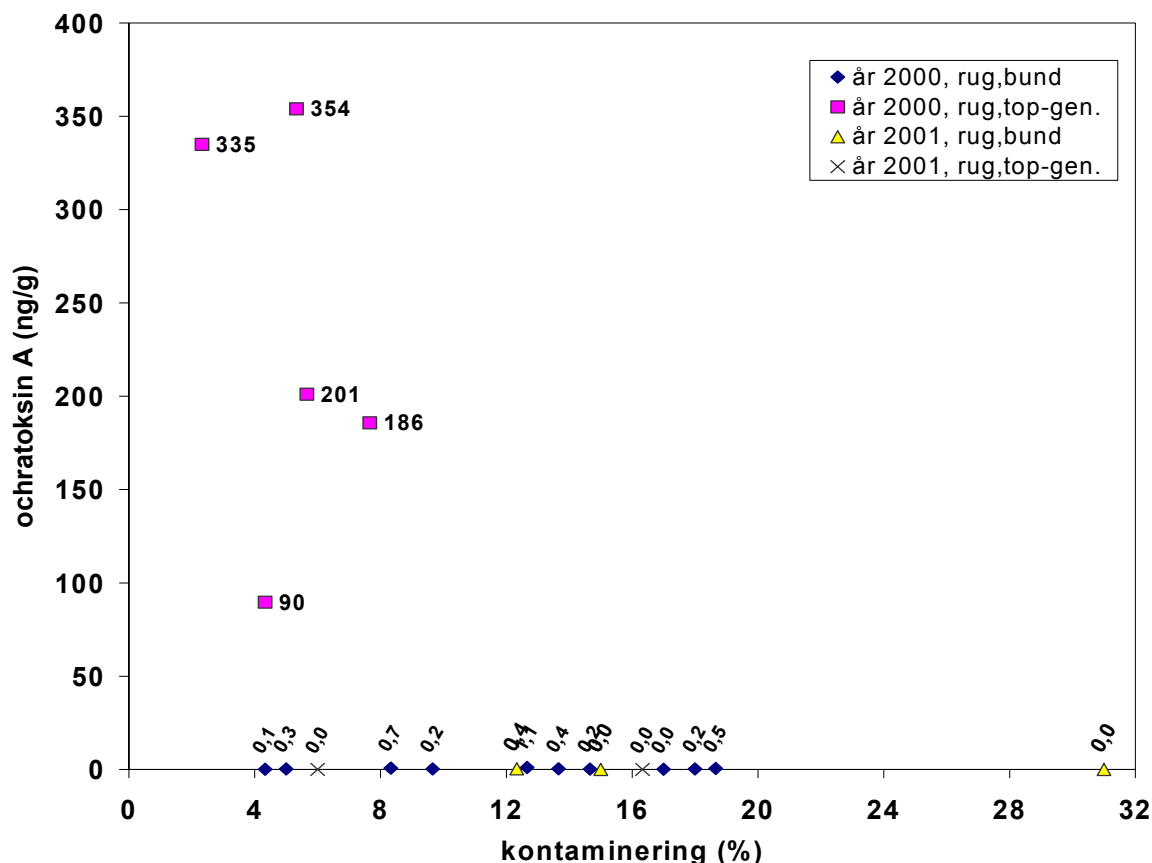


Figur 3.4.13 OTA-forekomst år 2000 sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i HTG 59 dage efter høst for 2 udvalgte sidekanaler.



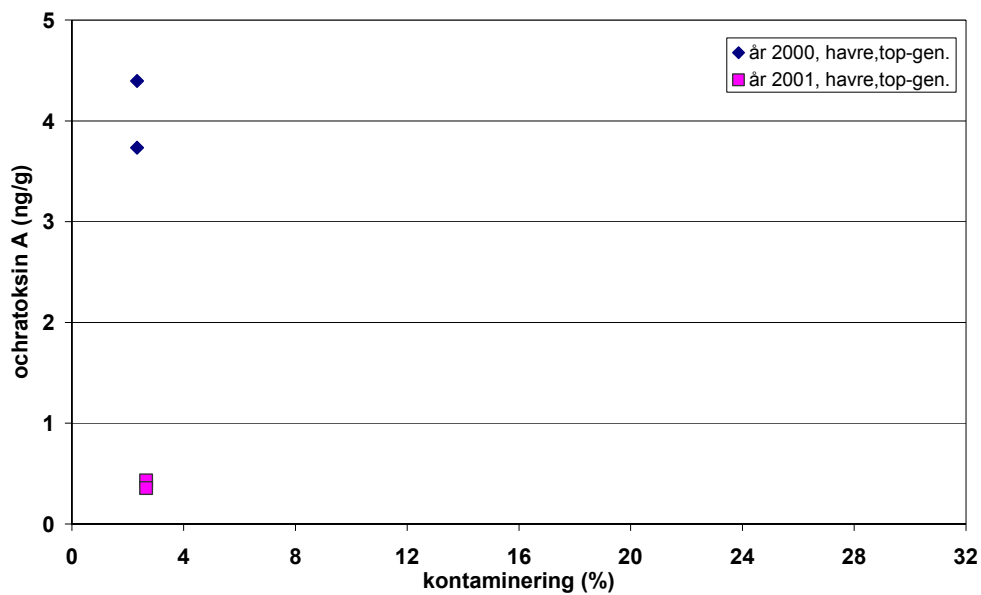
Figur 3.4.14 OTA-forekomst år 2001 sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i HTG 92 dage efter høst.

Figur 3.4.15 illustrerer forholdet mellem forekomst af OTA og kontaminering med *P. verrucosum* i RB og RTG både år 2000 og år 2001 ved henholdsvis 63 og 73 dage efter høst. Der ses ingen sammenhæng mellem høje kontamineringsværdier og høje OTA-forekomster. De højeste OTA-forekomster har kontaminering på mindre end 8%. Tendensen er ikke tydelig.



Figur 3.4.15 OTA-forekomst år 2000 og 2001 sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i tilsvarende rugprøver 63 dage efter høst for år 2000-prøverne og 73 dage efter høst for år 2001-prøverne. Grænseværdien er 5 ng/g.

Figur 3.4.16 illustrerer tilsvarende forholdet mellem forekomst af OTA og kontaminering med *P. verrucosum*, men for havreprøverne. Vær opmærksom på, at skalaen på y-aksen er forskellig fra figur 3.4.15. Igen ses der ingen tendens til, at OTA-forekomsten er afhængig af høje kontamineringsprocenter.



Figur 3.4.16 OTA-forekomst år 2000 og 2001 sammenholdt med kontaminering med *P. verrucosum* i havre, top-gennemsnittsprøver 59 dage efter høst for år 2000-prøverne og 92 dage efter høst for år 2001-prøverne. Vær opmærksom på, at skalaen er anderledes end for rugprøverne (Fig. 3.4.15).

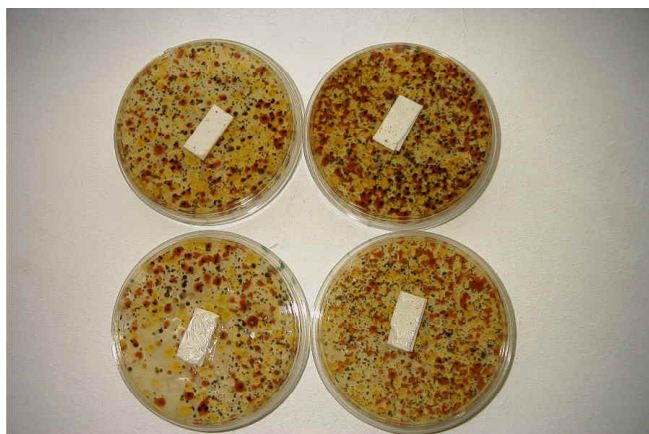
3.4.5 Luftanalyser i hoved- og sidekanaler

Luftanalyserne var små delprojekter og vurderes til at være perifere for projektet. Resultaterne fra luftanalyserne er baseret på fotos (billeder 3.4.9-3.4.12).

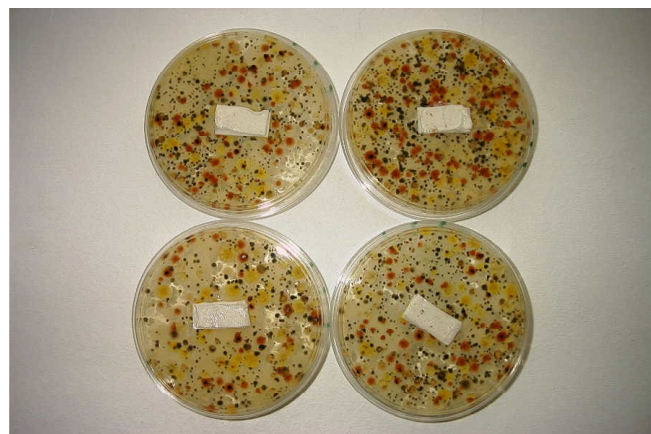
De første prøver fra hovedkanalen og lagerrummet umiddelbart efter høst viser, at *P. verrucosum*-konidier var tilstede i stor mængde i hovedkanalen, men også i rummet omkring kornet.

Analyserne, der er taget knap en måned efter de første prøver, viser ligeledes, at *P. verrucosum*-konidier er tilstede. Specielt sidekanal 5 viser en kraftig infestation med *P. verrucosum* (billede 3.4.9).

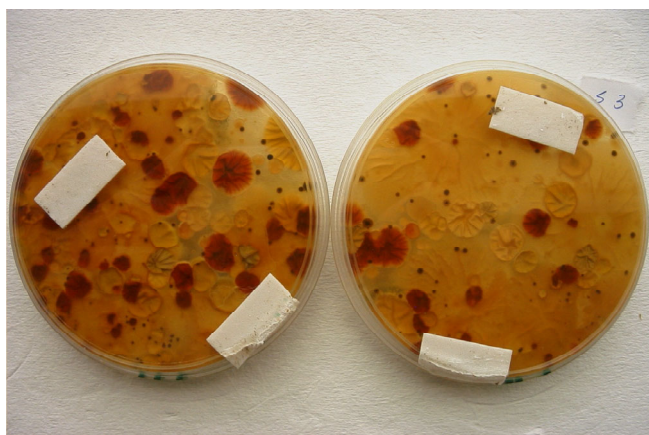
Luftanalyserne året efter (billede 3.4.11 og 3.4.12), hvor sidekanalerne er skiftet ud med metalbuer, viser stadig en kraftig infestation med *P. verrucosum*.



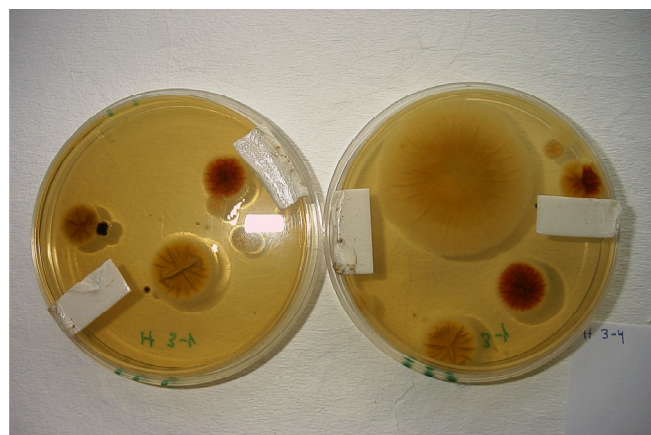
Billede 3.4.9 Luftprøver år 2000 (19.09.00)
sidekanal 5



Billede 3.4.10 Luftprøver år 2000 19.09.00)
HK 4-5



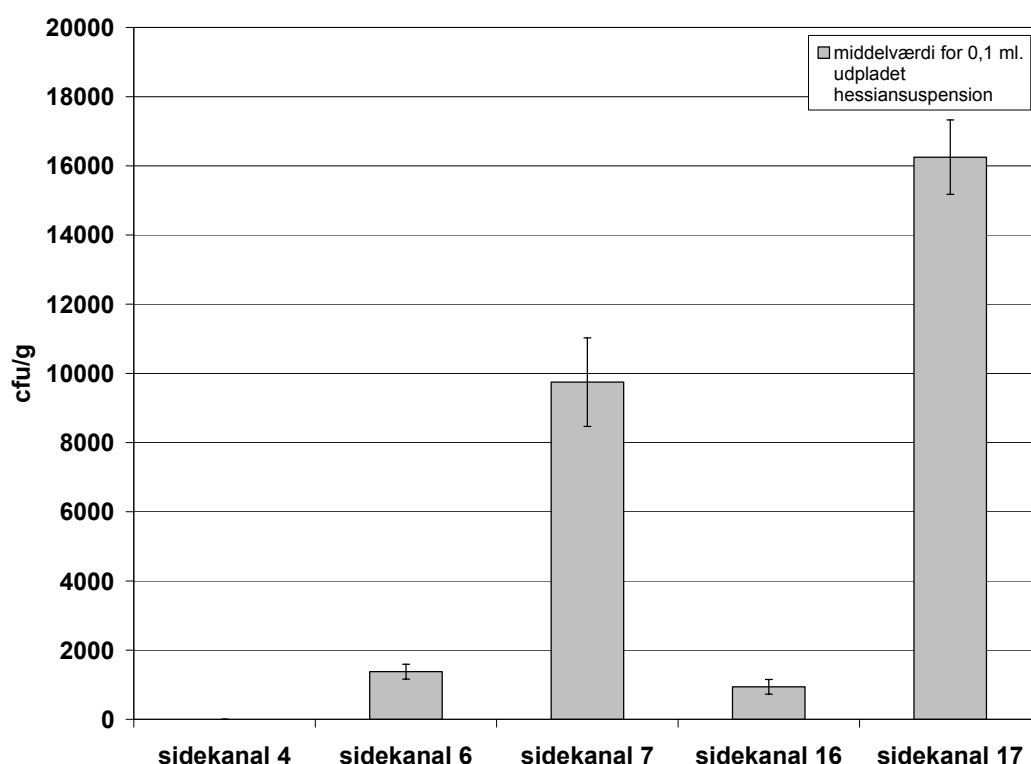
Billede 3.4.11 Luftprøver år 2001 (16.09.01)
sidekanal 3



Billede 3.4.12 Luftprøver år 2001 (16.09.01)
HK 3-4

3.4.6 Pilotpladespredning af hessian

Pilotpladespredningen var et delforsøg og vurderes til at være perifert for projektet. Appendiks 2.8 viser rådata fra pladespredningen. Figur 3.4.17 viser, at *P. verrucosum*-konidier var tilstede i samtlige hessiansuspensioner, men med varierende antal. I hessian fra sidekanal 17 var der op til 18250 cfu/g hessian. Bemærkelsesværdigt er det, at sidekanal 4 ikke indeholdt *P. verrucosum* men havde en anderledes svampeflora.



Figur 3.4.17 Middelværdier af pilotpladespredning med 4 gentagelser fra et stykke hessian fra udvalgte sidekanaler. Resultaterne viser udpladning af 0,1 ml. hessiansuspension og variation på tællingerne (middel, \pm SEM, $n = 4$ gentagelser).

3.5 Diskussion

Kontaminering 2000

I top-gennemsnitsprøverne for både rug og havre har positionen i lageret ingen betydning for kontamineringsgraden, hvorimod positionerne har betydning for kontaminering af bundprøverne. Top-gennemsnitsprøverne blev taget 13 cm over sidekanalen, idet det nederste hul i prøvetagningsspyddet begynder her. Derfor har top-gennemsnitsprøverne ikke været i tæt kontakt med hessiansækkene, og måske har hessianet eller kunsthessianet ikke haft en betydning for top-gennemsnitsprøvernes kontamineringsgrad.

Ud fra pilotpladespredningen af hessian kan det skønnes, hvor stort *P. verrucosum*-potentialet for en sidekanal er:

Hessianarealet pr. sidekanal er	$\approx 24.163 \text{ cm}^2$
Maksimum værdi for cfu/g hessian (sidekanal 17)	$= 18.250 \text{ cfu/g}$
4 g hessian svarer til ca. 5 cm^2 , ($18.250 \text{ cfu/g} \times 4 \text{ g}$)	$= 73.000 \text{ cfu/4g} = 5 \text{ cm}^2$
cfu/cm ² er da $73.000 \text{ cfu/5 cm}^2$	$= 14.600 \text{ cfu/ cm}^2$
cfu/sidekanal er da $14.600 \text{ cfu/cm}^2 \times 24.163 \text{ cm}^2$	$\approx 352 \text{ mill cfu/sidekanal}$

Dette giver en betragtelig kontamineringsrisiko fra hessiansækkene. Hertil kommer, at både luften i sidekanal og hovedkanal indeholdt store mængder *P. verrucosum*-konidier. Luftstrømmen blev primært ført ud gennem bunden af sidekanalerne, hvorved konidierne i større grad kan have påvirket kornet i bunden af lageret. Dette stemmer overens med større kontaminering i rug-bundprøverne end i topprøverne (figur 3.4.3).

Seitz *et al.* (1982) fandt en top-bundgradient i svampekoncentration i majs, der var lagret i 1,5 meters højde og ligeledes tørret med luftgennemstrømning fra bunden. Indholdet af ergosterol, aflatoksin og procenten af kerner med *Aspergillus flavus*, *A. niger* og *Rhizopus* var dog højest i toppen af lageret. Fordelingen var ikke konsekvent for andre svampe heriblandt *Penicillium*. Dette skyldes måske konkurrencen mellem svampene, mener Seitz *et al.* (1982). De fandt desuden en temperatur- og fugtighedsgradient. Varmen fra svampemetabolisme i toppen kombineret med evaporativ køling i tørrezonen forårsagede en temperaturgradient. De høje temperaturer i toppen af beholderen var det ene år i stand til at tørre kernerne i toppen. Tests år 1978 viste højest

vandindhold i bunden af beholderne, lige over tørrezonen, mens tests år 1979 viste, at kornet ved overfladen var lidt vådere end korn et stykke under overfladen.

I teorien vil temperatur og vandindhold i et planlager stratificeres vertikalt, idet enhver kølings- og tørringseffekt starter nedefra og bevæger sig opad (Scudamore & Wilkin, 1999, afsnit 2.6). Dette gør, at risikoen for svampeudvikling er størst i de øvre, vådere dele af lageret. Dette stemmer ikke overens med en højere kontamineringsgrad af *P. verrucosum* i bunden end i toppen af lageret. At placeringen af kornet i lagersystemet har betydning for kontamineringsniveauet kan desuden skyldes problemer med opnåelse af en jævn tørring, lufttrykforskelle p.g.a. forskellig afstand til blæseren, variation i temperatur, RH og indhold af ukrudt samt andre urenheder. Det understreger potentialet for hotspots. Resultaterne viser også, at det ikke er ligegyldigt, hvor i kanalsystemet stikprøver bliver udtaget.

Resultaterne viste, at udtagningstidspunktet har betydning i langt de fleste analyser. Dette stemmer fint overens med teorien om udvikling af *P. verrucosum* over tid (Abramson *et al.*, 1997). Ved vurdering af enkelte kanalsystemer i rugen under test af datasæt for rug, top-gennemsnits- og bundprøver, har udtagningstidspunktet ikke haft en betydning ved kanalsystem 4. Der er med andre ord ikke sket en udvikling i tid. Årsagen hertil kan måske forklares med, at sidekanal 4 var beklædt med kunsthessianække. Det var sidekanal 3 dog også. De øvrige sidekanaler i rugen var helt eller delvist dækket med hessian (billede 3.1.1).

Det blev statistisk bekræftet, at havreprøverne havde lavere kontamineringsgrad end rugprøverne. Flere undersøgelser finder både arts- og sortsforskelle med hensyn til produktion af OTA: Hökby *et al.*, 1979; Abramson *et al.*, 1980; Chelkowski *et al.*, 1981; Abramson *et al.*, 1987; Madhyastha *et al.*, 1993; Jørgensen *et al.*, 1996; Axberg *et al.*, 1997; Jørgensen *et al.*, 2001 og Jørgensen & Jacobsen, 2002.

Jørgensen & Jacobsen (2002) finder i overvågningsprogrammerne for rug og hvede fra 1992-99, at OTA-koncentrationerne er højere for rug end for hvede. Chelkowski *et al.* (1981) finder ligeledes højere værdier af OTA i rugkerner end i hvede- og bygkerner. I et forsøg, hvor byg, hvede og havre opfugtes og placeres i et lager med havre i 20 uger, registrerer Abramson *et al.* (1980) OTA-produktion i byg og hvede, men ikke i havre.

Årsagsforklaringerne er mange. Chelkowski *et al.* (1981) skriver i et forsøg med hvede, rug og byg, at et lavt zinkniveau gør kernerne mere resistente. Desuden har frøskallen (*seed coat*) en vigtig

rolle. Også aktiviteten og tilstedeværelsen af andre svampe har betydning for vækst og produktion af OTA (afsnit 2.7 og 2.4.2). Häggblom & Gosh (1985) viser, at OTA-produktionen øges med stigende proteinindhold. Madhyastha *et al.* (1993) skriver på baggrund af en undersøgelse med hvede- og rapssorter, at forskellen på OTA-produktion kan skyldes både genetiske og miljømæssige faktorer.

I forsøgsopstillingen i delprojekt II vil problemstillingen angående artsdifference blive fulgt op.

Kontaminering 2001

Høsten 2001 var præget af megen nedbør. Dette kan have forårsaget den højere kontamineringsprocent for 2001 sammenholdt med 2000. Forskellig placering af rug og havre i lageret fra 2000 til 2001 kan også have haft indflydelse på kontamineringsgraden, mens udskiftning af sidekanalerne til metalbuer ikke umiddelbart ser ud til at have haft nogen betydning. Dette kan være et udtryk for at hovedkanalen stadig indeholder konidier, der infesterer kornet.

OTA-indhold 2000

Forekomsten af OTA 63 dage efter høst (5. udtagning) er meget markant i RTG (figur 3.4.10, 3.4.12 og 3.4.15) trods det, at kontamineringsprocenterne er forholdsvis lave (mindre end 8%). Der ses derfor ingen sammenhæng mellem høje forekomster af *P. verrucosum* og produktion af OTA, men snarere en understregning af, at OTA kan forekomme i store koncentrationer ved selv forholdsvis lave kontamineringsniveauer. I teori afsnittet henvises der til en reference med en lignende sammenhæng mellem lavt inokulum og højt mykotoksinindhold (Odamitten *et al.*, 1987) (iflg. Ominski *et al.*, 1994).

Resultaterne viser en markant tendens til, at lagringstiden har betydning for OTA-indholdet (figur 3.4.12). Dette er modsat Hökby *et al.* (1979), der konkluderer, at OTA må være produceret i marken og herefter forblive intakt under lagringen, eftersom forfatteren ikke fandt, at frekvensen af OTA-positive prøver var afhængig af tiden. Desuden mener Hökby *et al.* (1979), at frekvensen af OTA enten må være afhængig af geografiske/klimatiske eller sortsmæssige faktorer.

OTA-koncentrationerne fra 5. udtagning ligger på et niveau, der mig bekendt ikke er fundet tidligere i Danmark. Siden Fødevaredirektoratets overvågningssystem til bestemmelse af OTA i korn og mel blev sat i værk i 1986, er der ikke blevet rapporteret højere værdier af OTA end 121 ng/g (1987 i konventionelt dyrkede rugkerner).

OTA-målingerne er dog foretaget efter 18 måneders opbevaring ved 2°C i emballage, der ikke var helt lufttæt, og derfor optog kornet fugt fra omgivelserne. Müller og Boley (1992) har registreret, at OTA kan dannes ved 4°C og 22% vandindhold. Derfor kan det ikke udelukkes, at dannelsen af OTA kan være forekommet i kølerummet ved 2°C. I prøverne fra 1.-4. udtagning og rug, bundprøver i 5. udtagning blev der dog ikke detekteret OTA-forekomster højere end 1,1 ng/g, trods det, at prøverne blev opbevaret under samme betingelser, og at kontamineringsresultaterne viser, at *P. verrucosum* har været til stede. Medmindre der har været specielle forhold for rug, top-gennemsnitsprøverne fra 5. udtagning, f.eks. mikroklimatiske forhold i kølerummet eller konkurrenceforhold mellem mikroorganismer allerede før opbevaringen, tyder det ikke på, at OTA-dannelsen er forekommet i kølerummet.

Vandindhold sammenholdt med kontamineringsprocent og OTA-indhold 2001

Resultaterne viser, at det er prøver med det laveste vandindhold, der har de højeste kontamineringsprocenter (figur 3.4.8). Trods det, at samtlige prøver fra 2001 ligger under et vandindhold på 16%, er alle prøver positive for kontaminering med *P. verrucosum*. Desuden er der detekteret OTA i fire prøver fra anden udtagning (73 og 79 dage efter høst) med lavere vandindhold end 14% (figur 3.4.9). Der er dog ikke fundet høje OTA-værdier (maks. 0.4 ng/g) år 2001, og datasættet for OTA-analyse bygger på et lille antal prøver (8 prøver).

Det betyder, at svampeudvikling og -kontaminering samt OTA-dannelse kan finde sted eller har fundet sted, uanset om kornet har lavt vandindhold efter tørring og allerede ved høst har haft forholdsvis lavt vandindhold. Dette rækker ved teorien om, at det primært er ved våde høstår og i korn med højt vandindhold, at svampekontaminering og produktion af OTA kan finde sted. I betragtning af, at almindelig handelspraksis er max. 15% vandindhold for korn forhandlet i Danmark (Hougaard, H., landbrugstekniker, Foulum, samt "kontraktavl" udarbejdet i samarbejde mellem Drabæks Mølle og Brancheforeningen for Økologisk Planteavl), giver det stof til eftertanke.

Konklusion

Ud fra disse studier er det tydeligt, at det ikke kun er vandindhold og høstbetingelser, der er afgørende for udviklingen af *P. verrucosum* og produktionen af OTA.

Udover de tidligere nævnte fysiske, biologiske og genetiske årsager som fugtighed, temperatur, tid, tilstedeværelse af toksigene svampe, konkurrence fra andre svampe, artsforskelle m.m. (afsnit 2.4)

tyder resultaterne på, at der i dette lager også har været specielle årsager til forurening med *P. verrucosum* og dannelse af OTA. De specielle årsager kan have været:

- at blæseren var ude af drift i 7 dage, fra 18. dag efter høst år 2000
- at landmanden ikke har fået tørret kornet hurtigt nok ned
- at tørringsanlægget var forældet og ikke til at gøre ordentligt rent, hvorved en overførsel af *P. verrucosum*-konidier fra år til år har fundet sted
- at tørringsanlægget var noget specielt, idet der var anvendt hessiansække til at dække sidekanalerne

4. Delprojekt II: Kornarters modstandsdygtighed over for *P. verrucosum* ved spredning fra induceret enkeltkernehotspot

Formålet med det eksperimentelle projekt var at undersøge spredningen af *P. verrucosum* fra induceret hotspot i forskellige kornarter samt at studere svampefloradiversiteten.

4.1 Baggrund for forsøgsopstilling

Til forskel fra delprojekt I, der var et monitoringsprojekt, har vi i dette projekt konstrueret et semikontrolleret forsøgsdesign. Metalbeholdere simulerende minisiloer opstilledes i lager med tilsigtet naturlige lagerbetingelser. Minisiloerne indeholdt fire kornarter hhv. rug, havre, hvede og spelt. Kornet blev blandet med et parti overfladebeskadiget og opfugtet byg inokuleret med konidier af *P. verrucosum* (IBT 5062). Herved induceredes et praksisrelateret enkeltkernehotspot.

Kornet blev høstet år 2001 på to forskellige lokaliteter. Rug (Dominator) og havre (Revisor) har oprindelse fra gården, hvor jeg udtog prøver til mit første delprojekt (afsnit 3.1.1), mens hvede (Compleat), byg (Orthegea) og spelt (Oberkulmer Rotkorn) kommer fra det økologisk drevne Skovsgård Gods på Langeland. Spelt herfra blev valgt, idet Susanne Elmholt havde undersøgt prøver af spelt i store dele af Danmark. Spelten fra Skovsgård Gods havde en lav kontamineringsgrad med *P. verrucosum* (0 % for nytærsket korn) .

De forskellige geografiske oprindelsessteder gør, at kornet har forskellige vækst-, klima- høst-, tørrings- og lagringsvilkår. Høsten år 2001 var mange steder præget af en meget våd august. Området omkring den observerede bedrift fra delprojekt I havde en nedbørsmængde, der var 37 mm over normalen (afsnit 3.1.4), mens området omkring Skovsgård Gods i august havde en nedbørsmængde på 97 mm svarende til 30 mm over normalen (<http://djf-intranet.agrsci.dk/jbs/Klima/index.html> og Sørensen & Thysen, 2001). Begge steder blev kornet tørret på et plantørringsanlæg, men på Skovsgård Gods var anlægget af en helt anden, større dimension. Ved vurdering af kornarterne skal der desuden tages højde for sortsvalget. Det er muligt, at modtageligheden for *P. verrucosum* afspejler en sortsfølsomhed frem for eller ud over en artsvariation. Sorterne er typiske, økologiske sorter. Specielt gælder det for Oberkulmer Rotkorn (spelt), at såsæden er distribueret fra Bageriet Aurion, hvorfor det er denne sort, der anvendes på de økologiske bedrifter i Danmark.

En af årsagerne til, at spelt blev inddraget i forsøget, er dens morfologiske karakter. Spelt høstes i småaks med to til tre kerner. Kernerne er derfor beskyttet på en anden måde end f.eks. hvede og rug, der har ”nøgen” caryopsis (frugt). Spelt blev desuden valgt, fordi den er en gammel kornart, der

har fået en renæssance inden for det økologiske jordbrug. Spelt har ikke gennemgået en længere forædlingsproces, og muligvis har den bevaret nogle modstandsdygtige egenskaber over for svampeinficering. Endelig var spelt en af de centrale arter i et kommende forskningsprojekt. Rug og havre er valgt som opfølgning på mit første delprojekt, hvor der viste sig en statistisk forskel mellem kontamineringsprocenterne for de to arter. Havre er desuden fundet modstandsdygtig i tidligere studier (Abramson *et al.*, 1980). Endvidere er rug en vigtig afgrøde til økologisk brødkorn.

Hvede er ligeledes en vigtig afgrøde til brødkorn og interessant at medtage som parallel til Fødevederedirektoratets Overvågningsprogram (Jørgensen *et al.*, 1996; 2000 og Jørgensen & Jacobsen, 2002), der netop overvåger forekomsten af OTA i hvede og rug.

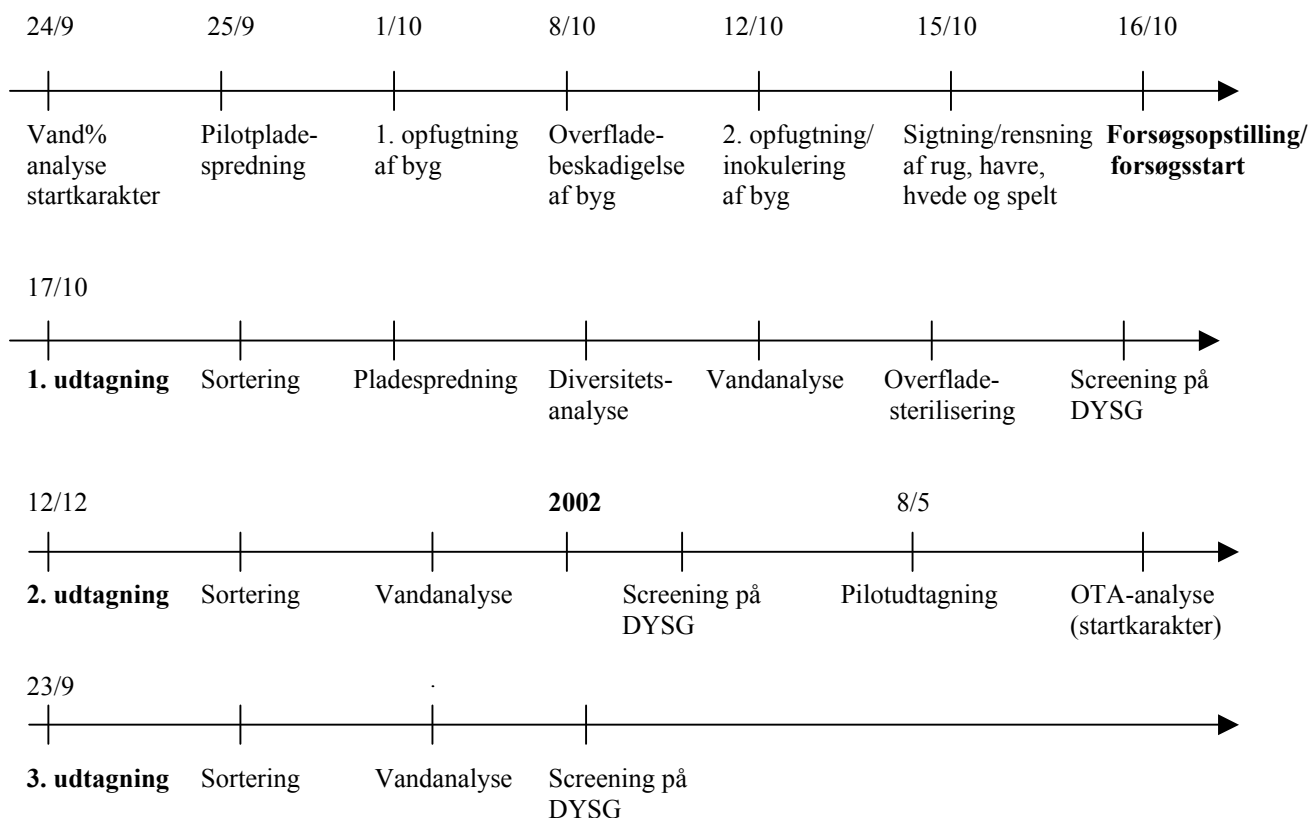
4.2 Materialer og metoder

4.2.1 Forberedelsesfase

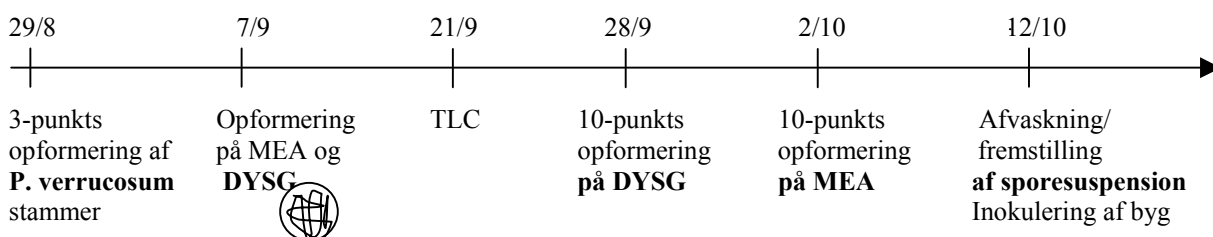
Forsøget var semikontrolleret, hvilket vil sige, at faktorer som vandindhold i inokulat og øvrige korn, andel af inokulat, sporekoncentration i inokulatet, kontamineringsprocent m.m. som udgangspunkt var styret. Efter forsøgsstart var faktorerne ukontrollerede -bestemt af omgivelserne og udviklingen i forsøget.

Forberedelserne til forsøgsopsætningen krævede et større organisatorisk arbejde. For at give et overblik over de vigtigste dele heraf henvises til nedenstående tidslinjer (Figur 4.2.1).

Tidslinje forberedelsesfase og udtagning af prøver



Tidslinje opformering og fremstilling af sporesuspension



Figur 4.2.1 Tidslinjer

4.2.2 Forberedelse af byginokulat og kontrolbyg

Fremstilling af konidiesuspension var et af de vigtige elementer i forberedelsesfasen. Forskriften beskrevet af Elmholt og Hestbjerg (1999) blev fulgt. Til forskel fra Elmholt og Hestbjergs procedure (1999) blev stamme IBT 5062 af *P. verrucosum* valgt. Ved kontrol af produktion for OTA, citrinin, og verrucolon på TLC gav dette isolat det bedste resultat. Podning, inkubering, afvaskning, filtrering, rotationsrystning m.m. kan følges på billederne 4.2.1-4.2.6.



Billede 4.2.1 Isolat 5062 på MEA og DYSG reversside



Billede 4.2.2 Inkubering af isolat på DYSG ved 20 °C



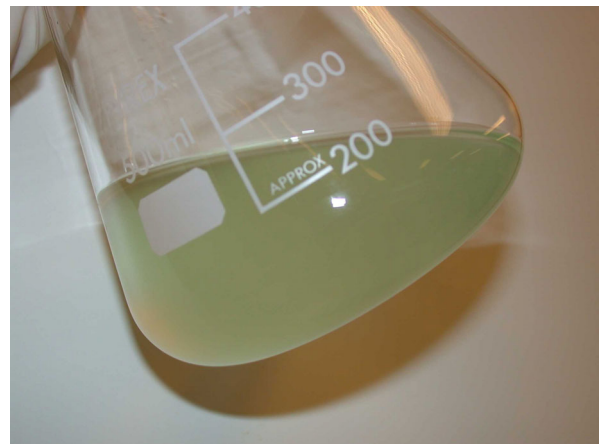
Billede 4.2.3 Afvaskning af konidier fra MEA



Billede 4.2.4 Filtrering i løst filter



Billede 4.2.5 Rystning af konidiesuspension endoverend med glaskugler



Billede 4.2.6 Fortyndet suspension til inokulat

Ved vurdering af suspensionens koncentration m.h.t. antal *P. verrucosum*-konidier pr. g korn anvendtes referencer, der havde koncentrationer fra 1000 til 100.000 konidier/g korn ved direkte inducering af konidier fra *P. verrucosum* (Harwig og Chen, 1974; Haggblom, 1982; Damoglou *et al.*, 1984; Müller og Boley, 1992 & Axberg *et al.*, 1997). Eftersom Axberg *et al.* (1997) beskrev et forsøg, der på flere måder mindede om vort, tog vi udgangspunkt heri. Axberg *et al.* havde anvendt en koncentration på 5000 konidier/g korn. Den endelige koncentration i suspensionen beregnedes til 2×10^5 konidier/g inokulat eller 4×10^6 konidier/ml. Det vil sige, at koncentrationen i inokulatet plus øvrige korn i hver minisilo lå mellem 9000 og 15000 konidier/g korn for henholdsvis rug og spelt afhængigt af volumenvægten (se beregninger i tabel 4.2.1).

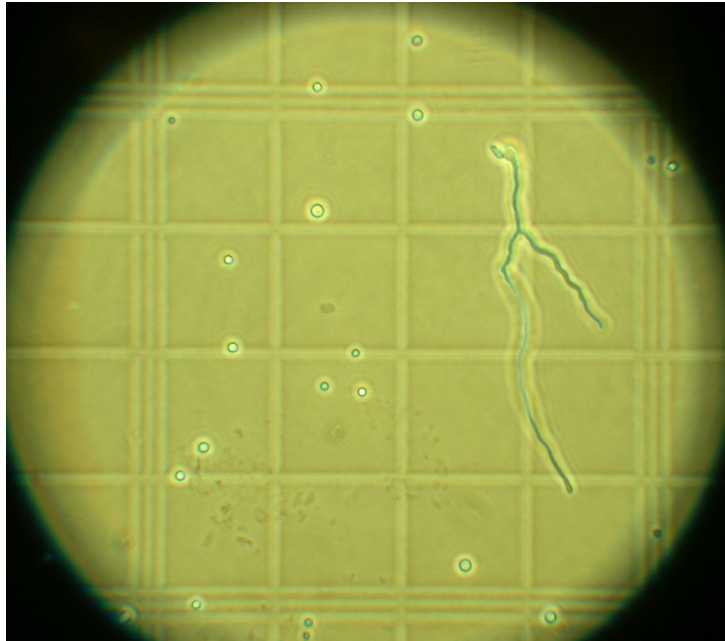
Tabel 4.2.1 Koncentrationsberegning for konidiesuspension til byginokulat.

Optalt antal konidier pr. lille kvadrat i hæmocytometer	=	15	= $1,5 \times 10^1$ konidier
Dvs. antal konidier pr. ml i original suspension (OS) (15 konidier x 1000 mm ³ /ml) / 0,00025 mm ³ (antal konidier x (omregning til ml)/ volumen pr. lille kvadrat)	=	60,000,000	= 6×10^7 konidier/ml
Totalt antal konidier i 100 ml original suspension	=	6,000,000,000	= 6×10^9 konidier
Konidier pr. g byg-inokulat (3000g) (6×10^9 konidier/3000g)	=	2,000,000	= 2×10^6 konidier/g
Eftersom koncentrationen er for høj, udtages der 10 ml af originalsuspensionen:			
Antal konidier ved 10 ml OS (6×10^7 konidier x 10 ml)	=	600,000,000	= $6,00 \times 10^8$ konidier
Antal konidier pr. ml ved 10 ml OS + 150 ml fortyndingsvæske (6×10^8 konidier/ 160 ml)	=	3,750,000	= $3,75 \times 10^6$ konidier/ml
*Antal konidier pr. 155 ml endelig suspension (155 ml x ($3,75 \times 10^6$ konidier/ml))	=	581,250,000	= $5,81 \times 10^8$ konidier
Konidier pr. g byg-inokulat (3000g) ($5,81 \times 10^8$ konidier/3000g)	=	193,750	= $1,94 \times 10^5$ konidier/g
For hvert rør: Konidier i byg-inokulat ($1,94 \times 10^5$ konidier/g x 130 g)	=	25,188,000	= $2,52 \times 10^7$ konidier
Konidier pr. g i byg-inokulat + øvrigt korn eks: ($2,52 \times 10^7$ konidier/ (130g byg + 2700g rug)	=	8,900	= $8,90 \times 10^3$ konidier/g
($2,52 \times 10^7$ konidier/ (130g byg + 1500g spelt)	=	15,452	= $1,55 \times 10^4$ konidier/g

*Der blev anvendt 10 ml OS + 150 ml fortyndingsvæske, 5 ml heraf blev udtaget til senere nøjagtig analyse for kimtal/ml. Byg til kontrol-led (3000g) tilførtes 155 ml postevand.

Kontroloptælling af inokulat efter, det havde stået en måned ved 2°C, viste 13 konidier \pm 0,5 (middel, \pm SEM, n = 12 tællinger).

Optælling af antal konidier i den endelige suspension, efter det havde stået en måned ved 2°C, viste et middelantal konidier pr. lille kvadrat i hæmacytometer på 13 konidier \pm 0,5 (middel, \pm SEM, n = 12 tællinger), hvilket dog ikke ændrer på den endelige koncentrationsberegning. Trods opbevaring ved 2°C var nogle af konidierne spiret. Konidieoptælling i Neubauer Improved hæmacytometer kan ses på billede 4.2.7 .



Billede 4.2.7 Lille kvadrat (0,05 x 0,05 mm) i hæmacytometer

Fremstilling af konidiesuspensionen blev udført i stinkskab med brug af handsker, kittel og gasmaske for at minimere kontakten med konidierne.

Før byggen blev induceret med sporesuspensionen, gennemgik den en overfladebeskadigelse og delvis en opfugtning.

Overfladebeskadigelsen foregik ved at blende 100 g byg ad gangen ved "low" hastighed i 5 sek. Herefter blev urenheder som græsfrø og løse frøskaller siet fra ved hjælp af en 2 mm sigte. Sigtningen foregik ved placering på rystemaskinen ved 350 mot/min i 1 min. Formålet med blendning var at øge kernernes sårbarhed og dermed vandoptagelsen og modtageligheden for *P. verrucosum* og herved øge kernernes potentiale som hotspot (se billede 4.2.8 og 4.2.9).



Billede 4.2.8 Beskadiget byg



Billede 4.2.9 Frasigtede, løse skaldele og urenheder efter beskadigelse af byg

Opfugtningen foregik af to omgange. Herved kunne der foretages kontrolmålinger under forløbet. Hensigten med at opfugte byggen var at opnå et vandindhold på ca. 21 %. Baggrunden for opfugtningen af inokulatet til ca. 21% er tidligere studier af blandt andet Sinha og Wallace (1965) og Shotwell (1975), der studerede hotspot under naturlige betingelser samt flere eksperimentelle forsøg. De eksperimentelle forsøg havde konstant vandindhold mellem 16 % og 26 % (Mislivec & Tuite, 1970; Harwig & Chen, 1974; Häggblom, 1982; Damoglou *et al*, 1984; Boley & Müller, 1986; Müller & Boley, 1992). På baggrund af erfaringer fra et pilotforsøg (appendiks 3.1) vurderedes det desuden, at inokulatet ikke skulle være for vådt, således at spredningen af *P. verrucosum* ikke skulle finde sted for hurtigt.

Proceduren for opfugtning af kornet er udformet efter Boley og Müller (1986) og Müller og Boley, (1991) og blev afprøvet ved pilotforsøget.



Kornet blev vejet og tilført vand efter beregning (se eks. på beregning i appendiks 3.2). Postevand fordeltes jævnt ad 10 ml med titrerpipette vha. drypfunktionen titrate (se billede 4.2.10). Mellem hver vandtilførsel blev byggen blandet i 2 min i en specialbygget jordblander. Efter opfugtningerne blev byggen opbevaret ved 2°C i 3 dage. I de 3 dage omrystedes byggen i en halv time pr. dag for at sikre homogenisering. Ved sidste opfugtning blev byggen delt i to, én til kontrol og én til inokulering med *P. verrucosum*. Hver af de to portioner blev tilført den samme mængde vand, men til inokulatet tilførtes væske i form af konidiesuspension (se tabel 4.2.1 og billede).

Billede 4.2.10 Tildrypning af konidiesuspension til inokulat

4.2.3 Forberedelse af det øvrige korn

Under forberedelserne til opstillingen af forsøget blev det øvrige korn analyseret for vandindhold. Det skete for at sikre et ensartet udgangspunkt. Målet var, at kornet skulle have et vandindhold på max. 15 % for at efterkomme almindelig handelspraksis for korn forhandlet i Danmark (Hougaard, landbrugstekniker, DJF-Foulum) og simulere en optimal tørring. Vandindholdet i havre og hvede lå over 15 %, da det blev afhentet. Derfor blev disse to kornarter tørret ned i et mini-plantørringsanlæg på Bygholm (tabel 4.2.2).

Tabel 4.2.2. Forberedelsesfase (25.09.02): Vandbestemmelse af korn til minisiloerne

Kornart	Sort	Høstår	Volumen- vægt (kg/m ³)	Vandindhold middelværdi (25.09.01) (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)	Vandindhold (01.10.01)** (%)
Rug	Dominator	2001	773	14,54	0,22	0,13	
Havre	Revisor	2001	502	18,27	0,20	0,12	14,7
Hvede	Compleat	2001	778	16,17	0,16	0,09	14,3
Spelt kerner	Oberkulmer	2001					
	Rotkorn			14,23*	0,12	0,07	
Spelt småaks	”	2001	430	14,23*	0,12	0,07	
Byg kontrol	Orthegea	2001	718	14,92	0,08	0,05	

* Resultat på baggrund af en blandet speltprøve.

** Efter nedtørring på Bygholm.

Umiddelbart før sammenblanding af de forskellige kornarter med byginokulatet og kontrolbyg blev der igen udtaget en repræsentativ prøve til startkarakterisering af kornet. Prøverne blev analyseret for vandindhold, kontamineringsprocent og OTA (se tabel 4.2.3).

For ligeledes at simulere optimale betingelser blev alt kornet ved sigtning rensat for urenheder (se billeder 4.2.11 og 4.2.12).

Tabel 4.2.3. Startkarakterisering (15.10.01) af korn anvendt i minisiloerne (udtaget umiddelbart før sammenblanding med byg)

Kornart	Sort	Høstår	Kontaminering (%)	OTA (ng/g)	Vandindhold middelværdi (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)
Rug	Dominator	2001	1	0,00	15,75	0,09	0,05
Havre	Revisor	2001	1	0,20	14,06	0,10	0,06
Hvede	Complet	2001	0	0,00	14,44	0,07	0,04
Spelt kerner	Oberkulmer	2001	2	0,26*	14,65**		
	Rotkorn						
Spelt småaks	”	2001	3	0,26*	14,64	0,02	0,01
Byg kontrol	Orthegea	2001	0	0,00	20,15	0,19	0,11
Byg Inkuberet	”	2001	99	Ikke eks.	Ikke eks.		

* Resultat på baggrund af en blandet speltprøve.

** Kun én gentagelse.



Billede 4.2.11 Frasigtet materiale fra havre



Billede 4.2.12 Sigtning af spelt

4.2.4 Opstilling af forsøg

Proceduren for opstilling af forsøget er beskrevet i detaljer i vedlagt appendiks 3.3 og billeder 4.2.13-4.2.16.

Kort beskrevet blev kornet hhv. rug, hvede, havre og spelt roteret i jordblander og afvejet efter beregning ud fra volumenvægt og ud fra volumen svarende til 95% af minisilo-rørene.

Byggen roteredes og blev herefter tilsat det øvrige korn. Derefter roteredes først kontrolrørene og sidst rørene med inokulatet. Hvert rør roteredes i 2 min. Af frygt for at *P. verrucosum* skulle spredes for hurtigt og ud fra erfaringer med pilotforsøget blev 5 % af volumen i minisiloerne valgt som

andel af inokulum. Efter rotation af hver portion korn for hver minisilo blev rotatorspenden støvsuget og rengjort med sprit.



Billede 4.2.13 Fire kornarter klar til opblanding



Billede 4.2.14 Opblanding af korn. Låget lægges på jordblander



Billede 4.2.15 Temperaturlogger tilpasses dybde



Billede 4.2.16 Tildækning med klæde

Forsøget gennemførtes med 3 gentagelser for både korn med inokuleret byg (BI) og kontrolbyg (BK). Det vil sige 3 x havre med inokuleret byg (HI) + 3 x havre med kontrolbyg (HK) og så fremdeles med det øvrige korn, i alt 24 minisiloer.

Herudover blev der opsat ekstra rør til kontrol af temperatur (PT 100 følere) og fugtighed (Vaisala-måler) samt til analyser af luftpermeabilitet. Hensigten med disse ekstra rør var, at de skulle stå uberørte under hele forsøget. Desuden blev der placeret temperaturloggere i otte af minisiloerne med hhv. BI og BK.

Minisiloerne placeredes på betongulv i et uopvarmet lager, hvor vognporten ofte står åben, således at der var påvirkning fra udendørs temperatur og fugtforhold. Rørene dækkedes af et stykke tæt væv, sort stof.

Under tilførsel af byginokulat blev der af sikkerhedsmæssige årsager anvendt kittel, handsker, støvmaske samt hårpose.

Til forsøget anvendtes 4L's konserverdåser uden låg. Dåserne fandtes optimale, dels fordi de er godkendte til fødevarer og derfor ikke afgiver uønskede stoffer, dels er de mulige at rengøre, de er vandtætte, og de er af et materiale, der kan simulere kornsiloer. Minisiloerne simulerede dog ikke forhold, hvor korn bliver lagret i flere meters højde. Dette ville kræve, at kornet var blevet presset sammen eller lå under tryk.

4.2.5 Prøvetagningsprocedure

Proceduren for prøveudtagningerne er beskrevet i detaljer i vedlagt appendiks 3.4 og billede 4.2.17.

Der blev foretaget tre egentlige udtagninger og en stikprøveudtagning (tabel 4.2.4). På grund af de meget lave kontamineringsresultater i 2. udtagning blev 3. udtagning udsat.

Centralt ved udtagningerne var, at der blev forstyrret lige meget i hvert rør uanset kornart. Med et kornspyd blev der stukket det antal gange, der svarede til udtagningen i spelt. Spelt var den kornart, hvor kernerne "løb" dårligst ind i kornspyddet og derfor krævede flest stik.



Billede 4.2.17 Udtagning af prøver

Tabel 4.2.4 Tidspunkter for forsøgsopstart og udtagninger

	Forsøgsopstart	1. udtagning	2. udtagning	Stikprøve-udtagning	3. udtagning
Dato	17. oktober 2001	18.-19. oktober 2001	12. december 2001	8. maj 2002	23.-24. september 2002
Udtaget antal uger efter opstart		0 uger	11 uger	32 uger	52 uger

For ikke at udtage unødvendigt korn i de øvrige kornarter blev der efter udtagning af den beregnede mængde kerner stukket med kornspydets modsatte ende uden at udtage kerner. Antallet af kerner pr. udtagning blev beregnet ud fra, at der skulle tages prøver til hhv. OTA-analyse, ergosterol-analyse, vandindholdsanalyse, udlægning på DYSG og pladespredning.

Efter udtagningen blev byggen sorteret fra de øvrige kerner for at afbryde kontamineringen.

4.3 Analysemetoder

Mikrobiologisk analyse for *P. verrucosum*

Kornprøverne blev screenet for kontaminering med *P. verrucosum* ved direkte udlægning på DYSG-agar. Med undtagelse af antal udlagte kerner (n=100) svarede proceduren til screeningen af kornet i projektdel I. Forskriften er beskrevet i metodeafsnit 2.2.2.

Overfladesterilisering

Metoden blev benyttet til startkarakterisering ved første udtagning. Vi fik herefter som beskrevet i metodeafsnit 2.2.10 og diskussionsafsnit 4.5 mistanke om, at *P. verrucosum* ikke overlevede overfladesteriliseringen. Derfor blev de efterfølgende udtagninger ikke fulgt op med overfladesteriliseringer. Proceduren blev fulgt som beskrevet i metodeafsnit 2.2.10.

Vandbestemmelse

Vandindholdet i kornet blev bestemt ud fra retningslinierne beskrevet i metodeafsnit 2.2.9. Ved hver udtagning blev kornet analyseret. Bestemmelse af vandindholdet i bygkernerne ved 2. og 3. udtagning blev foretaget ud fra bygkerner, der var frasorteret de øvrige kornarter. Byg fra 1. udtagning er ikke analyseret. Bestemmelse af vandindholdet ved 3. udtagning blev foretaget af miljøtekniker J.M. Nielsen. For at spare tid blev analysen foretaget vha. en stenkværn og kun med to gentagelser.

Pladespredning

Pladespredning af korn fra samtlige minisiloer blev foretaget umiddelbart efter første prøveudtagning. Forskriften for isolering af mikrosvampe ved pladespredning beskrevet i metodeafsnit 2.2.3 blev fulgt. Til fremstilling af suspensionen anvendtes 10 g korn og 25 ml postevand, der blev hældt på 100 ml ”blue cap”-flasker og rystet på rystemaskine ved en hastighed på 250 ”cirkelbevægelser” pr. min. i 1 time.

På baggrund af en pilotpladespredning var fortyndingsgraden fastlagt. For hver prøve fra minisiloerne udpladedes der to fortyndingsniveauer med tre gentagelser. Byginokulatet havde ikke været med i pilotpladespredningen. Derfor blev prøverne fra byggen udpladet i fire fortyndingsniveauer med to gentagelser. Både DYSG og V8 blev anvendt som substrat. DYSG-petriskålene blev inkuberet i 7 dage i mørke ved 25°C, mens V8-petriskålene blev inkuberet først 3 dage i mørke og herefter 3 dage med skiftevis UV/mørke (12/12 h) ved 22°C for at fremme sporuleringen. Herefter blev skimmel og gær optalt.

Diversitet

Det oprindelige formål var at belyse svampediversitet under lagring ved at foretage pladespredning ved 1. og 3. udtagning. Af tidsmæssige årsager nedprioriterede vi det oprindelige formål, hvorved studiet af svampediversiteten fik det formål, at jeg skulle stifte bekendtskab med forskellige svampearter. Til bestemmelsen udvalgte én V8-petriskål fra hver af minisiloerne i henholdsvis rug, havre og byg fra 1. udtagning. Valgene blev gjort med henblik på at undersøge flest mulige arter. Til studie af makro- og mikromorfologiske karakterer blev der mikroskopet efter de gængse metoder med stereo- og transmissionsmikroskop. Domsch *et al.* (1980); Simmons (1992); Andersen (1995); Samson *et al.* (2000) anvendtes som bestemmelsesværker.

Statistik

Resultaterne fra udtagningerne har ikke positive *P. verrucosum*-observationer nok til, at de statistiske modeller er anvendelige og kan kontrolleres, hvorfor der ikke er foretaget statistiske beregninger i delprojekt II.

4.4 Resultater

4.4.1 Screening for kontaminering med *P. verrucosum*

Startkarakteriseringen viser en naturlig kontamination med *P. verrucosum* i speltkerner og -småaks, rug og havre. I hveden og bygkontrollen detekteres *P. verrucosum* ikke.

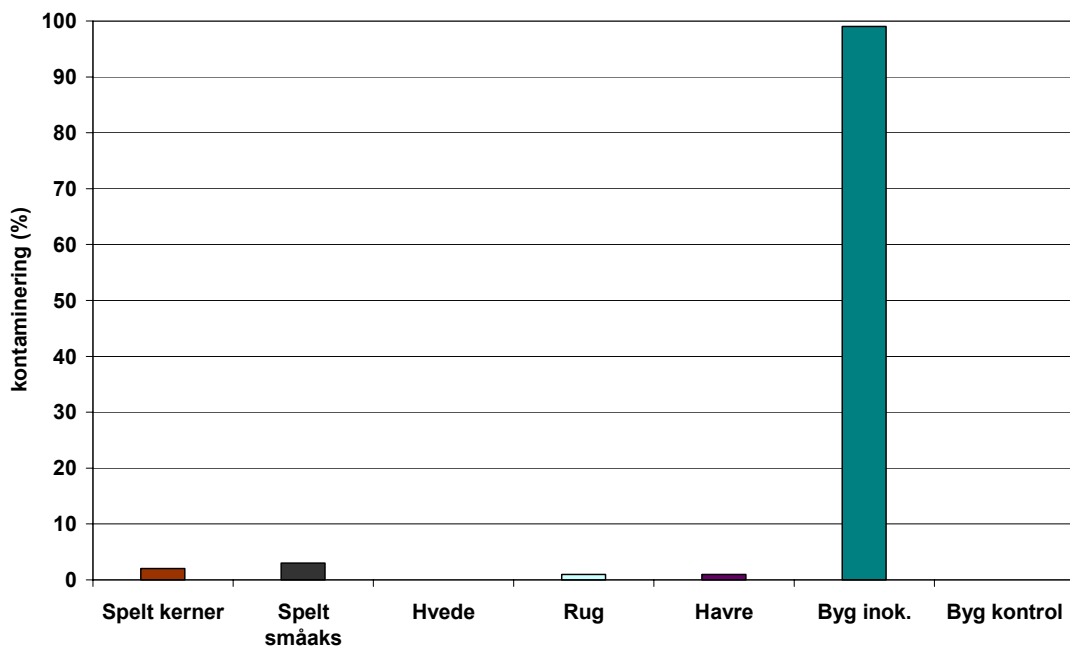


Billede 4.4.1 Tredje udtagning spelt, småaks, kontrol, forside



Billede 4.4.2 Tredje udtagning spelt, småaks, kontrol, bagside

Inokulering med *P. verrucosum* i byggen ser ud til at være lykkedes, da kontamineringsprocenten er på 99 % ved startkarakteriseringen (se figur 4.4.1).



Figur 4.4.1 Startkarakter for kornet. Resultaterne viser kontaminering af kerner med *P. verrucosum* i procent af udlagte kerner ($n = 100$) umiddelbart før sammenblanding med byggen.

Generelt er kontamineringsniveauet i kornarterne lavere end forventet under hele forsøget. Maksimumværdien ligger på 6 % for spelt-småaks med inokuleret byg (SSI) i 11. uge (2. udt.) (tabel 4.4.1-4.4.3) og speltkerner med inokuleret byg (SKI) i 52. uge (3. udt.). Spelt-småaks med kontrolbyg (SSK) har dog også værdier på op til 5 % i 11. uge.

Table 4.4.1 Vandindhold og kontaminering (%) i korn fra minisiloerne ved 1. udtagning (0. uge)

Minisilo nr.	Kornart	Med inokuleret byg/kontrol	Kontaminering (%)	Vandindhold middelværdi ¹⁾ (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)	Vandindhold middelværdi ²⁾ (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)
4	Rug	kontrol	0	14,8	0,1	0,1			
7	Rug	kontrol	1	14,8	0,0	0,0			
10	Rug	kontrol	0	14,8	0,0	0,0	14,7	0,0	0,0
1	Rug	inok.	1	14,8	0,0	0,0			
5	Rug	inok.	1	14,7	0,1	0,1			
9	Rug	inok.	3	15,0	0,1	0,0	14,8	0,1	0,1
11	Havre	kontrol	0	13,1	0,1	0,1			
14	Havre	kontrol	1	14,5	3,4	2,0			
17	Havre	kontrol	0	12,9	0,1	0,0	13,5	0,9	0,5
8	Havre	inok.	0	13,0	0,2	0,1			
12	Havre	inok.	-	12,9	0,1	0,1			
16	Havre	inok.	1	12,5	0,1	0,0	12,8	0,2	0,1
18	Hvede	kontrol	1	13,7	0,1	0,1			
21	Hvede	kontrol	0	13,8	0,1	0,1			
24	Hvede	kontrol	2	13,7	0,1	0,1	13,7	0,1	0,0
15	Hvede	inok.	0	13,6	0,1	0,1			
19	Hvede	inok.	0	13,7	0,0	0,0			
23	Hvede	inok.	0	13,7	0,0	0,0	13,7	0,1	0,0
25	Speltkerner	kontrol	0	14,9	0,1	0,1			
3	Speltkerner	kontrol	3	14,9	0,1	0,1			
6	Speltkerner	kontrol	3	14,7	0,1	0,0	14,8	0,1	0,1
25	Spelt-småaks	kontrol	0	14,1	0,3	0,1			
3	Spelt-småaks	kontrol	1	13,8	0,2	0,1			
6	Spelt-småaks	kontrol	2	13,8	0,1	0,0	13,9	0,2	0,1
2	Speltkerner	inok.	5	14,9	0,2	0,1			
22	Speltkerner	inok.	2	15,2	0,0	0,0			
20	Speltkerner	inok.	4	15,4	0,1	0,1	15,2	0,3	0,1
2	Spelt-småaks	inok.	4	14,4	0,1	0,1			
20	Spelt-småaks	inok.	1	14,4	0,1	0,0			
22	Spelt-småaks	inok.	1	14,2	0,1	0,0	14,3	0,1	0,1
Byg	Frasort.	kontrol	0	ikke eks.					
Byg	Frasort.	inok.	24	ikke eks.					

1) Middelværdi på baggrund af tre gentagelser.

2) Middelværdi på baggrund af de tre foregående middelværdier.

Tabel 4.4.2 Vandindhold og kontaminering (%) i korn fra minisiloerne ved 2. udtagning (11. uge)

Minisilo nr.	Kornart	Med inokuleret byg/ kontrol	Kontamine-ring (%)	Vandindhold middelværdi ¹⁾ (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)	Vandindhold middelværdi ²⁾ (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)
4	Rug	kontrol	0	14,5	0,1	0,1			
7	Rug	kontrol	0	14,4	0,1	0,0			
10	Rug	kontrol	0	14,9	0,2	0,1	14,6	0,3	0,2
1	Rug	inok.	0	14,6	0,1	0,0			
5	Rug	inok.	0	14,6	0,2	0,1			
9	Rug	inok.	0	14,5	0,2	0,1	14,6	0,1	0,0
11	Havre	kontrol	0	13,1	0,0	0,0			
14	Havre	kontrol	0	12,8	0,1	0,1			
17	Havre	kontrol	0	13,0	0,1	0,1	13,0	0,1	0,1
8	Havre	inok.	0	13,1	0,1	0,0			
12	Havre	inok.	0	13,2	0,1	0,0			
16	Havre	inok.	0	13,1	0,1	0,1	13,1	0,1	0,1
18	Hvede	kontrol	0	13,9	0,0	0,0			
21	Hvede	kontrol	0	13,8	0,2	0,1			
24	Hvede	kontrol	0	13,9	0,1	0,0	13,8	0,1	0,0
15	Hvede	inok.	0	13,7	0,0	0,0			
19	Hvede	inok.	0	13,7	0,0	0,0			
23	Hvede	inok.	0	13,9	0,2	0,1	13,8	0,1	0,1
25	Speltkerner	kontrol	1	14,4 ⁴⁾					
3	Speltkerner	kontrol	0	14,0 ⁴⁾					
6	Speltkerner	kontrol	2	13,7 ³⁾	0,3	0,2	14,0	0,3	0,2
25	Spelt-småaks	kontrol	5	13,6	0,1	0,0			
3	Spelt-småaks	kontrol	4	13,5	0,2	0,1			
6	Spelt-småaks	kontrol	2	13,3	0,1	0,1	13,5	0,2	0,1
2	Speltkerner	inok.	4	Ikke eks.					
22	Speltkerner	inok.	0	13,9 ⁴⁾					
20	Speltkerner	inok.	3	13,0 ⁴⁾			13,5	0,6	0,5
2	Spelt-småaks	inok.	1	13,1	0,2	0,1			
20	Spelt-småaks	inok.	2	13,1	0,2	0,1			
22	Spelt-småaks	inok.	6	13,4	0,2	0,1	13,2	0,2	0,1
Byg	Frasort.	kontrol	0	13,9	0,0	0,0			
Byg	Frasort.	inok.	10	13,7	0,1	0,0			

1) Middelværdi på baggrund af tre gentagelser.

2) Middelværdi på baggrund af de tre foregående middelværdier.

3) Middelværdi på baggrund af to gentagelser.

4) Vandanalyse på baggrund af én gentagelse.

Tabel 4.4.3 Vandindhold og kontaminering (%) i korn fra minisiloerne ved 3. udtagning (52. uge)

Minisilo nr.	Kornart	Med inokuleret byg/ kontrol	Kontaminering (%)	Vandindhold middelværdi ¹⁾ (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)	Vandindhold middelværdi ²⁾ (%)	Standard Deviation (SD)	Standard Error of Mean (SEM)
4	Rug	kontrol	2	18,5	0,1	0,1			
7	Rug	kontrol	0	17,9	0,1	0,1			
10	Rug	kontrol	0	18,5	0,2	0,1	18,3	0,4	0,2
1	Rug	inok.	0	17,6	0,2	0,1			
5	Rug	inok.	0	18,4	0,2	0,2			
9	Rug	inok.	0	18,6	0,0	0,0	18,2	0,5	0,3
11	Havre	kontrol	0	15,9	0,5	0,3			
14	Havre	kontrol	1	17,0	0,5	0,3			
17	Havre	kontrol	0	16,2	0,2	0,2	16,4	0,6	0,3
8	Havre	inok.	1	17,3	0,6	0,4			
12	Havre	inok.	0	17,3	0,7	0,5			
16	Havre	inok.	1	16,9	0,2	0,1	17,2	0,2	0,1
18	Hvede	kontrol	0	17,5	0,3	0,2			
21	Hvede	kontrol	0	17,1	0,4	0,3			
24	Hvede	kontrol	0	16,8	0,1	0,1	17,1	0,3	0,2
15	Hvede	inok.	0	18,3	0,1	0,0			
19	Hvede	inok.	0	17,4	0,2	0,1			
23	Hvede	inok.	0	18,2	0,3	0,2	18,0	0,5	0,3
25	Speltkerner	kontrol	3	Ikke eks.					
3	Speltkerner	kontrol	4	Ikke eks.					
6	Speltkerner	kontrol	1	Ikke eks.					
25	Spelt-småaks	kontrol	0	14,8	0,3	0,2			
3	Spelt-småaks	kontrol	0	15,1	0,5	0,3			
6	Spelt-småaks	kontrol	3	13,9	0,9	0,6	14,6	0,6	0,4
2	Speltkerner	inok.	2	Ikke eks.					
20	Speltkerner	inok.	2	Ikke eks.					
22	Speltkerner	inok.	6	Ikke eks.					
2	Spelt-småaks	inok.	0	16,5	1,0	0,7			
20	Spelt-småaks	inok.	1	15,3	0,5	0,3			
22	Spelt-småaks	inok.	2	15,2	0,7	0,5	15,7	0,7	0,4
Byg	Frasort.	kontrol	0	18,8	0,3	0,2			
Byg	Frasort.	inok.	45	19,6	0,1	0,1			

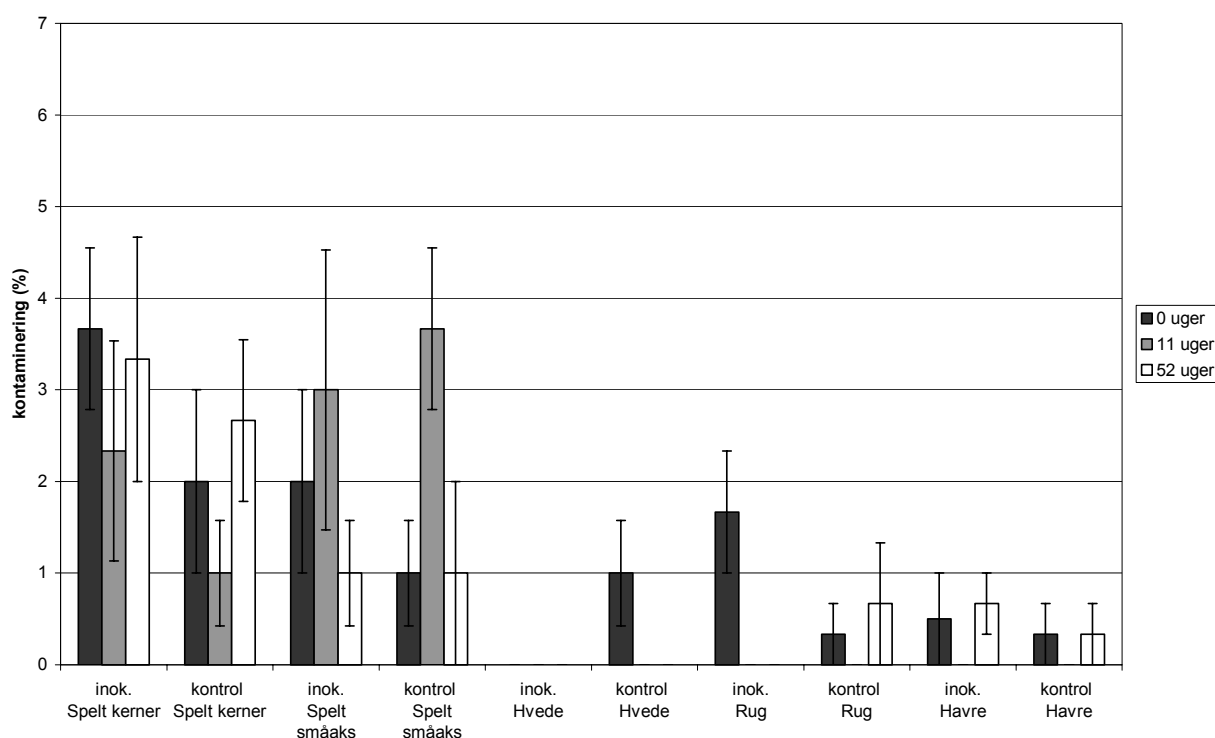
1) Middelværdi på baggrund af to gentagelser.

2) Middelværdi på baggrund af de tre foregående middelværdier.

Spelt har de højeste værdier for kontaminering under hele forløbet. Ved 11. uge er det kun i spelten, at *P. verrucosum* er registreret.

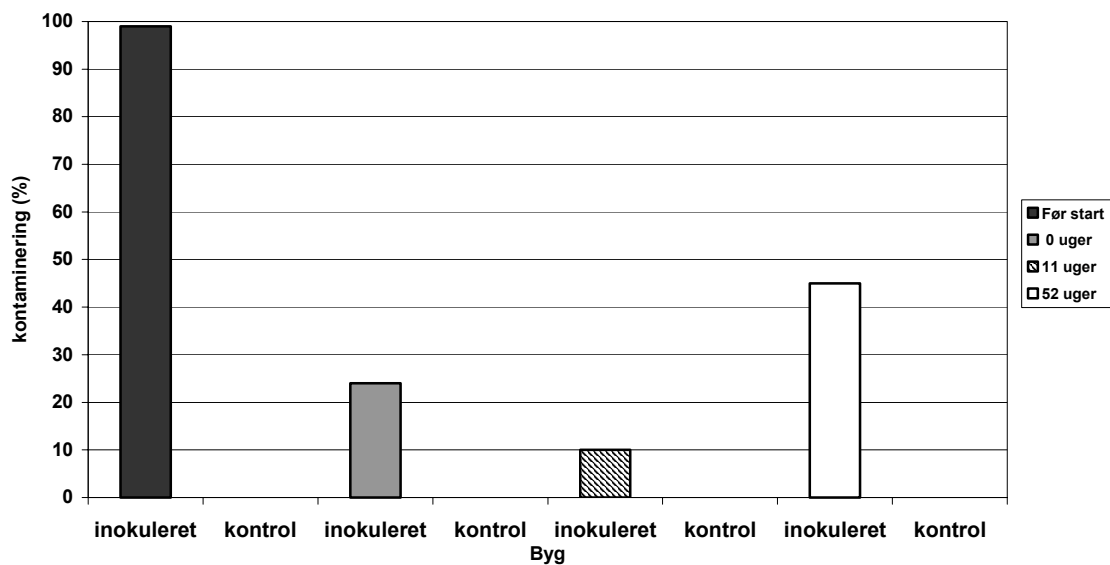
Det er bemærkelsesværdigt, at hvede med inokuleret byg (HVI) ikke bliver kontamineret med *P. verrucosum* under hele forsøgsgangen, mens hvede med kontrolbyg (HK) viser kontaminering på 1% ved forsøgsstart.

Rug og havre viser lave kontamineringsprocenter ved forsøgsstart og 52. uge. Figur 4.4.2 giver en samlet oversigt over udviklingen fra forsøgsstart til afslutningen 52 uger efter.



Figur 4.4.2 Middelværdier af datasættene fra 1.-3. udtagning (middel, +SEM, n = 3 minisiloer). Resultaterne viser udvikling i kontaminering med *P. verrucosum* fra forsøgsopstart til afslutning 52 uger senere. (Inok. betegner forsøgsled med inokuleret byg).

BK (tabel 4.4.1-4.4.3) viser ikke på noget tidspunkt kontaminering med *P. verrucosum*. BI havde en høj kontamineringsprocent, før det blev blandet i minisiloerne. Herefter faldt det markant til 10 % efter 11 uger. Ved 3. udtagning, efter 52 uger, var kontamineringsprocenten 45 % (figur 4.4.3).

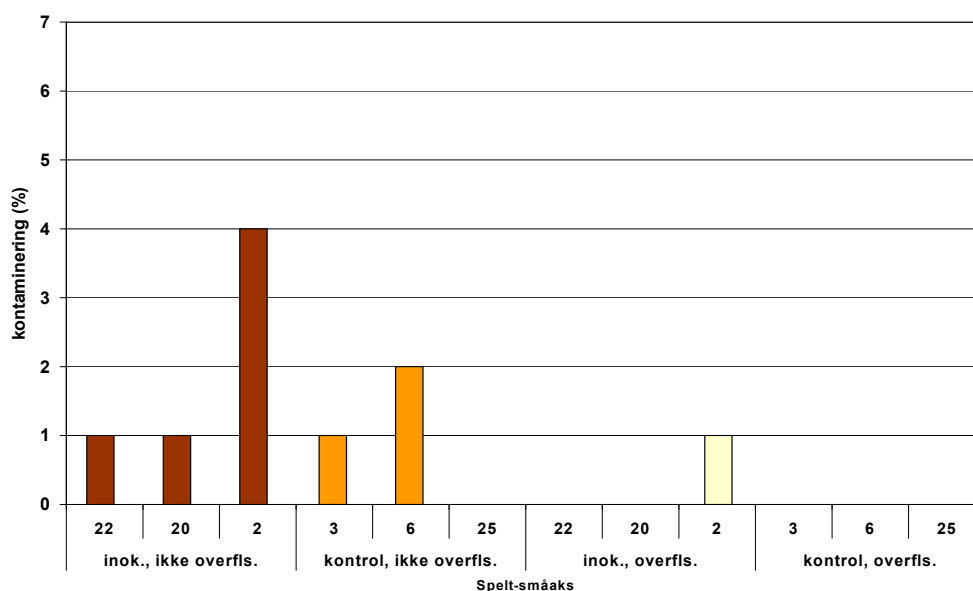


Figur 4.4.3 Inokuleret byg og kontrol byg i hele forsøgsperioden

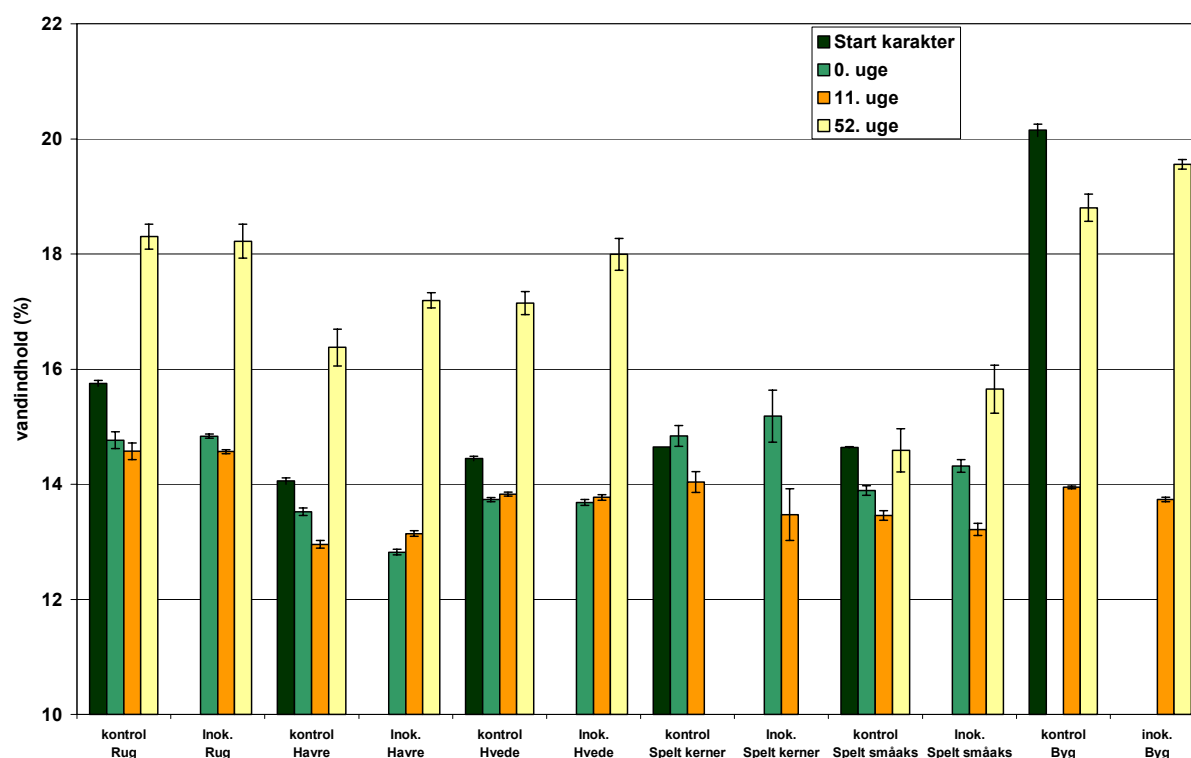
Ved en stikprøveudtagning i fire rør, som havde stået uberørt i 32 uger (app. 3.5), havde BI en kontamineringsprocent på 69 %.

4.4.2 Overfladesterilisering

Figur 4.4.4 illustrerer resultater, hvor spelt er blevet overfladesteriliseret. I et tilfælde ved SSI detekteres *P. verrucosum* ved én kerne (ud af 100) efter overfladesterilisering. Ved de øvrige prøver er *P. verrucosum* ikke registreret.



Figur 4.4.4 Spelt-småaks henholdsvis inokulerede og kontrolprøver samt overfladesteriliserede og ikke overfladesteriliserede fra 1. udtagning (2 dage efter forsøgsopsætning). (Inok. betegner forsøgsled med inokuleret byg).



Figur 4.4.5: Middelværdier for hver kornart før og under forsøgsgangen i minisiloerne. Resultaterne viser middel-vandindholdet for rug, havre, hvede, speltkerner, spelt-småaks og byg henholdsvis kontrol- og inokuleret korn fra startkarakter til tredje udtagning (52. uge) (middel, \pm SEM, $n = 3$ for startkarakter, 0. uge og 11. uge, men $n = 2$ for 52. uge). Af sikkerhedsmæssige årsager blev der ikke målt vandindhold på startkarakteriseringen af den inokulerede byg. Inok. betegner forsøgsled med inokuleret byg.

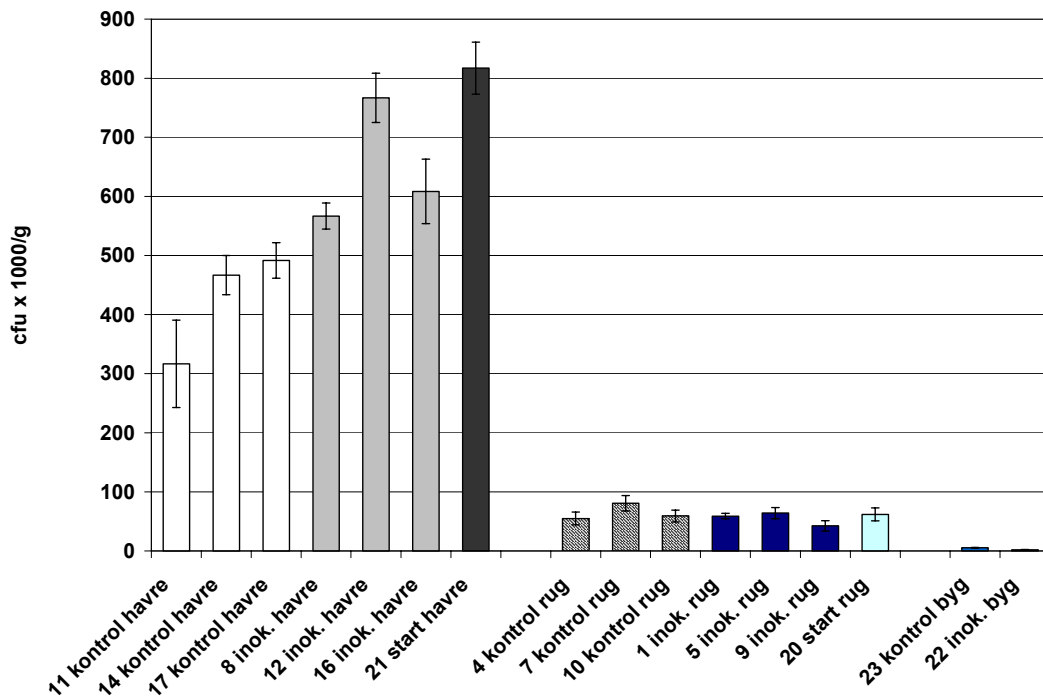
4.4.3 Vandbestemmelse

Figur 4.4.5 og tabel 4.4.1-4.4.3 illustrerer middelværdierne for samtlige resultater. Der er en tendens til, at vandindholdet falder efter forsøgsstart for at stige igen sidst i forsøgsperioden. Der ses et fald i vandindhold fra startkarakteren er udtaget til 1. udtagning, 2 dage efter, og igen et fald til 11. uge (2. udt.) i særdeleshed for byg. Ved 52. uge (3. udt.) er vandindholdet i alle prøverne bortset fra speltprøverne steget markant til over 16 % i vandindhold. Bemærkelsesværdige er bygprøverne, der er steget fra knap 14 % til hhv. 18,8 % og 19,6 % for BK og BI.

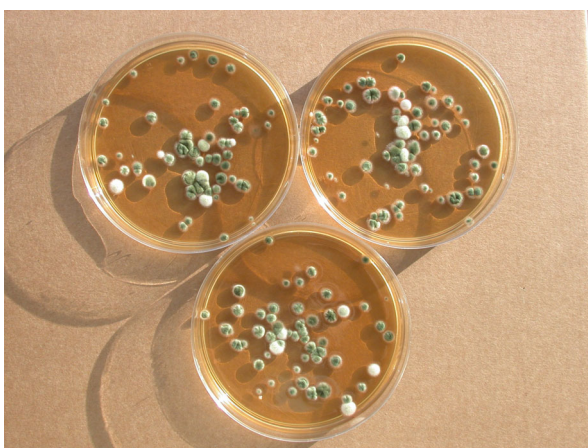
4.4.4 Pladespredning

Resultaterne fra pladespredning er vist i figur 4.4.6, billederne 4.4.3 og 4.4.4 herunder samt appendiks 3.6 Med forbehold for, at det er forskellige fortyndingsniveauer, der er anvendt, er der

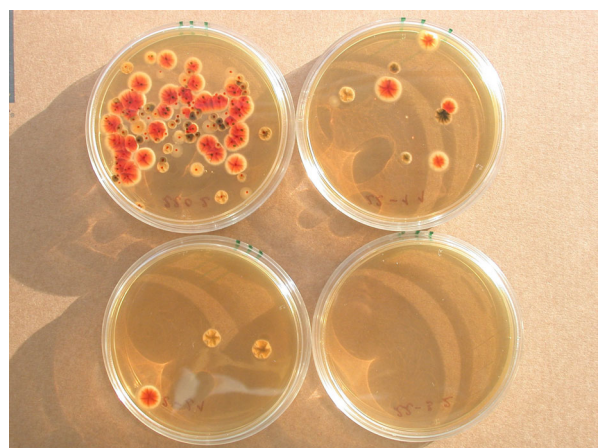
markante forskelle mellem kornarterne. Skimmelværdierne er langt højere i havren end i både rug og byg. Kun i BI er *P. verrucosum* registreret.



Figur 4.4.6 Skimmel-cfu på V8. Samlet datasæt for pladespredning af korn fra minisiloerne efter første udtagning. Resultaterne viser middelværdier af gentagelser på V8 (middel, \pm SEM, $n = 2$ for prøve 22 og 23, $n = 3$ for øvrige prøver). Resultaterne for havreprøverne er beregnet ud fra en decimalfortynding på 10^{-3} , mens resultaterne for rugprøverne er beregnet ud fra en decimalfortynding på 10^{-2} . Prøve 23, byg-kontrol og 22, byg-inokuleret er beregnet ud fra 10^{-1} . (Inok. betegner forsøgsled med inokuleret byg).



Billede 4.4.3 Tre gentagelser af nr. 21 (start havre) på DYSG (10^{-2} fortynding)



Billede 4.4.4 Pladespredning af byginokulatet, fire fortyndinger

4.4.5 Diversitet

Resultater fra diversitetsanalysen er opgjort i appendiks 3.7. Der ses ingen bemærkelsesværdig forskel mellem diversiteten i havre og rug. Begge kornarters svampeflora er karakteriseret af *Cladosporium* og *Alternaria*, som er typisk marksvampeflora. *Aureobasidium* sp. fandtes kun i rugen, hvorimod *Fusarium* ikke fandtes her. Billederne 4.4.5-4.4.8 viser et udpluk af de observerede svampe.

Resultaterne skal ses i betragtning af, at kornet er fra 1. udtagning, og at formålet med øvelsen var at få kendskab til forskellige svampearter.



Billede 4.4.5 Pladespredning fra minisilo nr. 14 7 (havrekontrol), 10^3 fortynding (*Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp.)



Billede 4.4.6 Pladespredning fra minisilo nr. (rug kontrol) 10^2 fortynding, (*Alternaria* sp., *Arthrinium* sp., *Aureobasidium* sp. og *Cladosporium* sp.)



Billede 4.4.7 Mikromorfologiske karakterer, *Alternaria* sp.

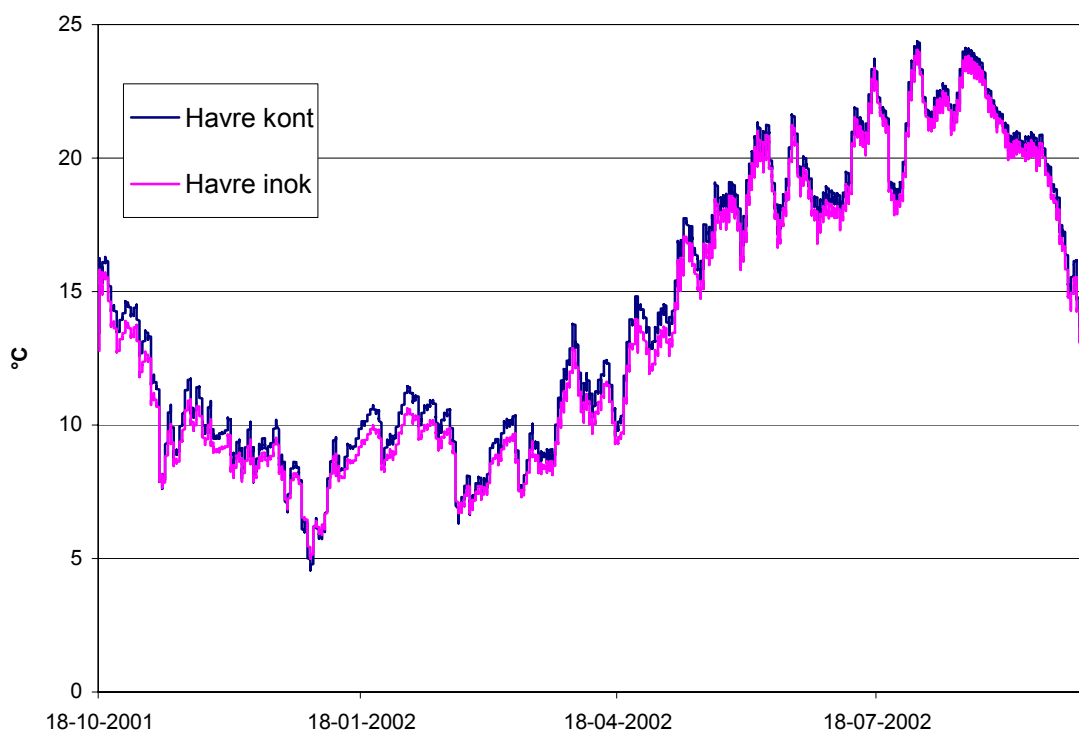


Billede 4.4.8 Mikromorfologiske karakterer, *Cladosporium* sp.

4.4.6 Temperatur- og RH-måling

Resultater fra temperaturmåling er vedlagt i appendiks 3.8. Temperaturen har svinget mellem 5°C og 25°C grader celsius over hele forsøgsperioden. Fra første udtagning (18.-19. oktober) til anden udtagning (12.-13. oktober) falder temperaturen fra omkring 15°C til omkring 10°C. I løbet af vinteren er der ikke på noget tidspunkt frostgrader (min. 3,5°C). Fra slutningen af oktober til begyndelsen af april kommer temperaturen ikke over 15°C. Juni måned kommer temperaturen over 20°C. August er varmest her ligger temperaturen mellem 20 og 25°C, men også september har temperaturer omkring 20°C. Først ved 3. udtagning (24.-25. september) falder temperaturen igen til omkring 15°C.

Ved sammenligning mellem minisiloer med inokuleret byg og kontrolsiloer er der for havre og hvede en svag tendens til, at siloerne med inokuleret byg har lidt højere temperaturer end kontrollen (figur 4.4.7).



Figur 4.4.7 Temperaturmåling i havre med inokuleret byg og kontrol.

Resultater fra RH-måling er vedlagt i appendiks 3.9 Den relative fugtighed (RH) har under hele forsøgsperioden en gennemsnitsværdi på 58,5% (median 58,5% RH). I meget få tilfælde er RH over 80%.

4.5 Diskussion

Kontaminering med *P. verrucosum* i inokulat og det øvrige korn

Inokulat

Inokuleret byg (BI) viser et fald i kontamineringsprocent ved første og anden udtagning (figur 4.4.3) trods det, at inokulumpotentialet har været stort, og at kontamineringsprocenten er 99% ved startkarakteriseringen.

Årsagen til fald i kontamineringsniveau for BI kan (bl.a. ifølge Ramakrishna *et al.*, 1996; Elmholt & Hestbjerg, 1999) være:

- at konidierne mister spireevne
- at en del af konidierne har kort levetid
- at *P. verrucosum* bliver hæmmet i vækst (fungistasis) enten p.g.a. konkurrence fra andre svampe, andre inhiberende stoffer eller fysiske faktorer
- variabilitet
- at startkarakteriseringen af det inokulerede byg (BI) ikke gav et reelt billede af inokulumpotentialet i minisiloerne

I henhold til Ramakrishna *et al.* (1993) (iflg. Elmholt og Hestbjerg, 1999) var spireprocenten mellem 40% og 60% for modne konidier hos fire svampe heriblandt *P. verrucosum*.

Elmholt og Hestbjerg (1999) oplever et lignende fald i *P. verrucosum* (cfu/mg) i infesteret jord med mekanisk beskadigede kerner. De begrundet dette fald i spiringsgraden med, at de beskadigede kerner muligvis afgiver hæmmende stoffer som ethylen eller CO₂. Ethylen og CO₂ har i andre studier vist sig at være hæmmende for vækst og spiring af bl.a. *P. verrucosum* (Haasum, 1998; Elmholt og Hestbjerg, 1999).

Studier med konkurrence fra andre svampe og andre mikroorganismer har vist både hæmmende og stimulerende effekter (Landecker & Stotzky, 1973 (iflg. Petersen, 1995); Chelack *et al.*, 1991a. (iflg. Marquardt & Frohlich, 1992)) på sporuleringen og væksten hos svampe. Det fremgår dog, at marksvampe ikke havde effekt på spiringen af *P. verrucosum* (Ramakrishna *et al.*, 1996).

Den metodiske faktor kan også have influeret kontamineringsniveauet. Resultaterne er et udtryk for detektioner foretaget ved stikprøver, fordi der vil forekomme naturlig variation. Shotwell (1975) finder stor variation ned på kerneniveau.

BI til startkarakterisering stod fjorten dage ved 2°C, før kernerne blev udlagt. Inkuberingstiden har derfor været længere, mere uforstyrret og upåvirket af det øvrige korn og dets mikroorganismer. Muligvis giver startkarakteriseringen ikke et reelt billede af inokulumpotentialet i minisiloerne.

Northolt *et al.*, (1979) viser, at *P. verrucosum* kan vokse ned til 0°C. Ved kontroltælling af sporesuspensionen fandt jeg, at nogle konidier allerede efter 14 dage var spiret (billede 4.2.7). Det var desuden tydeligt, at *P. verrucosum* kunne vokse og sporulere i den beskadigede byg ved 2°C. Efter mindre end 2 måneder var overfladen af prøven, der var udtaget til startkarakterisering af BI, overgroet med *P. verrucosum* (forsidebillede). Derfor kan det ikke udelukkes, at kontamineringsprocenten for BI ved første udtagning (10%) er et bedre udtryk for inokulumpotentialet ved forsøgsstart.

Endelig kan konidierne være tabt til luften under opstillingsprocessen. Det er derfor ikke muligt med sikkerhed at sige, hvorfor BI viser et fald i kontamineringsprocent fra startkarakteriseringen til første og anden udtagning. Efter 52 uger (3. udt.) er kontamineringsprocenten for BI dog steget til 45%. *P. verrucosum* har derfor overlevet og er sandsynligvis opformeret trods varierende RH og temperaturforhold. Dette kan evt. skyldes tidsfaktoren, at faktorer som temperatur og RH har været gunstige i perioden fra 11. uge til 52. uge, eller at *P. verrucosum* har udkonkurreret andre naturligt forekommende svampe, og/eller at evt. hæmmende faktorer er ophørt.

Det er svært at vurdere, hvor stor betydning byg-inokulatet har haft, eftersom der har været naturlig kontaminering af *P. verrucosum*. Bygkontrolprøverne var ikke på noget tidspunkt kontamineret med *P. verrucosum*. Derfor må kontaminering i kontrolprøverne i de øvrige kornarter være naturlig (figur 4.4.3).

Det øvrige korn

På trods af et hotspot-potentiale med høj *P. verrucosum*-konidiekoncentration til at begynde med og vandindhold i byggen på omkring 20 % stiger kontamineringsprocenten ikke i løbet af forsøgsperioden for det øvrige korn. Det er forståeligt ved første og anden forsøgsudtagning, eftersom kontamineringsniveauet for det inokulerede byg (BI) også er lavt her (figur 4.4.3), og fordi vandindholdet og temperaturen er lav (se uddybning længere nede). Ved sidste udtagning kunne det være forventet, at kontamineringsniveauet i det øvrige korn var steget. Både kontamineringsniveauet i BI og vandindholdet for alle kerner på nær spelt er steget markant (tabel 4.4.3). Baggrunden for de lave kontamineringsværdier i det øvrige korn kan dog være, at forsøgsbetingelserne har været gode med hensyn til at holde *P. verrucosum*'s udbredelse nede.

Resultaterne viser ikke nogen relation mellem artsforskelle og kontamineringsværdier. Spelt har de højeste kontamineringsværdier under hele forløbet. Men kontrolspelten har næsten samme værdier

og i fire tilfælde højere kontamineringsværdier end spelt med kontamineret byg (tabel 4.4.2 og 4.4.3).

Nye resultater fra Elmholt (pers. medd.) viser flere eksempler på, at det naturlige kontamineringsniveau i spelt kan blive meget højt. Desuden var speltprøverne i egne undersøgelser af både kerner og småaks ofte markant mere overbevokset på DYSG efter 7 dages inkubering (billede 4.4.1 og 4.4.2). Dette støtter ikke hypotesen om, at spelt p.g.a. sit lavere forædlingstryk kunne have bevaret en resistens, der gør det mere modstandsdygtigt over for svampeinfestationer. Axberg *et al.* (1997) har studeret byg- og hvedesorter og fandt, at der muligvis er genetiske betingelser for, om kornsorter er modstandsdygtige over for svampeangreb. Axberg *et al.* (1997) fandt en sammenhæng mellem lavt, totalt proteinindhold kombineret med et højt amyloseindhold og akkumulering af OTA. Dels ligevægtsindstiller sorter med højt amyloseindhold sig på et højere vandindhold. Dels giver et lavere proteinindhold en dårligere beskyttelse af frøhviden (endosperm). Konklusionen var dog modstridende for kornarterne, idet bygsorter med højt proteinindhold så ud til at reducere akkumuleringen af OTA, mens hvedesorter viste det modsatte. Forudsat, at der er sammenhæng mellem OTA-forekomst og kontamineringsgrad, kunne spelt, der har et højt proteinindhold (Nielsen & Mortensen, 1997), forventes at have en høj kontamineringsgrad. De højere kontamineringsværdier for spelt kan dog også have sammenhæng med spelts morfologiske karakterer, der er ganske anderledes end de øvrige kornarters.

Kornprøverne blev opbevaret ved 2°C i lufttætte beholdere omkring en måned, før de blev analyseret på DYSG. Kernerne har ikke været opbevaret med inokuleret byg i perioden efter udtagningen, eftersom bygkernerne blev sorteret fra umiddelbart efter udtagningen.

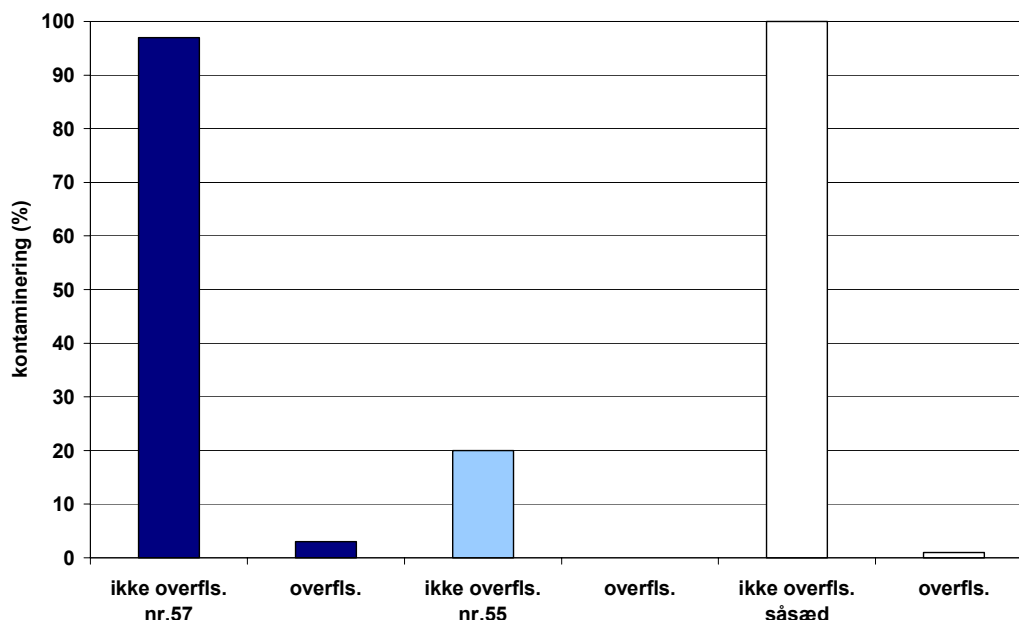
Tidspunkter for udtagning

Vi valgte at udskyde 3. udtagning, fordi kontamineringsprocenten var lav ved 2. udtagning. Hermed kunne jeg studere, om det påvirkede kontamineringen med en forlænget tidsperiode. Det ser dog ikke ud til, at en længere lagringstid har haft en effekt på kontamineringsgraden af det øvrige korn.

Overfladesterilisering

Overfladesterilisering anvendtes for at undersøge om *P. verrucosum* havde inficeret eller kun infesteret kernerne. Det er sandsynligt, at *P. verrucosum* ikke har nået at inficere kernerne ved 1. udtagning (0. uge), og derfor giver resultaterne illustreret ved figur 4.4.4 et reelt billede.

Vi blev dog skeptiske med hensyn til overfladesteriliseringen, idet det virkede som om, *P. verrucosum* ikke overlevede trods det, at *P. verrucosum* havde inficeret kornet. Vort forbehold over for overfladesterilisering bygger på resultater fra tre eksterne kontrolprøver (figur 4.4.8).



Figur 4.4.8 Ekstern kontrol af overfladesteriliseringsmetoden. Tre ”eksterne” prøver blev overfladesteriliseret og sammenlignet med ikke-overfladesteriliserede kontroller

Disse prøver har været kontamineret med *P. verrucosum* over en længere periode. Derfor er der også stor sandsynlighed for, at *P. verrucosum* har inficeret kernerne. En OTA-analyse viste 71,3 ng/g, 0,0 ng/g og 134,5 ng/g for henholdsvis prøve 57, 55 og såsæden. Dette understreger, at kernerne i prøve 57 og såsæden sandsynligvis har været inficerede med *P. verrucosum*. Chelkowski *et al.* (1981) registrerer en forskel mellem produktionen af OTA på overfladen og den totale mængde OTA i byg-, rug- og hvedekerner. Forfatterne fandt op til 90% højere OTA-indhold i de indre dele af kernerne. Derfor konkluderer Chelkowski *et al.* (1981), at hypotesen om, at OTA akkumuleres i endospermen (frøhviden) ved naturligt kontaminerede kerner, er underbygget. Resultaterne (figur 4.4.8) viser en markant forskel mellem overfladesteriliseret og ikke-overfladesteriliseret korn. Det ville have været forventeligt, at de overfladesteriliserede kerner fra prøve 57 og såsæden havde et markant kontamineringsniveau. Resultatet ved overfladesterilisering viste ikke tydeligt, at kernerne har været inficeret med *P. verrucosum*. Vort forbehold blev yderligere bekræftet ved erfaringer fra DTU (Frisvad og Lund, pers. medd.).

Temperatur

Temperaturen har ligget i et interval mellem 5°C og 25°C. Northolt *et al.* (1979) finder, at *P. verrucosum* har vækstpotentiale mellem 0°C og 31°C, og Elmholt & Hestbjerg finder, at *P. verrucosum* kan overleve en vinter i jorden (ned til -10°C). Derfor har *P. verrucosum* haft betingelser for overlevelse og vækst mht. temperaturforhold.

Forskellen i temperatur mellem havre kontamineret med inokuleret byg og kontrollen (figur 4.4.7) kan være et udtryk for en øget svampeaktivitet.

Vandindhold

Det kunne forventes, at vandindholdet i kornet ville stige ved tilførsel af bygkerner med vandindhold på 20%. I stedet ses en tendens til, at vandindholdet falder fra forsøgsstart til 1. og 2. udtagning. Dette kan være forårsaget af:

- at der sker en ligevægtsindstilling (Abramson *et al.*, 1997), hvor bygkernernes højere vandindhold ikke var nok til at øge det totale vandindhold og hermed fremme konidiernes spredning
- en stigning i temperatur fra 2 grader celsius til rumtemperatur i forsøgsanlægget (omkring 10-15°C)
- at minisiloerne ikke havde tætsluttende låg men tæt vævet stof, hvor vandmolekyler kan diffundere igennem
- at overflade-/volumenforholdet i minisiloen var forholdsvis stort
- at kornmængden i minisiloen er for lille til at yde et nævneværdigt tryk, hvorved luftpermeabilitet og vanddiffusion er forholdsvis stor
- at vand fra svampenes egen metabolisme ikke kunne erstatte en fordampning fra minisiloerne (Abramson *et al.*, 1997)

Ifølge Müller og Boley (1992) giver et vandindhold på 20% ved 4°C og vandindhold på 18% og 10°C mulighed for vækst af *P. verrucosum*, mens 18% og 4°C ikke starter vækst af *P. verrucosum*. Under forudsætning af, at vandindholdet og temperaturen er de afgørende faktorer, kan vandpotentialet i BI og det øvrige korn have været for lavt for vækst af *P. verrucosum* ved 2. udtagning (11. uge) (ml. 12,8 og 14,9% og ml. 7 og 16°C mellem 1. og 2. udt.).

Vandindholdet og temperaturen er steget mellem 2. og 3. udtagning (ml. 13,9 og 18,6% og op til max. 25°C). Ifølge Müller og Boley (1992) er dette tilstrækkeligt for, at vækst af *P. verrucosum* kan

forekomme. Scudamore og Wilkin (1999) finder, at OTA kan dannes ved vandindhold på over 16,5% og temperatur på 15°C i byg.

Ifølge omregningstabeller er equilibrium relative humidity (e.r.h.) for f.eks. hvede med inokuleret byg (17-18% vandindhold og 15°C) i perioden omkring 3. udtagning ca. 84% e.r.h. (Pixton, 1982).

I august var temperaturen dog oppe på 25°C. Her kunne e.r.h. (a_w) have været omkring 85% ved samme vandindhold. Ifølge Northolt *et al.* (1979) er dette tilstrækkeligt for, at vækst af *P.*

verrucosum kan finde sted. Northolt *et al.* (1979), finder, at minimum a_w er 0,83 (v. 24°C).

Årsagen til stigning i vandindholdet kan være en ligevægtsindstilling med det omgivende rum (Abramson, 1987). RH-niveauet stiger dog ikke væsentligt mellem 2. udtagning og 3. udtagning sammenlignet med perioden før 2. udtagning.

Teoretisk set kan stigningen i vandindhold ved 52. uge også være et udtryk for en øget svampeaktivitet. Der ses dog ingen tendens til øget kontaminering med *P. verrucosum*.

Pladespredning

Der er en tendens til, at havre har højere skimmelværdier end rug. Teoretisk set kunne der være en sammenhæng mellem lavere kontamineringsniveau med *P. verrucosum* og højere værdier af skimmel i havre. Hermed ville konkurrenceniveauet i havre være større, og *P. verrucosum*'s spredning kunne muligvis begrænses. Kontamineringsniveauet af *P. verrucosum* er dog ikke højere for rug end for havre i delprojekt II.

V8-agar kan være problematisk at anvende, idet nogle svampe spreder sig mere på V8, end *P. verrucosum* gør. Ved også at anvende DYSG-agar i pladespredningsanalyser tages der højde for denne problematik.

Det skal understreges, at pladespredningen primært blev foretaget for, at jeg skulle stifte bekendtskab med metoden.

Diversitet

Flere studier, bl.a. Abramson *et al.* (1980;1987), belyser udviklingen af svampediversitet og -konkurrence ved forskellige lagerbetingelser. I studierne tages der dog ikke højde for, hvor længe kornet er blevet lagret før forsøgsstart og dermed hvilken udgangssvampeflora, man har haft. Denne vinkel er afgørende for vurderinger af lagerbetingelsers påvirkning af svampefloradiversiteten. Svampefloradiversitetens udvikling under lagring fra forsøgsstart til -slut blev ikke fulgt som oprindeligt tænkt. Den diversitet, som fandtes ved første udtagning, viste et typisk billede af en

marksvampeflora. Der var ikke mange kolonier af *Aspergillus* og *Penicillium*. Derimod fandt jeg *Alternaria*, *Cladosporium* og få *Fusarium*-kolonier, alle kendetegnende for marksvampeflora. Det kunne forventes, at billedet i løbet af lagringsperioden ændredes til en øget lagersvampeflora med *Penicillium* og *Aspergillus* som dominerende svampe.

Det skal pointeres, at studiet af svampediversiteten fik det formål, at jeg skulle stifte bekendtskab med forskellige svampearter.

Konklusion

P. verrucosum har ikke spredt sig som forventet fra enkeltkernehotspottene. Årsagen hertil kan som nævnt være, at vandpotentialitet var for lavt. Vandindholdet og temperaturens startniveau blev bestemt ud fra et kompromis mellem erfaringer fra pilotprojektet og et ønske om, at forsøgsopstillingen skulle være praksisnær. I så fald er resultatet positivt, idet det tyder på, at det i praksis kan lade sig gøre at holde spredningen af *P. verrucosum* nede trods et højt inokulumpotentiale. Pilotprojektet vidnede om, at det ved et højt vandpotentiale kunne gå meget hurtigt (inden for 14 dage), før kornet var overgroet med svampe. Men det er ikke sikkert, at spredningen af *P. verrucosum* udelukkende var begrænset af vandpotentialitet. Andre faktorer kan have interfereret, for eksempel

- at inokulumpotentiale kan have været for lavt
- at overfladebeskadigelsen af byggen ikke har haft en positiv effekt på spredningen
- at frasi gning af urenheder kan have nedsat spredningen
- ved konkurrence fra andre svampe
- ved hæmmende faktorer under prøveudtagningsproceduren (f.eks sterilisering af prøvetagningsspyddet)

I hvert fald har samspillet mellem faktorerne ikke skabt optimale betingelser for spredning af *P. verrucosum* fra enkeltkernehotspottene.

5. Fælles diskussion og konklusion

Metodeanvendelse

De anvendte procedurer ved udtagning og opstilling i første og andet delprojekt er procedurer, der ikke er anvendt i tidligere studier. Jeg har konstrueret dem under vejledning og med udgangspunkt i tidligere studier (Harwig & Chen, 1974; Northolt *et al.*, 1979; Damoglou *et al.*, 1984; Boley & Müller, 1992; Abramson, 1998; Axberg *et al.*, 1997; Abramson *et al.*, 1999).

Ved vurdering af resultaterne skal der tages flere forbehold:

- Kornprøverne er ikke lagt ud på samme parti DYSG, og variation i agaren kan forekomme trods samme procedure
- Antal dage mellem udtagning og udlægning varierer, da det ikke var praktisk muligt at udlægge prøverne umiddelbart efter udtagning. Derfor stod nogle prøver længere tid på køl end andre (App. 2.2 og 2.3)
- Spritten anvendt til flambering af kornspyddet mellem hver udtagning i delprojekt II kan måske have forårsaget, at konidier fra *P. verrucosum* er gået til
- Prøvetagningsspyddet blev ikke rengjort mellem hver prøve ved udtagningen i delprojekt I, så jeg kan have overført konidier fra prøve til prøve
- Det kan have haft en betydning, at udtagningsprocedurerne er såkaldte destruktive prøvetagningsmetoder, der forårsager forstyrrelser omkring prøvetagningsstedet. Det vides ikke med sikkerhed, hvorvidt dette påvirker den lokale luftbevægelse og forstyrrer svampevæksten (Scudamore & Wilkin, 1999)
- Direkte udlægning af ikke-overfladesteriliserede kerner beskriver kontamineringsniveauet og skelner ikke mellem vækst fra svampehyfer eller konidier. Der blev ikke observeret svampevækst i kernerne ved kontamineringsbestemmelserne, mens vækst og sporulering af *P. verrucosum* var tydelig i den overfladebehandlede, opfugtede og inokulerede byg (forside billede).
- OTA-analysen fortæller ikke noget om den totale svampebiomasse (Marquardt & Frolich, 1992)
- I relation til OTA-resultaterne kan det ikke udelukkes, at vækst og sporulering af *P. verrucosum* samt dannelse af OTA kan være forekommet under opbevaringen af prøverne

på køl. Det skal understreges, at kontamineringsresultaterne bygger på prøver, der lå lagret i langt kortere tid.

- Der vil forekomme naturlig variation. Scudamore & Wilkin (1999) mener, at der er en ekstrem heterogenitet i en korndyng. Shotwell (1975) finder stor variation selv på kerniveau. Derfor indikerer detektioner fra enkeltpunkter ikke en gennemsnitskoncentration/ kontamineringsgrad. Detektionerne konfirmerer blot, at der er en risiko for spredning af *P. verrucosum* og dannelse af OTA (Scudamore & Wilkin, 1999)

Procedurerne blev valgt ud fra et ønske om at gøre dem praksisnære, for at gøre udtagningerne ensartede samt ud fra, hvad der var fysisk muligt. Jeg kunne have valgt at anvende mere traditionelle laboratoriestudier med kulturer under kontrollerede betingelser. Abramson (1998) vurderer, at laboratoriestudier kan give en del informationer. Dette kan sammenlignes med det at producere film. Ved at fotografere enkeltssituationer med kendte parametre kan man ekstrapolere en hel film, der viser den større sammenhæng. Men at forudsige konsekvenserne både forud for høst og efter lagring er ikke muligt ved at ekstrapolere fra studier med få kontrollerede faktorer til forhold med reelle landbrugsvilkår. På grund af interaktion mellem mange faktorer mener Abramson (1998), at det er nødvendigt at studere svampevækst og mykotoksindannelse under egentlige lagerbetingelser. Når specifikke lagersituationer og procesbetingelser for mykotoksindannelse kan karakteriseres, er det muligt at udforme tidlige advarselsindikatorer og forebyggende procedurer. Hertil foreslår Abramson, at multivariable analysemetoder kan være et redskab.

Teori om betingelser der favoriserer udviklingen af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA sammenholdt med mine resultater

Fysiske/kemiske faktorer, biologiske faktorer og genetiske faktorer som vandindhold, temperatur, tid, vækstsustrat, O₂, CO₂, pH, mekanisk skade, mikroflora og -fauna, inokulumpotentiale m.m. er alle faktorer, der i et komplekst samspil påvirker udviklingen af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA (Abramson, 1998).

Vandindhold og temperatur

De fleste undersøgelser i kontrollerede forsøg viser en årsagssammenhæng mellem vandindhold, temperatur og tid på den ene side og svampevækst og udvikling af OTA på den anden side (Harwig

& Chen, 1974; Northolt *et al.*, 1979; Häggblom, 1982; Damoglou *et al.*, 1984; Müller & Boley, 1991; Boley & Müller, 1992; Scudamore & Wilkin, 1999; Elmholt, 2002).

Northolt *et al.* (1979) finder, at vækst af *P. verrucosum* forekommer mellem 0°C og 31°C og ved et vandindhold mellem 0,83 a_w (v. 24°C) og 0,97 a_w (v. 12 - 31°C). OTA-produktionen kan forekomme fra 12°C (i byg) og minimum a_w på 0,91 (v. 24°C) (optimal vækst og OTA-produktion ved 24°C og 0,97 a_w). Müller og Boley (1992) finder, at OTA kan dannes allerede ved 4°C, hvis vandindholdet er større end 20% (efter 100 dage) og ved 10°C, hvis vandindholdet er større end 18% (efter 160 dage). Hetmanski (1997) (iflg. Scudamore & Wilkin, 1999) finder, at den nedre grænse for dannelse af OTA ligger ved et vandindhold på 16,5% (v. 15°C -20°C).

Generelt er tendensen, at risikoen for vækst og dannelse af OTA stiger med højere vandindhold, temperatur og lagringstid (Scudamore & Wilkin, 1999).

Vandindholdet blev ikke målt det første år i mit monitoringsprojekt (delprojekt I). Andet år (2001) ses der ingen sammenhæng mellem højt vandindhold og OTA-forekomst (figur 3.4.9). OTA forekommer i prøver med vandindhold ned til 11,8% på trods af, at vandindholdet var mindre end 16% allerede 4 dage efter høst. Dette stemmer overens med Krogh *et al.* (1974), der ikke finder en direkte korrelation mellem OTA og vandindholdet i byg og havre.

Sammenholdes vandindholdet med kontamineringen af *P. verrucosum* i delprojekt I år 2001, er det RB-prøver med det laveste vandindhold i anden udtagning (73 dage efter høst), der har de højeste kontamineringsprocenter (figur 3.4.8). Her har tiden sandsynligvis haft en effekt med hensyn til kontaminering med *P. verrucosum*. I forhold til almen teori er det overraskende, at kontamineringsgraden i bunden er højest, eftersom dette niveau i kornlageret tørrer først.

Kontaminering fra hoved- og sidekanal kan have påvirket kontamineringsgraden i bunden af lageret. Eventuelt har det også haft betydning, at dette kornlag er høstet først og var mest vådt.

I delprojekt II gælder det kun for BI, at kontamineringsgraden er steget ved stigende vandindhold efter 52 uger. For det øvrige korn, der som udgangspunkt havde et vandindhold mellem 14,1% og 15,8%, ses der ingen tendens til, at kontamineringsgraden korrelerer med vandindholdet (tabel 4.4.3). Det er bemærkelsesværdigt, at kontamineringsgraden for det øvrige korn ikke øges med stigende vandindhold (ml. 14,8 og 18,6%) efter 52 uger. Inokulumpotentialet er til stede, og ydermere er temperaturen i perioder oppe på 25°C. Det øvrige korn er dog ikke overfladebeskadiget. Den positive konklusion er måske, at et lavt udgangsvandindhold for lagring er vigtigt, og at det kan være afgørende for, om spredningen holdes nede. Scudamore og Wilkin

(1999) finder ved undersøgelse af 24 planlagre, at tre prøver, der kommer fra de vådeste lagre, har meget lav eller ingen svampevækst. Dette finder de ligeledes overraskende.

For at understrege kompleksiteten kan nævnes, at Sauer & Burroughs (1980) mener, at det er RH i det intergranulære rum frem for kornets vandindhold, der er den kritiske faktor, der begrænser svampeaktiviteten. Desuden mener de, at selv meget små forskelle (1%) i RH kan være bestemmende for svampeinfektion og mykotoksindannelse. Pixton (1982) beskriver vigtigheden af temperatur og equilibrium relative humidity (e.r.h.). Det afgørende for bevægelsen af vand i et kornlager er dels ligevægtsforholdet mellem RH og kernerne (e.r.h.), dels temperaturens påvirkning af denne ligevægt. Vandindholdet svinger med RH i det intergranulære rum samt med den omgivende atmosfære. Men hvis der opstår en temperaturgradient f.eks ved temperaturudsving mellem nat og dag, vil der også ske en transport af fugt fra varmere til koldere dele af lageret. I delprojekt II er det tydeligt, at der både har været temperatur- og RH-svingninger mellem nat og dag samt årstidsvariationer. Vanddamps *bevægelse* har der ikke været megen fokus på ved undersøgelser i kontrollerede forsøg. Måske spiller denne faktor en større rolle, end man hidtil har regnet med. I et planlager eller en silo med 10 tons korn med et vandindhold på 15% vil vandet udgøre ca. 1500 L. Dette vandpotentiale er ikke statisk, men påvirkes af RH og temperaturgradienter. Billedligt kan det ses som fugtig luft, der bølger op og ned. Hvis den fugtige luft først har fået en bestemt retning, eller hvis bevægelsen bremses, kan der formentlig opstå hotspots (se nærmere om hotspots hos Sinha & Wallace (1965) og Shotwell *et al.* (1975)). Derfor udgør vandpotentialet i kornet også ved 15% vandindhold en stor risiko for dannelse af hotspot. Christensen (1957) mener ligeledes, at den største årsag til områder med højt vandindhold specielt i planlagre skyldes transporten af vanddamp fra et område til et andet. Christensen (1957) mener ikke, at vand, der er dannet p.g.a. utætheder eller kondens, og som kan dryppe ned i lageret, spiller den store rolle i denne sammenhæng.

Kontamineringsgrad

Holmberg *et al.* (1991) konkluderer ud fra et forsøg med *P. verrucosum* i foderprøver og OTA i svin, at hvis *P. verrucosum* forekommer i foder, findes OTA med stor sandsynlighed også i foderet. I delprojekt I, år 2000 og 2001, er der ikke sammenhæng mellem høje kontamineringsværdier af *P. verrucosum* og OTA-forekomster (figur 3.4.15). I nogle prøver fandt vi ikke OTA trods høje kontamineringsgrader. I rugprøverne fra 2000, 63 dage efter høst, er det RTG med de laveste

kontamineringsprocenter, der har de højeste forekomster af OTA (mellem 90 og 354 ng/g) (figur 3.4.10). Der er en tydelig tendens til, at OTA-produktionen er foregået i toppen af lageret. RB-prøverne har OTA-koncentrationer mellem 0,1 og 1,1 ng/g.

Det er overraskende, at der ikke er bedre korrelation mellem høje kontamineringsværdier for *P. verrucosum* og OTA-forekomst. Temperatur- og vandgradienten i lageret kendes desværre ikke. Ifølge teorien (Scudamore & Wilkin, 1999) er det top-laget, der tørrer senest. Derfor kan RTG-prøverne have haft højere vandindhold, hvilket har fremmet dannelsen af OTA.

Haggbloms (1982) undersøgelse med steriliseret byg, der blev inokuleret med henholdsvis $1,4 \times 10^3$ og $1,4 \times 10^5$ *P. viridicatum*- (*P. verrucosum*) konidier, viste ingen forskel i produktionen af OTA. Derimod viste Odamitten *et al.* (1987) (iflg. Ominski *et al.*, 1994), at produktionen af aflatoxin steg med op til tolv gange, når mængden af *A. flavus*-inokulum blev reduceret. Forklaringen menes at være, at der kan være en sammenhæng mellem mycelievækst og aflatoxinproduktion. Derfor er aflatoxinproduktionen større, hvor populationen er mindre og har mere substrat at vokse i (Odamitten *et al.*, 1987) (iflg. Ominski *et al.*, 1994).

Muligvis har det haft en effekt, at der ved de høje kontamineringsgrader i RB er øget konkurrence. Ominski *et al.* (1994) finder, at tilstedeværelsen af konkurrerende svampe og deres effekt på toksinproduktionen er uforudsigelig. Dette skyldes, at der har været undersøgelser med både positiv og negativ effekt på toksinproduktionen. Generelt mener de dog, at vækst og toksinproduktion hos lagersvampe bliver reduceret ved tilstedeværelse af konkurrerende arter.

Tid

Resultaterne fra 2000 viser, at kontamineringen af *P. verrucosum* er korreleret med udtagningstidspunktet. Desuden viser resultaterne, at der er en tendens til, at dannelse af OTA er korreleret med udviklingen i tid. Stigningen i OTA-koncentration sker meget markant ved 5. udtagning (63 dage efter høst) (figur 3.4.12).

Scudamore & Wilkin (1999) vurderer, at dannelsen af OTA vil forekomme inden for en måned, hvis korn med vandindhold over 18% er opbevaret mellem 10°C og 25°C. De mener, at målet med tørringsprocessen må være at minimere den tid, hvor korn har et vandindhold på over 16% og en temperatur på mere end 20°C. Eksempelvis nævner de, at det ved 20°C ikke bør tage mere end 14 dage at tørre kornet ned til et vandindhold på 16%. Dette må naturligvis afhænge af udgangsvandindholdet og temperaturen. Dog understreger Scudamore & Wilkin (1999), at den

afkølede effekt af tørring med tør luft sammen med selve tørringen vil mindske risikoen for dannelse af OTA, selvom tørringsprocessen forlænges.

Det bør overvejes, hvorvidt 15% vandindhold, som er almindelig handelspraksis for korn forhandlet i Danmark, er lavt nok, eller om niveauet skulle sænkes til 13 -14% vandindhold. Der kunne være tilføjelser med hensyn til tørringstiden, og/eller kornkontrakterne burde knyttes til temperaturforholdene. Høj (1995) mener ikke, at det er nødvendigt at tørre kornet ned til et bestemt vandindhold, hvis blot temperaturen er tilstrækkelig lav. I tråd med Scudamore & Wilkin (1999) er det min overbevisning, at tidsperioden, til kornet er tørret ned til et vandindhold på 15%, er meget afgørende for udviklingen af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA. Derfor er tørringsanlægget af stor betydning.

Artsforskell

I delprojekt I har artsforskellen en betydning for kontamineringsniveauet. Rug har generelt en højere kontamineringsprocent end havre. Desuden er der en tendens til, at OTA-koncentrationerne er lavere i havre end i rug (tabel 3.4.1). Ved undersøgelsen af tre bedrifter over tre år (hvoraf den ene bedrift følges op i mit første delprojekt) finder Elmholt (2002) ligeledes, at rug er mest kontamineret med *P. verrucosum*. Dette korrelerer med det danske overvågningssystem for OTA. I perioden fra 1986-1997 finder Jørgensen *et al.* (1996), at 52 % af prøverne i rugkerner indeholdt OTA (N=870, gennemsnit 2,3 µg/kg, maks. 121µg/kg), mens det for hvedekerner var 44% (N= 757, gennemsnit 0,6 µg/kg, maks. 51 µg/kg). Havrekerner blev kun analyseret i perioden 1986-94. Her var det 45% af kernerne, der indeholdt OTA (N=80, gennemsnit 0,4 µg/kg, maks.5,6 µg/kg). Siden 1995 blev der kun analyseret for OTA-forekomster i rug og hvede. I perioden fra 1995 til 1999 blev der fundet 18 prøver (N= 907), der oversteg grænseværdien på maksimum 5 µg/kg. Ud af de 18 prøver var de 16 fra rugmel eller -kerner (Jørgensen & Jacobsen, 2002). Årsagen til den højere sensibilitet i rug er ikke kendt (Elmholt, 2002). Forskellen mellem arterne kan som tidligere nævnt i diskussionen af delprojekt I og II samt i teoriafsnittet muligvis være bestemt af genetiske faktorer (Chelkowski *et al.*, 1981; Häggblom & Gosh, 1985; Axberg *et al.*, 1997). Betingelserne for væksten af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA må være bedre i rug (Elmholt, 2002). Eventuelt er konkurrencen mellem *P. verrucosum* og den øvrige svampeflora anderledes i rug end i f.eks havre, eller måske har det betydning, at havre høstes med avner.

I delprojekt II er der pga. den lave kontamineringsgrad ikke foretaget statistiske analyser, men resultaterne tyder ikke på, at der er forskelle mellem kornarterne i modtageligheden for kontaminering med *P. verrucosum*. Undtaget er spelt, der dog muligvis har lidt større modtagelighed (figur 4.4.2). Ved pladespredning af første udtagning er der dog en tendens til, at der er forskel på rug og havre i den generelle skimmelkoncentration. Koncentrationen af skimmel (cfu/g) er op til otte gange højere i havre end i rug (figur 4.4.6), hvilket falder i tråd med, at konkurrencen i svampefloraen er anderledes i rug end i havre (jævnfør ovenstående). *P. verrucosum* er ikke detekteret i pladespredningerne ud over i det inokulerede byg trods det, at kun 0,3% af kolonierne på en petriskål (DYSG) er nok til at detektere *P. verrucosum* (Elmholt *et al.* 1999). Muligvis er *P. verrucosum* hæmmet af konkurrencen fra marksvampe (app. 3.7). I en undersøgelse af *P. verrucosum*'s evne til at kolonisere byg ved tilstedeværelse af andre svampe fandt Ramakrishna *et al.* (1996) dog, at koncentrationen af *P. verrucosum* (cfu) kun faldt lidt (20°C uanset a_w).

Ud fra egne resultater kan det konkluderes,

- at lagringstiden har haft en betydning for kontamineringsniveauet (delprojekt I, afsnit 3.4.1)
- at der er forskel på rugs og havres modtagelighed for kontaminering med *P. verrucosum* (delprojekt I, afsnit 3.4.1)
- at det tilsyneladende kan lade sig gøre at holde spredningen af *P. verrucosum* nede trods et højt inokulumpotentiale. Den hurtige nedtørring har sandsynligvis bidraget til at *P. verrucosum* ikke har spredt sig under lagringen (delprojekt II)
- at der ikke var lineær korrelation mellem kontamineringen med *P. verrucosum* og OTA-forekomst (delprojekt I, figur 3.4.10)

Konkluderende kan det siges, at kornlageret er et meget komplekst system. Der er ikke noget entydigt svar på, hvilke betingelser der favoriserer udviklingen af *P. verrucosum* og dannelsen af OTA og derfor heller ikke nemme retningslinier for, hvordan dette kan forebygges. Alligevel er der forhold, der tydeligt favoriserer *P. verrucosum*. I det nedenstående vil jeg på den baggrund komme med anbefalinger til forebyggelse af udvikling af *P. verrucosum* og dannelse af OTA.

Risikovurdering af økologisk versus konventionel drift

Siden OTA blev inkluderet i Fødevaredirektoratets overvågningssystem i 1986, har der været en tendens til, at økologisk dyrket korn har haft et større indhold af OTA end tilsvarende konventionelle produkter (Jørgensen *et al.*, 1996). Der er dog en vis usikkerhed forbundet med sammenligningen, idet der blev taget væsentlig færre prøver af de økologiske produkter end af de konventionelle. Derfor betyder enkeltprøver forholdsmæssigt mere for gennemsnitsindholdene i de økologiske prøver, skriver Jørgensen *et al.* (1996).

Resultater fra perioden 1992-1999 viser, at der for økologisk produceret rug gennemsnitligt er en højere koncentration af OTA i både kerner og mel, end der er for tilsvarende konventionelle produkter. Mens der for hvedemel kun var en lille forskel i gennemsnitsværdierne for henholdsvis økologiske og konventionelle prøver, var der ingen forskel for hvedekerner (Jørgensen & Jacobsen, 2002) (tabel 5.1).

Tabel 5.1 Ochratoxin A i økologisk og konventionelt dyrket hvede og rug i høstårene 1992-1999

Produkt	Antal prøver	Antal prøver indeholdende OTA (µg/kg) LOD ^{a)} -4,9	Antal prøver indeholdende OTA (µg/kg) > 5	Gennemsnit 1992-99 (µg/kg)	Median 1992-99 (µg/kg)	Maksimum (µg/kg)
Økologisk dyrkede rugkerner	17	12	2	3,9	*	45
Konventionelt dyrkede rugkerner	405	244	13	0,9	0,08	63
Økologisk rugmel	155	132	8	1,8	0,38	68
Konventionelt rugmel	165	132	6	0,8	0,35	30
Økologisk dyrkede hvedekerner	14	8		0,3	*	1,6
Konventionelt dyrkede hvedekerner	405	183	5	0,3	0,02	32
Økologisk hvedemel	120	115	1	0,5	0,14	19
Konventionelt hvedemel	156	107	1	0,3	0,17	16

a) LOD, limit of detection (0,05). (Baseret på Jørgensen & Jacobsen, 2002)

* ikke opgivet

Her sammenligner Jørgensen & Jacobsen (2002) igen gennemsnitsværdierne trods det, at der med hensyn til kernerne er meget stor forskel på antallet af hhv. økologiske og konventionelle prøver. Vurderes i stedet medianværdien taget som et gennemsnit over årene 1992-99, mener jeg, at det giver et mere retfærdigt billede, idet enkeltprøver ikke får så afgørende en betydning. Sammenlignes medianværdierne for hhv. økologisk og konventionelt rug- og hvedemel, der har et sammenligneligt antal prøver, er der meget lille forskel på værdierne. For rugmel ligger de økologiske prøver lidt over de konventionelle og omvendt for hvedemel (tabel 5.1). Desuden er det vigtigt både at vurdere den samlede frekvens (procent prøver der indeholder OTA) og maksimumværdierne. I henhold til tidligere betragtninger angående variabilitet og det, at få detektioner af OTA er et udtryk for, at der er risiko for spredning af *P. verrucosum* og større produktion af OTA (Scudamore & Wilkin, 1999), er det et foruroligende stort antal positive prøver. For økologisk dyrkede rugkerner og rugmel er henholdsvis 82% og 90% positive for OTA, mens værdierne for konventionelt dyrkede rugkerner og rugmel er henholdsvis 63% og 84%. For økologisk dyrkede hvedekerner og hvedemel er henholdsvis 57% og 84% detekteret for OTA, mens konventionelt dyrkede hvedekerner og hvedemel er henholdsvis 46% og 69%. I disse procentangivelser er tendensen til et højere indhold af OTA i økologisk producerede produkter påvist. Vurderes maksimumværdierne eller antallet af prøver, der overstiger grænseværdien, er der høje værdier både for økologiske og konventionelt dyrkede produkter. Disse værdier vidner om, at der på enkelte bedrifter er store problemer. Resultaterne fra delprojekt I er et eksempel herpå. Den undersøgte bedrift havde en maksimumværdi på 354 µg/kg OTA (figur 3.4.10). Desværre er det ikke muligt ud fra overvågningssystemets analyser at se baggrunden for hver enkelt prøve. Melprøverne er udtaget i detaileddet, mens kerneprøverne er taget tilfældigt fra korndynger ved kornmøllerne. Specielt de økologiske prøver fra detaileddet kan yderligere være importeret korn (Jørgensen *et al.*, 1996).

Problemer med OTA forekommer ofte i år, hvor høstbetingelserne er dårlige p.g.a megen nedbør, skriver Jørgensen *et al.* (1996). I en tidligere undersøgelse af bedriften fra delprojekt I fandt Elmholt (2002) trods store forskelle i nedbøren år 1998 - 2000 lave kontamineringsprocenter med *P. verrucosum* på det tærskede korn (0% i rug og vårhvede år 1998, 0% i havre år 1999, 0,3% i havre og 1,7% i rug år 2000). Kontamineringsgraden steg dog markant efter tørring (37% i rug og 100% i vårhvede år 1998, 39% i havre år 1999, 1% i havre og 3,7% i rug år 2000). Efter tørring år 2000 finder jeg højere kontamineringsprocenter (3,3% i havre og 19% i rug). Jørgensen & Jacobsen

(2002) finder ligeledes eksempler på høje OTA-koncentrationer trods tørre nedbørsforhold under høst (eks. maksimumværdi på 68 µg/kg i år 1994). Derfor ser det ud til, at problemerne også er relateret til dårlig tørring og lagring efter høst samt eventuelt uhensigtsmæssigt materialevalg og utilstrækkelig rengøring (Elmholt, 2002, egne resultater).

Elmholt (2002) konkluderer, at der ikke kan generaliseres med hensyn til risikoen for kontaminering med OTA og økologisk dyrket korn. Resultater fra tre økologiske ”case studies” viste store forskelle fra bedrift til bedrift, og disse forskelle var stort set reproducerbare over tre år. På baggrund af andre nordiske undersøgelser med indhold af mykotoksiner (DON og aflatoxin M₁) i fødevarer vurderer projektgruppen bag videnssynthesen ”Økologiske fødevarer og menneskets sundhed”, at der ikke er ”...*principielle forskelle i økologisk/biodynamisk og konventionelt producerede fødevarer*” (Jensen *et al.*, 2001, s. 38).

Elmholt (2002) overvejer de potentielle risikoelementer, der kan være forbundet med økologisk driftsform frem for konventionel. I den forbindelse diskuteres sædskifte, gødningsbrug, anvendelse af egen ubejdset såsæd, fravalg af brug af fungicider, sammenhæng med bedriftstørrelse, økologernes erfaringsgrundlag/baggrund m.m. Herudover kan økologiske bedrifter have problemer med forurening fra ukrudt, hvorved tørringen af kornet kræver endnu større opmærksomhed (Scudamore & Wilkin, 1999; Jørgensen & Jacobsen, 2002).

Ved brug af egen (kontamineret) såsæd finder Elmholt (2002), at der kan være en potentiel risiko for kontaminering med *P. verrucosum*. Tre ud af otte bedrifter, der anvendte egen såsæd, havde positive jordprøver. Tre eksempler på brug af indkøbt såsæd kontamineret med *P. verrucosum* (3,2%, 4,3% og 84,0%) forårsagede dog ikke kontaminering af kornet i marken og resulterede ikke i alle tilfælde i, at kornet var kontamineret ved tærskning (0,0%, 2,0% og 1,7%) (Elmholt, 2002).

Nye undersøgelser, hvor kontamineret såsæd blev sået ud i mindre forsøgsparcer, resulterede heller ikke i væsentlige kontamineringer af de høstede kerner (<1%) (Elmholt & Mortensen, 2003). Derfor er der ikke noget, der tyder på, at kernerne bliver inficeret systemisk. Elmholt og Mortensen (2003) konkluderer, at ”...*resultaterne støtter ikke hypotesen om, at kontamineret udsæd forøger risiko for P. verrucosum forekomst i den høstede afgrøde*” (Elmholt og Mortensen, 2003, s.2)

Kontamineringen foregår mere sandsynligt fra:

- jorden (ved regnsprøjt eller ophvirvlen af jorden, eller når mejetærskeren forurenes med jord (Flannigan, 1978; Elmholt, 2002) samt evt. fra muldvarpeskud)

- mejetærskeren (det kan være overførsler fra tidligere år, eller ved brug af maskinstation kan det være smitte fra andre gårde (Flannigan, 1978; Elmholt, 2002))
- fra bygninger, transportsystemer og tørringsanlæg (Elmholt, 2002, egne undersøgelser)

Endelig kan der være en sammenhæng mellem højere indhold af OTA og det, at økologiske bedrifter generelt er mindre. På små bedrifter, der eventuelt drives som hobbylandbrug, er der muligvis ikke tid, erfaring og økonomi til at investere i tilstrækkelige tørringsforhold (Jørgensen *et al.*, 1996; Elmholt, 2002).

Konkluderende kan det fremhæves,

- at *P. verrucosum* er fundet i danske jorde tilsyneladende hyppigere i økologiske end i konventionelt dyrkede (Elmholt, 2002)
- at *P. verrucosum* kan overleve i jorden i flere måneder og opformeres her (Elmholt og Hestbjerg, 2000)
- at OTA kan nedbrydes i jord (Elmholt & Mortensen, 2003)
- at *P. verrucosum* er fundet på økologisk udsæd (Elmholt, 2002)
- at det ikke tyder på, at *P. verrucosum* er udsædsbåren hverken i forsøgsmarken eller ved casestudies (Elmholt, 2002; Elmholt & Mortensen, 2003)
- at der ingen tydelig sammenhæng er mellem gode høstbetingelser og lave kontamineringsværdier med *P. verrucosum* og OTA (Elmholt, 2002; Krogh *et al.*, 1974)
- at *P. verrucosum* er fundet på nytærsket, økologisk korn (Elmholt, 2002)
- at *P. verrucosum* trives under lagerbetingelser inden for et bredt temperatur- og fugtighedsinterval (Northolt, 1979; Pitt & Hocking, 1997)
- at det ikke tyder på, at det økologiske dyrkningssystem som sådan giver øget risiko for OTA-problemer (Elmholt, 2002; Elmholt og Haase, 2003)

Derfor synes dannelsen af OTA at kunne undgås, hvis tørrings- og lagerforholdene er gode.

Ud fra egne resultater kan det konkluderes,

- at uhensigtsmæssige tørringsanlæg og lagerfaciliteter (materialevalg og rengøringsmuligheder) kan give problemer med *P. verrucosum* (delprojekt I)
- at *P. verrucosum* udgør en risiko for dannelse af OTA. Svampen kan forårsage OTA-forekomster langt over grænseværdien, hvis den får de rette betingelser. Vi ved dog ikke

med sikkerhed, om OTA er dannet på lageret eller ved opbevaring på køl – eller måske begge steder (delprojekt I)

- at der kan være potentiale for hotspots i lagerfaciliteterne (delprojekt I)
- at det er vigtigt at være opmærksom på fugtbevægelse, temperaturgradienter og udvikling af *P. verrucosum* i hele tørrings- og lagringsperioden (delprojekt I + II)

Tørring

De to mest anvendte tørringssystemer i Danmark er lagertørringsanlæg/planlager og gennemløbstørring (Hougaard, teknisk medarbejder, Foulum, pers. komm.). Blandt økologiske bedrifter er lagertørring det mest anvendte (Høj, pers. komm.). Fordelene ved planlagre er, at de har stor modtagekapacitet, at kornet køles ned, og at tørring kan foregå med og uden varmetilførsel. Ulempen ved planlagre er, at det kan tage op til flere uger eller måneder at få kornet tørret ned, eftersom bunden af kornet ved beluftning tørres først. Fugten bevæger sig op gennem lageret, og derfor vil de øverste lag forblive forholdsvis våde, til tørreprocessen er næsten færdig (Scudamore & Wilkin, 1999). Denne uhomogene nedtørring kan være årsag til, at der dannes ideelle betingelser for udvikling af *P. verrucosum* og dannelse af OTA. Seitz *et al.* (1982) konkluderer, at lagring af korn ved temperatur og vandindhold, der er favorable for svampevækst, kan producere et uacceptabelt antal svampeinvasioner, før de anbefalede værdier for tab af vand er opnået. Systemet er desuden tidskrævende for landmanden, der løbende skal udtage prøver og følge udviklingen i lageret. Hvis der bliver anvendt omgivende luft til tørring, er tørringsperioden begrænset til morgen- og nattetimer med lave temperaturer (Scudamore & Wilkin, 1999). Ifølge Kristensen (Byholm, pers. komm.) bør kornet tørres i løbet af dagtimerne, hvor RH er lavest. I en undersøgelse af 24 planlagre finder Scudamore & Wilkin (1999) dog ikke, at planlagre har øget risiko for svampevækst og dermed dannelse af mykotoksiner. Alternativt kan kornet bl.a. tørres ved hjælp af et gennemløbstørreri. Det er en hurtig tørringsmetode, der giver en homogen tørring af kornet. Svagheden ved tørringssystemet er, at det har en begrænset kapacitet. År med dårlige høstbetingelser og store mængder vådt korn medfører en risiko for, at korn må vente i op til dage for at blive tørret ned (Scudamore & Wilkin, 1999). Desuden kræver systemerne fortløbende tilsyn, flytning af kornet og et stort energiforbrug (Høj, 1995).

Forebyggelse

Det bør så vidt muligt undgås, at *P. verrucosum* findes på kornet. De vigtigste anbefalinger til forebyggelse af vækst af *P. verrucosum* og dannelse af OTA (ifølge Chelkowski *et al.*, 1981, Elmholt og Haase, 2003) er opsummeret i følgende:

- Gode høstprocedurer og høstudstyr der undgår beskadigelse af kerner og forurening med jord, ukrudt og andre urenheder
- Valg af modstandsdygtige sorter/arter
- Gode rensningsmuligheder af kornet således at lagring med urenheder forhindres
- Gode tørringsfaciliteter der kan rengøres
- Gode tørringsmuligheder der sikrer en hurtig og homogen nedtørring, således at der ikke opstår fugtige lommer
- God overvågning

I fremtiden er det vigtigt til stadighed at informere om, hvordan kontaminering med mykotoksindannende svampe forebygges. Et udbygget monitoringsapparat, der på en hurtig og nem måde kan registrere vandindhold, temperatur, e.r.h. og tilstedeværelse af svampe i korn og foderblandinger, ville være ønskeligt. Således ville primærproducenterne kunne foregribe eller hindre risikoen for vækst af svampe og sundhedsskadelige konsekvenser af mykotoksiner. Med tanke på den store variation, der kan være i et lager, er det vigtigt, at monitoringsystemerne også udvikles i de næste led af produktionssystemet og i overvågningssystemet. Endelig er det vigtigt at arbejde på en øget forståelse af *P. verrucosum*s biologi. Undersøgelserne viser, at der stadig er behov for mere viden om *P. verrucosum*s livscyklus, specielt det led, der er mellem forekomsten i marken og på lager. Desuden mangler vi viden om, hvornår der dannes OTA og om, hvorfor det under tilsyneladende ens forhold dannes i nogle tilfælde, men ikke i andre. Således ville mulighederne for forebyggelse kunne forbedres.

6. Referencer

- Abramson, D. (1991). Development of molds, mykotoxins and odors in moist cereals during storage. In *Cereal Grain -Mykotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage* (J. Chelkowski, eds), 119-147. Elsevier, Amsterdam.
- Abramson, D. (1998). Mycotoxin Formation and Environmental Factors. In *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (R. N. Sinha & D. Bhatnagar, eds), 255-277. Marcel Dekker, New York.
- Abramson, D., Sinha, R. N., & Mills, J. T. (1997). Mycotoxin formation in moist 2-row and 6-row barley during granary storage. *Mycopathologia*, **97**, 179-185.
- Andersen, B. (1995). Characterization of Cereal-borne *Alternaria* and *Stemphylium*, Ph.D Thesis, Afdeling for Bioteknologi, DTU.
- Axberg, K., Jansson, G., Svensson, G., Hult, K. (1997). Varietal Differences in Accumulation of Ochratoxin A in Barley and Wheat Cultivars after Inoculation of *Penicillium verrucosum*. *Acta Agriculturae Scandinavica. Sect. B, Soil and Plant Science*, **47**, 229-237.
- Blank, G., Goswami, N., Madrid, F., Marquardt, R.R. & Frolich, A.A. (1995). Evaluation of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) Excreta on Ochratoxin Production in Stored Wheat. *Journal of Stored Products. Research*, **31**, 151-155.
- Boley, A. & Müller, H-M. (1986). Production of ochratoxin A, Citrinin, and Ergosterol By *Penicillium viridicatum* in Autoclaved Wheat at Low Temperature, *Mycotoxin Research*, **2**, 99-103.
- Boutrif, E. (1995). FAO Programmes for Prevention, Regulation, and Control of Mycotoxins in Food. *Natural Toxins*, **3**, 322-326.
- Boutrif, E. & Canet, C. (1998). Mykotoxin prevention and control: FAO programmes. *Revue de Medecine Veterinaire*, **149**, 681-694.

- Breitholtz, A., Olsen, M., Dahlback, A., & Hult, K. (1991). Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Additives and Contaminants*, **8**, 183-192.
- Chelkowski, J., Dopierala, G., Godlewska, B., Radomska, W. & Szebiotko, K. (1981). Mycotoxins in cereal grain. Part III. Production of ochratoxin A in different varieties of wheat, rye and barley. *Die Nahrung*, **25**, 625-629.
- Christensen, C. M. (1957). Deterioration of stored grains by fungi. *The Botanical Review*, **23**, 108-134.
- Ciegler, A., Fennell, D.I., Sansing, G.A., Detroy, R.W., Bennett, G.A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Applied Microbiology*, **26**, 271-278.
- Cooke, R.C. & Rayner, A.D.M. (1984). *Ecology of Saprotrophic Fungi*. Longman Group Limited, London.
- Damoglou, A.P., Downey, G.A. & Shannon, W. (1984). The production of ochratoxin A and citrinin in barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **35**, 395-400.
- Domsch, K. H., Gams, W & Anderson, T. (1993). *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London, Vol. 1 & 2.
- Elling, F. (1979). Porcin nefropathi. *Dansk Veterinær Tidsskrift*, **62**, 14-17.
- Elmholt, S. (2000). Field ecology of the ochratoxin A-producing *Penicillium verrucosum*: Survival and resource colonisation in soil. *Mycopathologia*, **147**, 67-81.
- Elmholt, S. (2003). Ecology of the ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum*: Occurrence in field soil and grain with special attention to farming system and on-farm drying practices. *Biological Agriculture & Horticulture*, **20**, 311-337.
- Elmholt, S. & Haase, M. (2003). Giftige svampe i tørringsanlæg. *Økologisk Jordbrug*, **287**, 13.

- Elmholt, S. & Haase, M. (2003). Improper handling of grain may result in high levels of Ochratoxin A. DARCOFenews. Newsletter from Danish Centre for Organic Farming. May 2003. No. 2. <http://www.darcof.dk/enews/may03/index.html>
- Elmholt, S. & Hestbjerg, H. (1996). Recovery and detection of deuteromycete conidia from soil: Exemplified by isolation of *Penicillium verrucosum* Dierckx on a selective and diagnostic agar medium. In *Monitoring Antagonistic Fungi Deliberately Released into the Environment*. (D. F. Jensen, H. B. Jansson, & A. Tronsmo, eds), 49-55. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Elmholt, S. & Kristensen, E. F. (2001). Korn uden mykotoksiner. In *Produktion af kvalitetshvede i Danmark. En oversigt over problemer og muligheder*. (J. Waagepetersen et al., eds), 45-55. DJF rapport 53. Danmarks JordbrugsForskning, Foulum.
- Elmholt, S. & Mortensen, G.K. (2003). Kan OTA-dannende lagersvampe inficere kornet i marken?. *Forskningsnytt*, **1**, 24-26.
- Elmholt, S., Labouriau, R., Hestbjerg, H., & Nielsen, J. M. (1999). Detection and estimation of conidial abundance of *Penicillium verrucosum* in soil by dilution plating on a selective and diagnostic agar medium (DYSG). *Mycological Research*, **103**, 887-895.
- EU. (2002). Survey of retail rice for a range of mycotoxins. Food Survey Information Sheets. [www: http://www.food.gov.uk/science/surveillance/](http://www.food.gov.uk/science/surveillance/)
- Fagt, S.; Trolle, E. (2001). Udviklingen i danskernes kost- forbrug, indkøb og købevaner. 1. Forsyningen af fødevarer 1955-1999. FødevarerRapport 10. Fødevaredirektoratet, København.
- Filténborg, O. (1994). Hvad er farligst, Salmonella eller mykotoksiner. *Mikrobiologi Nyt*, **4**, 3-7.
- Flannigan, B. (1978). Primary contamination of barley and wheat grain by storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **71**, 37-42.

- Frisvad, J.C. (1995). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. In *Stored-Grain Ecosystems* (D. S. Jayas, N. D. G. White & W. E. Muir, eds), 251-288. Marcel Dekker, New York.
- Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (1989). Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, **81**, 837-861.
- Frisvad, J.C., Bridge, P.D. & Arora, D.K. (1998). Role and Use of Secondary Metabolites in Fungal Taxonomy. In *Chemical Fungal Taxonomy*, 289-319. Marcel Dekker, New York.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Lund, F., & Thrane, U. (1992). New selective media for the detection of toxigenic fungi in cereal products, meat and cheese. In *Modern methods in food mycology*, (R. A. Samson, A.D. Hocking, J.I. Pitt & A.D. King, eds), 275-285. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O. & Thrane, U. (1989). Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **18**, 331-335.
- Gareis, M., Rosner, H., & Ehrhardt, S. (2000). Blood serum levels of ochratoxin A and nutrition habits. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51**, 108-110.
- Haasum, I. & Nielsen, P.V. (1998). Ecophysiological Characterization of Common Food-Borne Fungi in Relation to pH and Water Activity under Various Atmospheric Compositions. Afdeling for Bioteknologi, Technical University of Denmark, Lyngby, 51-80.
- Haggblom, P. (1982). Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. *Mycotoxins*. *American Society for Microbiology*, **43**, 1205-1207.
- Hestbjerg, H. (1993). *Penicillium verrucosum* og dens produktion af ochratoksin, Litteraturstudium i økologisk perspektiv. Intern rapport, Afdeling for Jordbiologi og – kemi, Forskningscenter Foulum.

- Hestbjerg, H. (1999). Mycometabolites in the ecology of *Fusarium* - exemplified by characterisation of *F. culmorum* and *F. equiseti*. Ph.D Thesis. Botanical Institute, Faculty of Science, University of Copenhagen, Denmark.
- Hokby, E., Hult, K., Gatenbeck, S., & Rutqvist, L. (1979). Ochratoxin A and citrinin from *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium citrinum* in 1976 crop of barley stored on farms in Sweden Mycotoxins. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 29, 174-178.
- Holmberg, T., Breitholtz, E. A., Haggblom, P., Schwan, O. & Hult, K. (1991). *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia*, 116, 169-176.
- Høj, J.J. (1995). Kornbehandling - Tørring, lagring og transport. *Landskontoret for Bygninger og Maskiner*, Landbrugets Rådgivningscenter, Skejby.
- Jacobsen, J. S. & Jørgensen, K. (1999). Overvågningsprogram for ochratoksin A i korn og mel 1998-2002. Fødevaredirektoratet, København.
- Janzen, D.H. (1977). Why fruits rot, seeds mold, and meat spoils. *American Naturalist*, 111, 691-713.
- Jensen, K.O., Larsen, H.N., Mølgaard, J.P., Andersen, J.-O., Tingstad, A., Marckmann, P. & Astrup, A. (2001). Økologiske fødevarer og menneskers sundhed. rapport nr.14, Forskningscenter for Økologisk Jordbrug, Foulum.
- Jørgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. 15, 550-554.
- Jørgensen, K. & Jacobsen, J.S. (2002). Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. *Food Additives and Contaminants*, 19, 1184-1189.
- Jørgensen, K., Larsen, E.H., Petersen, A., Lund, K.H., Hilbert, G., Andersen, N.L., Hallas-Møller, T. & Larsen, J.C. (2000). In *Kemiske forureninger, Overvågningsystem for levnedsmidler 1993-1997. Del 2*. 61-68. Fødevaredirektoratet, København

- Jørgensen, K., Rasmussen, G., & Thorup, I. (1996). Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 95-104.
- Kristensen, E.S. (2000). Principper for økologisk jordbrug. Forskningscenter for Økologisk Jordbrug (FØJO), Forskningscenter Foulum.
- Kristensen, E.F. & Søgaard, H.T. (2001). Tørring og varmebehandling af maltbyg og brødkorn i tromletørreri. DJF rapport Markbrug 43. Danmarks JordbrugsForskning, Forsningscenter Foulum.
- Krogh, P. (1987). Ochratoxins in Food. In *Mycotoxins in Food* (P. Krogh, eds), 97-121. Academic Press, London.
- Krogh, P., Hald, B., Englund, P., Rutqvist, L., Swahn, O. (1974). Contamination of Swedish cereals with ochratoxin A. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B*, **82**, 301-302.
- Larsen, T.O., Svendsen, A., & Smedsgaard, J. (2001). Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 3630-3635.
- Lillehoj, E.B. & Elling, F. (1983). Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities, *Acta Agriculturae Scandinavica*, **33**, 113-128.
- Madhyastha, S.M., Marquardt, R.R. & Frohlich, A.A. (1993). Growth and ochratoxin production of *Aspergillus alutaceus* on seed of wheat and rapeseed cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, **73**, 163-166.
- Madhyastha, S.M., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Platford, G., Abramson, D. (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of Agricultural and Food Chem*, **38**, 1506-1510.
- Magan, N. & Lacey, J. (1984). Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **82**, 71-81.

- Marquardt, R.R. & Frohlich, A.A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis. *Journal of Animal Science*, **70**, 3969-3988.
- Marquardt, R.R. & Ronald, R. (1996). Effects of molds and their toxins on livestock performance: A western Canadian perspective. *Animal-Feed-Science-and-Technology*. **58**, 77-89.
- Mills, J.T., Seifert, K.A., Frisvad, J.C. & Abramson, D. (1995). Nephrotoxicogenic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada. *Mycopathologia*. **130**, 23-28.
- Mislivec, P.B. & Tuite, J. (1970). Species of *Penicillium* occurring in freshly-harvested and in stored dent corn kernels. *Mycologia*, **62**, 67-74.
- Müller, H.-M. & Boley, A. (1991). Effect of autoclaving and surface disinfection of wheat on the production of ergosterol, ochratoxin A and citrinin by *Penicillium verrucosum*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, **146**, 445-451.
- Müller, H.-M. & Boley, A. (1992). Untersuchungen zur Kühlagerung von Weizen. 1. Mitteilung – Ergosterin, Ochratoxin A und Citrinin nach Zuimpfung von *Penicillium verrucosum*. *Archives of Animal Nutrition*, **42**, 351-363.
- Nielsen, F. & Mortensen, J. (1997). Spelt i økologisk dyrkning. Grøn Viden, Landbrug, 180, Danmarks JordbrugsForskning, Forskningscenter Foulum.
- Olsson, J. (2000). Modern Methods in Cereal Grain Mycology. Ph.D. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Microbiology, Agraria 241.
- Ominski, K.H., Marquardt, R.R., Sinha, R.N. & Abramson, D. (1994). Ecological Aspects of Growth and Mycotoxin Production by Storage Fungi. In *Mycotoxins In Grain, Compounds Other Than Aflatoxin* (J.D. Miller & H.L. Trenholm, eds), 287-312. Eagan press, Minnesota, USA.

- Osborne, B.G., Ibe, F., Brown, G.L., Petagine, F., Scudamore, K.A., Banks, J.N., Hetmanski, M.T. & Leonard, C.T. (1996). The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 141-153.
- Parkinson, D. (1994). Filamentous fungi. In *Methods of Soil Analysis* (R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, A. Wollum, eds), 329-350. Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Pedersen, L.H., Skouboe, P., Boysen, M., Soule, J. & Rossen, L. (1997). Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *International Journal of Microbiology*, **35**, 169-177.
- Petersen, J.H. (1995). *Svamperiget*. Aarhus Universitetsforlag, Aarhus. 343 pp.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional, London.
- Pitt, J.I., Basilico, J.C., Abarca, M.L. & Lopez, C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, **38**, 41-46.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an updated review. *Revue de Medecine Veterinaire*, **149**, 479-492.
- Pixton, S.W. (1982). The importance of moisture and equilibrium relative humidity in stored products. *Tropical Stored Products Information*, **43**, 16-29.
- Pixton, S.W. & Warburton, S. (1971). Moisture content/relative humidity equilibrium of some cereal grains at different temperatures. *Journal of Stored Products. Research*, **6**, 283-293.
- Plantedirektoratet. (2000). Vejledning om økologisk jordbrugsproduktion.
- Quasen, S.A. & Christensen, C.M. (1960). Influence of various factors on the deterioration of stored corn by fungi. *Phytopathology*, **50**, 703-709.

- Ramakrishna, N., Lacey, J. & Smith, J.E. (1996). Colonization of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. *Journal of Food Protection*, **59**, 1311-1317.
- Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & King, A.D. (1992). *Modern Methods in Food Mycology*. Elsevier, Amsterdam.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., & Filtenborg, O. (2000). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Utrecht.
- Hoseney, R.C. & Faubion, J.M. (1992). Physical Properties of Cereal Grains. In *Storage of cereal grains and their products* (D.B. Sauer eds), 1-38. American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA.
- Sauer, D.B. & Burroughs, R. (1980). Fungal growth, aflatoxin production and moisture equilibration in mixtures of wet and dry corn. *Phytopathology*, **70**, 516-521.
- Schnürer, J. & Jonsson, A. (1992). Ergosterol Levels and Mould Colony Forming Units in Swedish Grains of Food and Feed Grade. *Soil and Plant Science*, **42**, 240-245.
- Schwartz, G.G. (2002). Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer?. *Cancer Causes & Control*, **13**, 91-100.
- Scudamore, K. A. & Wilkin, D.R. (1999). A study to determine whether on-floor ambient drying systems are conducive to the formation of ochratoxin A in grain (1613). Project Report 196. Home-Grown Cereals Authority, London. 70 pp.
- Seitz, L.M., Sauer, D.B., Mohr, H.E. & Aldis, D.F. (1982). Fungal growth and dry matter loss during bin storage of high-moisture corn. *Cereal-Chemistry*, **59**, 9-14.
- Shotwell, O.L., Goulden, M.L., Bothast, R.J. & Hesseltine, C.W. (1975). Mycotoxins in hotspots in grain. I. Aflatoxin and zearalenone occurrence in stored corn. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, **52**, 687-697.

- Simmons, E.G. (1992). *Alternaria* Taxonomy: Current Status, Viewpoint, Challenge. In *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites* (J. Chelkowski & A. Visconti, eds), 1-35. Elsevier, Tokyo.
- Sinha, R.N. & Wallace, H.A.H. (1965). Ecology of a fungus-induced hot spot in stored grain. *Canadian Journal of Plant Science*, **45**, 48-59.
- Smith, J.E., Lewis, C.W., Anderson, J.G. & Solomons, G.L. (1994). Mycotoxins in Human Nutrition and Health, EUR 16048 EN. European Commission Directorate-General XII, Agro-industrial division, E-2.
- Sørensen, B. & Thysen, I. (2001). Vejret i vækståret september 2000 – august 2001. Grøn Viden, Markbrug, 242. Afdeling for Jordbrugssystemer, Danmarks JordbrugsForskning, Forskningscenter Foulum.
- Sørensen, B., Nielsen, F. & Thysen, I. (2000). Vækståret september 1999 – august 2000. Grøn Viden, Markbrug, 229. Afdeling for Jordbrugssystemer, Danmarks JordbrugsForskning, Forskningscenter Foulum.
- Thuvander, A., Paulsen, J. E., Axberg, K., Johansson, N., Vidnes, A., Enghardt-Barbieri, H., Trygg, K., Lund-Larsen, K., Jahrl, S., Widenfalk, A., Bosnes, V., Alexander, J., Hult, K. & Olsen, M. (2001). Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food-chem-toxicol*, **39**, 1145-1151.
- Walker, R. (1999). Mykotoksins of growing interest. Ochratoxins. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunis, Tunisia.
<http://www.fao.org/es/ESN/mycoto/papers/myco5b.pdf>
- Warcup, J.H. (1957). Studies on the occurrence and activity of fungi in a wheat-field soil. *Transactions of the British Mycological Society*, **40**, 237-262.

- Wicklow, D.T. (1995). The Mycology of Stored Grain: An Ecological Perspective. In *Stored-Grain Ecosystems*, (D. S. Jayas, N. D. G. White, & W. E. Muir, eds), 107-249. Marcel Dekker, New York.
- Wilson, D.M. & Abramson, D. (1992). Mycotoxins. In *Storage of Cereal Grains and Their Products*, (D. B. Sauer, ed), American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA.
- Økologisk rådgivning. (2001). Økologisk Planteavlsberetning 2001, Køge Ringsted.