

Farm 4U

Svampe i kornlagre

Susanne Elmholt

Seniorforsker

Afdeling for Plantevækst og Jord, Forskningscenter Foulum, PO Box 50, 8830 Tjele
Tlf. 8999 1858, Fax 8999 1619, E-mail [susanne.elmholt\(at\)agrsci.dk](mailto:susanne.elmholt(at)agrsci.dk)

Jørgen Nielsen

Miljøtekniker

Afdeling for Plantevækst og Jord, Forskningscenter Foulum, PO Box 50, 8830 Tjele
Tlf. 8999 1854, Fax 8999 1619, E-mail [JorgenM.Nielsen\(at\)agrsci.dk](mailto:JorgenM.Nielsen(at)agrsci.dk)

Det er ikke kun mennesker og dyr, der sætter pris på vores korn. Mange svampe kan leve af korn, og nogle kan danne giftige stoffer (mykotoksiner). Allerede mens kornet står på marken bliver det koloniseret af forskellige såkaldte "marksvampe". I våde høstår kan kornaksene og dermed markerne blive næsten helt sorte af disse svampe. På lageret er det andre arter, der er almindelige, de såkaldte "lagersvampe". Man ser altså en succession af forskellige svampe og en mikrobiel balance mellem arterne. Denne balance afhænger bl.a. af kornets temperatur og fugtighed. Det er vigtigt, at kornet tørres og derefter nedkøles så hurtigt og effektivt som muligt for at undgå at svampene opformerer og – hvis de rette arter er til stede – danner mykotoksiner. I Farm 4U projektet ser vi på svampene ved to forskellige tørringsmetoder.

Forsøgsbeskrivelse

I skal undersøge svampefloraen på korn fra to gårde:

- 1) Gård nr. 1:
 - a) Tærsket korn **Prøve 1**
 - b) Tørret korn (plantørreri) **Prøve 2**
- 2) Gård nr. 2:
 - a) Tærsket korn **Prøve 3**
 - b) Tørret korn (tromletørreri) **Prøve 4**

Den vigtigste svamp, vi kigger efter, er en art af slægten *Penicillium*, der kan danne giftstoffet ochratoksin. Den hedder *Penicillium verrucosum*. Til at bestemme den bruger vi et selektivt/indikativt substrat, der hedder Dichloran Yeast extract Sucrose agar med 18% Glycerol, i daglig tale kaldet **DYSG**. At substratet er "selektivt" betyder at det holder mange andre svampe væk. At substratet er "indikativt" betyder at man kan kende *P. verrucosum* fra de øvrige svampe på substratet. **Det man kan kende den på, er dens murstensrøde (terrakotta) farve på bagsiden af kolonien**, dvs. at I bestemmer den vha. af makroskopiske kendetegn (det man kan se uden mikroskop). Desuden skal I lære nogle af de øvrige svampe på korn at kende.

Baggrund

Svampe findes overalt i naturen. Ligesom bakterier, dyr og planter har de deres eget ”rige” (Kingdom). På latin hedder det Mycota, derfor hedder læren om svampe mycologi. Man har skønnet, at der findes omkring 1,5 millioner forskellige arter af svampe.

Langt de fleste arter er gavnlige: de er med til at nedbryde og omsætte plante- og dyrerester til næringsstoffer, de giver jorden struktur (”jord-krummer”), de hæmmer sygdomsfremkaldende organismer og de tjener som føde for mange dyr. **En del svampe er dog skadelige**, f.eks. ved at fremkalde plantesygdomme eller ved at danne stoffer, der er giftige over for mennesker og dyr. Disse giftstoffer kaldes mykotoksiner.

De mest problematiske mykotoksiner på dansk korn er ochratoksin A (OTA), som dannes af *Penicillium verrucosum*, og deoxynivalenol (DON) og zearalenon, som dannes af flere forskellige arter af *Fusarium*. **OTA** er kendt for sin nyretoksiske effekt på svin og mennesker, og er på listen over kræftfremkaldende stoffer. I våde høstår er der risiko for at indtage så meget OTA via kornprodukter, at man overskrider den nordiske grænseværdi på 5ng/kg legemsvægt pr. dag. OTA dannes primært i lagret korn. **DON** tilhører en stor gruppe af mykotoksiner, som kaldes trichothecener. Nogle trichothecener dannes, mens kornet står på marken. Det gælder f.eks. DON. Både OA og DON er varmestabile og findes derfor også i forarbejdede produkter. DON har toksiske effekter på fordøjelsessystemet og medfører opkastning (deraf tilnavnet vomitoksin) og reduceret ædelyst hos husdyr. Der er endnu ingen danske grænseværdier, men den DON-mængde, korn normalt indeholder, ligger oftest under de amerikanske grænseværdier. **Zearalenon**, som dannes af flere forskellige *Fusarium* arter, er kendt for sin østrogeneffekt, dvs. det er et af de naturligt forekommende hormonlignende stoffer.

Svampe er heterotrofe, dvs. de lever af dødt organisk materiale. **På alt korn findes der svampe.** De findes i rodsystemet, på bladene og i akset. I løbet af vækstsæsonen ændres sammensætningen af svampefloraen på en kornplante, der sker en succession. Denne succession fortsætter, når kornet er høstet, idet ”**marksvampe**” (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*) gradvist afløses af ”**lagersvampe**” som *Penicillium* og *Aspergillus*.

I vækstsæsonen afhænger svampefloraens sammensætning blandt andet af arts- og sortsvalg, pesticidanvendelse, temperatur og nedbør. **På lager afhænger svampefloraen af tørrings- og lagringsbetingelser.**

I Danmark er der næsten altid behov for at tørre kornet efter høst. **For at undgå svampevækst er det vigtigt at sørge for en hurtig og effektiv nedtørring og nedkøling** til vandindhold og temperatur, der er for lave til at svampe kan vokse. Hvis korn høstes, tørres og nedkøles efter forskrifterne kan det lagres i flere år uden at kvaliteten forringes. Omvendt kan det ved uhensigtsmæssig håndtering ødelægges meget hurtigt af svampe, insekter og/eller mider.

Der findes forskellige tørringsteknikker. I 50’erne begyndte man at tørre korn på gårdene. Mest almindelige var såkaldte **portionstørrerier**. Her nedtørres forholdsvis små portioner ved 30 – 45°C. Kapaciteten er dog oftest for lille i forhold til den mejetærskerkapacitet landmændene råder over i dag, og anlægget kræver meget arbejdskraft. Fordelen er at man kan tørre meget vådt korn hurtigt ned. I 60’erne blev der etableret mange **gennemløbstørrerier**. Her sker en kontinuert tørring og køling af kornet i tynde lag med samtidig påfyldning af utørret korn foroven og fjernelse af det tørrede korn forneden. Tørringen er hurtig og effektiv og med stor kapacitet. Ulemperne er krav om transport til og fra tørringsanlægget og ofte et behov for senere nedkøling af kornet. Processen kan

desuden være hård ved kornets spireevne pga høj temperatur (60 – 120 °C). Gennemløbstørrerier er i dag mest udbredt i foderstofforretninger og på store gårde. Mange landmænd har i dag et **plantørreri**. Det består typisk af hovedkanal og sidekanaler, der er lagt ud på gulvet. Kornet lægges i et lag herover og gennemblæses med eller uden varmetilsætning. Et sådant anlæg stiller store krav til styring af luftens relative fugtighed, da det er den eneste måde hvorpå der kan opnås ensartet vandindhold fra bund til top. I forhold til portions- og gennemløbstørring tager plantørring ofte lang tid. Derfor er der stor risiko for svampevækst, hvis det ikke gøres rigtigt. Fordelene ved plantørring er deres store kapacitet, og at anlægget kan bruges til både tørring, beluftning og køling i hele lagerperioden. Dvs. at der ikke skal bruges penge og arbejdskraft på at flytte kornet.

De traditionelt anvendte tørringsteknikker har vist sig ikke altid at være tilstrækkelige. Vi har resultater, der viser en kraftig forøgelse i antallet af toksinproducerende svampe umiddelbart efter tørringens afslutning. Dette kan ske som følge af en utilstrækkelig tørring eller via et forurenede tørringsanlæg. F.eks. har vi kunnet vise, at tørringsanlæggets konstruktion kan give vanskeligheder i forbindelse med rengøring, så sporerne overlever og kan overføres fra år til år. Det er tilsvarende af betydning at indlægning og lagring sker i rengjorte siloer. Her kan især peges på, at materialer som træ og hessian ifølge vores resultater ser ud til at give problemer.

Derfor vil tørringsteknikker, som kan eliminere eller reducere svampeforekomsten uden i øvrigt at skade kornets kvalitet, være af stor værdi. **Undersøgelser med tromletørring** af maltbyg og brødkorn har vist, at det er muligt at påvirke og ofte forbedre kvaliteten ved denne tørringsmetode. De gennemførte forsøg viser en optimal behandlingstemperatur - målt som kernetemperatur ved afgang fra tørretromle - på 50-70°C. Kornet opholder sig kun i tromlen i få minutter. Indledende undersøgelse har vist, at **tromletørring er i stand til markant at reducere svampe på kornkernernes overflade** og dermed forhindre eller reducere risikoen for dannelse af mykotoksiner i kornet.

Mykotoksiner udgør en risiko for kornkvaliteten. Vore resultater såvel som resultaterne af Veterinær og Fødevarerdirektoratets overvågningsprogram tyder på, at problemer opstår på enkelte gårde, og at godt landmandsskab i forbindelse med kornhåndtering er meget afgørende for, om der bliver problemer. Hvis vi opnår en detaljeret viden om de mykotoksin-producerende svampes livscyclus, både i marken og på lageret, vil det i højere grad være muligt at målrette landbrugsdriften, så man effektivt imødegår opformering af toksinproducerende svampe og dermed risikoen for toksindannelse.

Litteratur

Svampe

Gravesen, S., Frisvad, J.C., & Samson, R.A. (1994). *Microfungi*. Copenhagen: Munksgaard.

Bogen har fokus på toksindannende svampe

Murray, T.D., Parry, D.W., & Cattlin, N.D. (1999). *Sygdomme i korn - en håndbog i farver*. København: DSR Forlag.

Petersen, J.H. (1995) Svamperiget. Det naturhistoriske fakultet, Aarhus Universitet.

ny dansk grundbog om svamperiget til brug på universitetet og andre højere læreanstalter; men også brugbar for den engagerede amatør-mycolog.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., & Filtenborg, O. (2000). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Vores arbejde

Elmholt, S. (2000). Mykotoksiner i mark og på lager. *JordbrugsForskning*, 4, 2-4.

Elmholt, S. & Hestbjerg, H. (2000). Field ecology of the ochratoxin A-producing *Penicillium verrucosum*: Survival and resource colonisation in soil. *Mycopathologia*, 67-81.

Elmholt, S. & Kristensen, E.F. (2001). Korn uden mykotoksiner. DJF rapport 53. Danmarks JordbrugsForskning, Foulum. In J. Waagepetersen, J.B. Petersen, L. Knudsen, G. Deneken, & J.R. Jørgensen (Eds.), *Produktion af kvalitetshvede i Danmark. En oversigt over problemer og muligheder* (pp. 45-55). Foulum: Danmarks JordbrugsForskning.

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.

Hestbjerg, H. (1999) Mycometabolites in the ecology of *Fusarium* - exemplified by characterisation of *F. culmorum* and *F. equiseti*. Botanical Institute, Faculty of Science, University of Copenhagen, Denmark.

Hestbjerg, H. & Elmholt, S. (2000). Toksinproducerende svampes økologi. In Anonymous 17. *Danske Planteværnskonference - Positionsbestemt plantebeskyttelse/beslutningsstøtte/sygdomme-skadedyr/akksfusariose* (pp. 171-179). Foulum: Danmarks JordbrugsForskning.

Korntørring

Høy, J. J. (1995) Kornbehandling - Tørring, lagring og transport. Landbrugets Rådgivningscenter, Skejby, Landskontoret for Bygninger og Maskiner.

Meget fin oversigt over problemer og løsninger ved kornhåndtering efter høst

Kristensen, E. F. and Søgaard, H. T. (2001) Tørring og varmebehandling af maltbyg og brødkorn i tromletørreri. Foulum, Danish Institute of Agricultural Sciences. DJF rapport nr. 43.

Gode links

<http://www.dlg.dk/dk/planteavl/korn/kornopbevaring/biologi/kornbiologi.pdf>

Her fortælles kort om god og dårlig kornhåndtering, herunder også lidt om svampe og insekter der angriber lagret korn

<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>

Her fortælles kort om svamperiget (på engelsk)

http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Index_of_Descriptions.html

Her fortælles ganske kort om de fleste af de slægter der er vist i renkultur (på engelsk)

Fremgangsmåde

Aktivitet 1. I skal udlægge 100 kerner på DYSG af hver af de fire prøver

Aktivitet 2. I skal opgøre forekomst af *P. verrucosum* i de fire prøver (udlagt for en uge siden)

Aktivitet 3. I skal se på de øvrige svampe på kernerne og beskrive evt. forskelle i svampeflora

Aktivitet 4. I skal med hjælp fra mikroskopet undersøge renkulturene og forsøge at sætte et navn på dem

De første tre aktiviteter foregår i laboratoriet i PV26 (2210), den sidste i PV26 og i Farm4U's laboratorium i Forskerparken.

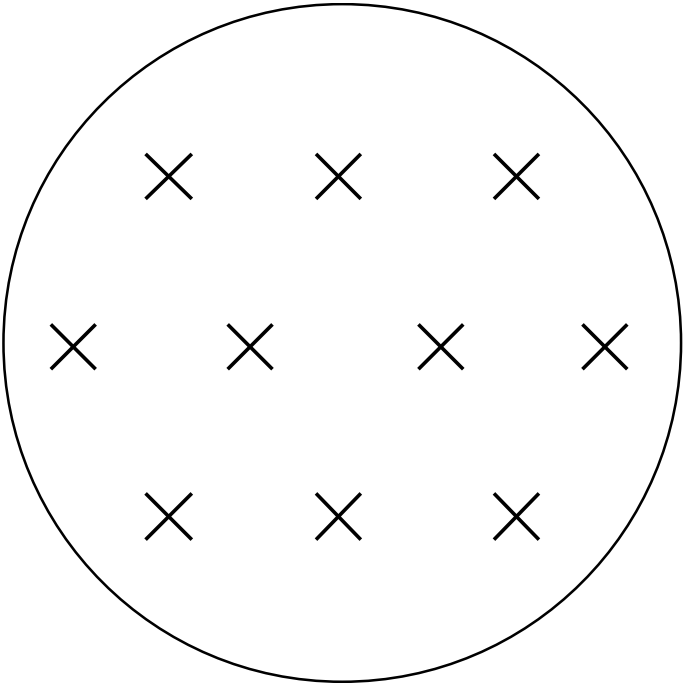
Aktivitet 1. Udlægning af kerner

Arbejdet foregår i Flow-bænk (sterilt) for at undgå forurening fra luftbårne svampe. Flowbænken tændes og tørres af med ethanol ½ time før brug. Der skal bruges følgende materialer til forsøget:

- Spritflamme og tændstikker
- 4 petriskåle med prøver af korn (1-4)
- Pincet
- Bægerglas med ethanol (ren alkohol)
- 40 petriskåle med DYSG
- Sprittusch
- Skabelon til udlægning af kerner (Figur 1)
- 4 plastposer med lufthuller
- Inkubator der er indstillet til 25°C

1. I får udleveret fire petriskåle med kornprøver (1-4)
2. De 40 støbte skåle nummereres med prøvens nummer (10 skåle til hver prøve), I kan eventuelt dele prøverne mellem jer
3. For hver prøve følgende fremgangsmåde: Pincetten flamberes. Det gøres ved at dyppe den i et bægerglas med ethanol og brænde ethanol af over en spritflamme. **Pas meget på, at flammen er gået HELT ud inden I går videre.** Der overføres 10 kerner fra petriskålen til hver af de 10 støbte agarskåle. Kerner lægges efter en skabelon (se Figur 1). Kernerne lægges tilfældigt med bugfure op- eller nedad (her kan man vælge at gøre det ens for alle kerner). Pincetten flamberes mellem hver skål. I alt 10 skåle (=100 kerner) fra hver af de fire prøver
4. Skålene med kerner stables med 10 i hver. De sættes i plastpose med lufthuller og inkuberes retvendt ved 25°C i 7 døgn

Figur 1. Aktivitet 1. Skabelon til udlægning af kerner:



Aktivitet 2. Forekomst af *P. verrucosum* i prøve 1-4

Arbejdet foregår i stinkskab for at beskytte ”operatøren”. Det er giftigt materiale, idet svampene er meget villige til at danne mykotoksiner på et substrat som DYSG. **Skålene må ikke atges ud af stinkskalet.** . De indeholder nemlig også toksiner! Der skal bruges følgende materialer til forsøget:

- 40 DYSG petriskåle med kerner, der er udlagt for 7 dage siden
- Farveprint af *P. verrucosum* på DYSG (ligger i stinkskalet)
- Skema til opgørelse af resultatet (Figur 2)
- Sprittusch

Fra de fleste kerner vokser der mere end én art frem. For hver petriskål aflæses og markeres med tusch, hvor mange af kernerne der har vækst af *P. verrucosum*, dvs. hvor mange af kernerne der er kontamineret. Det gøres fra bagsiden (petriskålens revers), og svampen kendes på sin rustrøde farve (se eksemplet der er lagt frem). Resultatet for hver petriskål indføres i skemaet (Figur 2). Til sidst beregnes kontaminationsprocenten for de fire prøver på følgende måde:

$$\text{Kontaminations \%} = \frac{\text{antal kontaminerede kerner}}{\text{antal udlagte kerner ialt}} \times 100 \%$$

Figur 2. Aktivitet 2. Skema til opgørelse af *P. verrucosum*

Prøve 1 (tærsket kort fra Gård 1)

Antal kerner: 100

Antal kerner med *P. verrucosum* :

Kontaminationsprocent:

Prøve 2 (tørret kort fra Gård 1)

Antal kerner: 100

Antal kerner med *P. verrucosum* :

Kontaminationsprocent:

Prøve 3 (tærsket kort fra Gård 2)

Antal kerner: 100

Antal kerner med *P. verrucosum* :

Kontaminationsprocent:

Prøve 4 (tørret kort fra Gård 2)

Antal kerner: 100

Antal kerner med *P. verrucosum* :

Kontaminationsprocent:

Aktivitet 3. Makroskopisk beskrivelse af de øvrige svampe på kernerne

Arbejdet foregår i stinkskaab. **Skålene må ikke atges ud af stinkskaabet.** Nu skal I så godt det lader sig gøre beskrive eventuelle forskelle i de 4 prøver. Herunder kan I vurdere følgende:

Prøvenummer: _____

Er der sterile kerner, dvs. kerner uden svampevækst ?
Vokser der kun en art fra hver kerne eller er det almindeligt med mange forskellige svampe fra hver kerne ?
Er der forskel på deres væksthastighed og kan det have betydning for resultatet ?
Er det bestemte svampe der dominerer i de fire prøver?
Hvordan ser de dominerende svampe ud (se på både underside (revers) og overside (obvers) af petriskål
Kan man makroskopisk se om svampene har dannet sporer ? Hvordan afslører det sig?
Er der forskel på de fire prøver ?
Hvis der er forskel, hvad siger det jer så umiddelbart om tørringens effektivitet?
Har I set lignende svampe før (i køkkenet, i marken, i haven, på fugtige vægge) ?

Aktivitet 4. Mikroskopisk undersøgelse af renkulturer af svampe

Nu skal renkulturer af vigtige kornsvampe bestemmes. En renkultur er en petriskål hvori der kun findes én art, der er rendyrket f.eks. fra en kerne hvor der voksede forskellige arter. Arbejdet udføres i Farm4U's laboratorium i Forskerparken. Der kan/skal anvendes følgende:

- Mikroskop (transmissions og/eller stereomikroskop)
- Objektglas
- Tape eller dækglas
- Skalpel
- Shear's Mounting Fluid (SMF)

Åbn skålene så lidt som muligt! Skåle markeret med giftmærkat må kun åbnes i stinkskab!

Præparater til mikroskopi fremstilles på følgende måde **og i stinkskab**:

1. En lille dråbe SMF dryppes på et objektglas.
2. Fremstilling af præparat. En stykke tape (ca. 4 cm) skæres af. Ca. 0.5 cm af det midterste af tapen trykkes forsigtigt mod svampekulturen og svampematerialet lægges i SMF'en på objektglasset.
3. Man kan også lave et præparat ved med en skalpel at skære et lille stykke (ca. 0,3x0,3cm) ud af svampekulturen og lægge et dækglas over.
4. "Find" svampematerialet på objektglasset ved lav forstørrelse og gå først derefter gradvist op i forstørrelse (**pas på ikke at kvase præparat og dækglas med objektivet, brug kun finskruen på mikroskopet ved store forstørrelser!**).
5. Brug bøgerne og billederne til at bestemme svampene så godt I kan. Hvis I kan bestemme svampene til slægtsniveau er det meget fint. At bestemme til artsniveau kræver næsten altid specialistviden og særlige bestemmelsesværker. Her gælder at nogle slægter er vanskeligere end andre!
6. I kan indføre navne på de svampe i har bestemt i skemaet på næste side

Nr.	Navn	Tegning af sporer
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		