



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014 – 2015

Onderzoek naar het effect van stikstof en azijnzuur op
Penicillium roqueforti s.l.

Emily Galmart

Promotor: Prof. dr. ir. Geert Haesaert

Tutor: ir. Eva Wambacq

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de scriptie te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

“The author and the promoter give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis.”

Gent, mei 2015

De promotor

Prof. Dr. Ir. Geert Haesaert

De tutor

Ir. Eva Wambacq

De auteur

Emily Galmart

Woord vooraf

Met genoegen maak ik van de gelegenheid gebruik om enkele personen te bedanken die deze thesis mee tot een goed einde gebracht hebben.

Vooreerst mijn oprechte dank aan mijn promotor Prof. Dr. Ir. Geert Haesaert voor het aanreiken van dit onderwerp en het nalezen van mijn masterproef. Ook een woord van dank aan mijn co-promotor Ir. Eva Wambacq voor de uitstekende begeleiding bij de praktische proeven en de opvolging van deze thesis.

Daarnaast wil ik ook alle docenten van de Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen van de Universiteit Gent bedanken voor het bijdragen van alle wetenschappelijke informatie tijdens de volledige opleiding.

Ook aan alle mensen die tewerkgesteld zijn op de Proefhoeve in Bottelare, een woord van dank voor hun hulp bij het uitvoeren van de praktische proeven.

Ook het Labo voor Chemische Analysen van de Universiteit Gent wil ik graag bedanken, en in het bijzonder een woord van dank aan Ilse De Leersnyder voor de ontwikkeling van de methode voor de roquefortine C bepaling en de begeleiding hiervoor bij deze thesis.

Verder wens ik mijn vrienden en klasgenoten te bedanken voor de steun en hulp die ze me boden zowel bij deze thesis als gedurende de hele opleiding. Bij vragen kon ik ook steeds bij hen terecht.

Ten slotte nog een speciaal woord van dank aan mijn mama die het mogelijk maakte voor mij om deze studies te kunnen doen, en aan mijn broer en zussen voor hun steun tijdens mijn opleiding. Ook mijn vriend Jens wil ik hierbij graag bedanken.

Allen van harte bedankt!

Emily Galmart

Gent, mei 2015

Samenvatting

Kuilvoeder is één van de belangrijkste voederbronnen op landbouwbedrijven. Het zorgt ervoor dat maïs, gras en andere groenvoeders lang bewaard kunnen worden. Hierdoor is het gebruik van kuilvoerders de laatste decennia sterk toegenomen in NW-Europa. De bewaring van kuilvoeder is gebaseerd op een anaeroob fermentatieproces door voornamelijk melkzuurbacteriën. Indien het voeder niet goed bewaard wordt, krijgen bederfororganismen de kans om zich te ontwikkelen. Zo is het klimaat in België zeer gunstig voor de schimmel *Penicillium roqueforti* s.l., meer bepaald *P. roqueforti* s.s. en *P. paneum*, die zeer goed aangepast is aan de groei in zuur milieu met lage gehalten aan zuurstof. Het door *P. roqueforti* s.s. als *P. paneum* geproduceerde mycotoxine roquefortine C kan zeer nadelige effecten hebben voor de diergezondheid. Roquefortine C wordt beschouwd als een indicator voor de aanwezigheid van en mycotoxineproductie door *P. roqueforti* s.l. in kuilvoeder.

Dit onderzoek is een deelaspect van een doctoraatsonderzoek waarin factoren die een significante invloed uitoefenen op de groei van *P. roqueforti* s.l. en op de eventuele productie van mycotoxinen door deze schimmels in kuilvoeder onderzocht worden. In eerder onderzoek werd o.a. reeds het effect van het toevoegen van melkzuurbacteriën, het effect van verschillende koolstofbronnen en de invloed van azijnzuur bepaald op *P. roqueforti* s.l.. In dit onderzoek wordt de invloed van azijnzuur verder uitgewerkt, alsook het effect van stikstof en meer specifiek de invloed van verschillende hoeveelheden organische en anorganische stikstof op *P. roqueforti* s.l..

Om het effect van stikstof en azijnzuur op de groei van *Penicillium roqueforti* s.l. te bepalen, werden er twee experimenten uitgevoerd. Het eerste experiment omvatte vier media met een verschillende concentratie aan organische en anorganische stikstof. De groei van zowel *P. roqueforti* s.s. als *P. paneum* werd gedurende 15 dagen opgevolgd. Voor het tweede experiment werden er twee media getest met verschillende concentraties aan melkzuur en azijnzuur. Net als bij het stikstof experiment werd ook hier de groei van beide schimmelspecies gedurende 15 dagen opgevolgd. Na een statistische analyse kon besloten worden dat *Penicillium roqueforti* s.l. geremd werd door een laag gehalte aan organische stikstof in het medium, alsook door hogere gehalten aan melkzuur en azijnzuur in het medium. Voor het isolaat *P. paneum* kon er een negatieve correlatie vastgesteld worden tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium die geproduceerd werden in het eerste experiment. Voor het isolaat *P. roqueforti* s.s. daarentegen was deze correlatie niet significant. Beide isolaten vertoonden in het tweede experiment een positieve correlatie tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium.

De kwantitatieve bepaling van roquefortine C is gebaseerd op UHPLC. In dit werk staat de methode-ontwikkeling hiervoor beschreven.

Kernwoorden: kuilvoeder, *Penicillium roqueforti* s.s., *Penicillium paneum*, roquefortine C, UHPLC

Abstract

Silage is one of the main feed components on farms. It allows to preserve corn, grass and other forage crops for a long period of time. This makes that the use of silage has increased significantly over the last decades in NW Europe. The preservation of silage is based on an anaerobic fermentation process, mainly by lactic acid bacteria. If the silage is not stored well, spoilage organisms get the opportunity to develop. In this way, the climate in Belgium is very favorable for the fungi *Penicillium roqueforti* s.l., more exactly *P. roqueforti* s.s. and *P. paneum*, that are very well adapted to the growth in an acidic environment with low oxygen content. The mycotoxin roquefortine C, which is produced by both *P. roqueforti* s.s. as *P. paneum*, can have many adverse effects on animal health. Roquefortine C serves as an indicator for the presence of and mycotoxine production by *P. roqueforti* s.l. in silage.

This research was performed in the context of a PhD research to determinate factors that have a significant influence on the growth of *P. roqueforti* s.l. and to the possible production of mycotoxins by these fungi. In previous studies, the effect of addition of lactic acid bacteria, various carbon sources and acetic acid on *P. roqueforti* s.l. was investigated. In this study, the influence of acetic acid is further examined, as well as the effect of nitrogen, more specifically the influence of different amounts of organic and inorganic nitrogen on *P. roqueforti* s.l..

To determine the effect of nitrogen and acetic acid on the growth of *P. roqueforti* s.l., two experiments were performed. The first experiment consisted of four media with different concentrations of organic and inorganic nitrogen. The growth of *P. roqueforti* s.s. and *P. paneum* was monitored for 15 days. In the second experiment, two media with different concentrations of lactic acid and acetic acid were tested. Similar to the nitrogen experiment, the growth of both species was followed up for 15 days. Statistical analysis allowed to conclude that *P. roqueforti* s.l. was inhibited by a low content of organic nitrogen in the medium, as well as by higher amounts of lactic acid and acetic acid in the medium. For the *P. paneum* isolate, a negative correlation was observed between the quantity of spores and the amount of mycelium produced in the first experiment. For the *P. roqueforti* s.s. isolate on the other hand, this correlation was not significant. Both isolates exhibited a positive correlation between the amount of spores and the amount of mycelium in the second experiment.

The quantitative determination of roquefortine C is based on UHPLC. In this thesis, the method development for this purpose is described.

Keywords: silage, *Penicillium roqueforti* s.s., *Penicillium paneum*, roquefortine C, UHPLC

Inhoudsopgave

Woord vooraf	2
Samenvatting	3
Abstract	4
Lijst met figuren	7
Lijst met tabellen	8
Inleiding	9
1. Literatuurstudie	11
1.1 Kuilvoeder en kuiladditieven	11
1.1.1 Kuilvoeder	11
1.1.2 Inkuilproces	12
1.1.3 Microflora in kuilvoeder	17
1.1.4 Kuiladditieven	21
1.2 Toxigene kuilschimmels en hun mycotoxinen	25
1.2.1 <i>Fusarium</i>	28
1.2.2 <i>Penicillium</i>	28
1.2.3 Gezondheidsrisico's	28
1.3 <i>P. roqueforti</i> s.l. in kuilvoerders	30
1.3.1 Classificatie van <i>Penicillium roqueforti</i> s.l.	30
1.3.2 Karakteristieken.....	31
1.3.3 Invloedsfactoren op de groei en ontwikkeling van <i>P. roqueforti</i> s.s. en <i>P. paneum</i>	32
1.3.4 <i>P. roqueforti</i> s.l. en zijn mycotoxinen	34
1.3.5 Roquefortine C	35
2. Materiaal en methoden.....	40
2.1 Oplossingen.....	40
2.1.1 Fysiologisch water	40
2.2 Media.....	40
2.2.1 Czapek Dox Yeast Extract (CDYE) agar	40
2.3 Sporenoplossingen	42
2.4 Proefopzet experiment stikstof	42
2.5 Proefopzet experiment melkzuur en azijnzuur.....	43
2.6 Statistische verwerking resultaten	44
2.7 Kwantitatieve bepaling van roquefortine C	44
3. Resultaten en bespreking	46

3.1 Experiment 1: Stikstof	46
3.1.1 <i>Penicillium roqueforti</i> s.s.	46
3.1.2 <i>Penicillium paneum</i>	51
3.1.3 Besluit	55
3.2 Experiment 2: Azijnzuur	56
3.2.1 <i>Penicillium roqueforti</i> s.s.	56
3.2.2 <i>Penicillium paneum</i>	59
3.2.3 Besluit	61
3.3 Methode-ontwikkeling voor de bepaling van roquefortine C	62
4. Besluit	70
Referentielijst	71

Lijst met figuren

Figuur 1: Verloop van de pH gedurende het inkuilproces en de ontwikkeling van micro-organismen (Verbeke, 2012).	12
Figuur 2: Risicofactoren voor mycotoxinevorming in de diervoederproductieketen (Veldman et al., 2003).	26
Figuur 3: Conidioforen en conidia van <i>P. roqueforti</i> (Frisvad & Samson, 2004).	31
Figuur 4: De structuurformule van roquefortine C (O'Brien et al., 2006).	36
Figuur 5: De pathway voor de productie van roquefortine C (Ali et al., 2013).	36
Figuur 6: Staalname van het medium.	43
Figuur 7: De massa van de sporen van <i>P. roqueforti</i> s.s. MUCL 46746 op verschillende media.	46
Figuur 8: De groei van het mycelium van <i>P. roqueforti</i> s.s. MUCL 46746 op verschillende media.	47
Figuur 9: De groei van de biomassa van <i>P. roqueforti</i> s.s. MUCL 46746 op verschillende media.	49
Figuur 10: De massa van de sporen van <i>P. paneum</i> CBS 112295 op verschillende media.	51
Figuur 11: De groei van het mycelium van <i>P. paneum</i> CBS 112295 op verschillende media.	52
Figuur 12: De groei van de biomassa van <i>P. paneum</i> CBS 112295 op verschillende media.	54
Figuur 13: Absorptiespectrum ROQ C (x-as: golflengte (nm); y-as: absorbantie (Au), met 1 Au = 1 absorbantie unit).	63
Figuur 14: Gradiëntselectie – methode Tropitzsch.	64
Figuur 15: Gradiëntselectie – geoptimaliseerde methode.	64
Figuur 16: Chromatogram mobiele fase.	65
Figuur 17: Chromatogram (injectievolume: 10 µL; concentratie: 500 ppb).	66
Figuur 18: Chromatogram (injectievolume: 10 µL; concentratie: 500 ppm).	66
Figuur 19: Chromatogram (injectievolume: 10 µL; concentratie: 100 ppm).	67
Figuur 20: Lineariteitsrechte.	68

Lijst met tabellen

Tabel 1: Basissamenstelling van CDYE agar per liter (medium A).....	40
Tabel 2: Verschillende combinaties van anorganische en organische stikstof per liter medium.	41
Tabel 3: Verschillende combinaties van melkzuur en azijnzuur per liter medium.	41
Tabel 4: Parameters in de finale methode voor de kwantificatie van roquefortine C.	45
Tabel 5: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door <i>P. roqueforti</i> s.s. (PR).	46
Tabel 6: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van <i>P. roqueforti</i> s.s. (PR).	48
Tabel 7: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van <i>P. roqueforti</i> s.s. (PR).	49
Tabel 8: Correlatie tussen sporen en mycelium van <i>P. roqueforti</i> s.s.	50
Tabel 9: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door <i>P. paneum</i> (PP).	51
Tabel 10: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van <i>P. paneum</i> (PP).	53
Tabel 11: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van <i>P. paneum</i> (PP).	54
Tabel 12: Correlatie tussen sporen en mycelium van <i>P. paneum</i>	55
Tabel 13: Resultaten van Experiment 2: Azijnzuur.	56
Tabel 14: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door <i>P. roqueforti</i> s.s. (PR).	57
Tabel 15: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van <i>P. roqueforti</i> s.s. (PR).	57
Tabel 16: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van <i>P. roqueforti</i> s.s. (PR).	58
Tabel 17: Correlatie tussen sporen en mycelium van <i>P. roqueforti</i> s.s.	58
Tabel 18: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door <i>P. paneum</i> (PP).	59
Tabel 19: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van <i>P. paneum</i> (PP).	59
Tabel 20: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van <i>P. paneum</i> (PP).	60
Tabel 21: Correlatie tussen sporen en mycelium van <i>P. paneum</i>	61
Tabel 22: Parameters in de methode voor de kwantificatie van roquefortine C (Tropitzsch, 2009).	62
Tabel 23: Gradiënt voor de geoptimaliseerde methode.	65
Tabel 24: Parameters in de finale methode voor de kwantificatie van roquefortine C.	67
Tabel 25: Precisie.	69
Tabel 26: Accuraatheid.	69

Inleiding

Groenvoeder kan het ganze jaar door bewaard worden door het in te kuilen; dit maakt van kuilvoeder één van de meest belangrijke voederbronnen op melkveebedrijven. Het gebruik van maïskuilvoeder is dan ook zeer sterk toegenomen de laatste decennia. Enerzijds door de mogelijkheid om voor vroegrijpe rassen te kiezen in gematigde klimaten en anderzijds omdat maïskuilvoeder zowel voor melkvee als voor vleesvee gebruikt kan worden. Maïskuilvoeder wordt gemaakt door de gehele maïsplant te hakselen en luchtdicht af te dekken. Naast maïs kunnen ook nog vele andere groenvoedergewassen ingekuild worden, zoals gras, luzerne, etcetera. De bewaring ervan is gebaseerd op een anaeroob proces met de groei van melkzuurbacteriën welke de natuurlijke fermentatie bevorderen. Dit leidt tot een pH-daling tot een niveau waarbij de groei en de ontwikkeling van ongewenste micro-organismen, zoals *Clostridium* bacteriën, schimmels en gisten onderdrukt worden. Indien het kuilvoeder niet goed bewaard wordt en blootgesteld wordt aan factoren zoals condensatie, opwarming, intrede van vocht door bijvoorbeeld regenwater, schade door vogels of knaagdieren en dergelijke, kan dit leiden tot de ongewenste groei van mycotoxigene schimmels, een reductie van de voederwaarde en zelfs mycotoxine productie. De combinatie van lage zuurstofconcentraties, hoge CO₂-concentraties en een lage pH maakt van kuilvoeder een vijandige omgeving voor bederfororganismen, maar de schimmel *Penicillium roqueforti* s.l. (*sensu lato*) kan zich zeer goed ontwikkelen onder deze omstandigheden. *Penicillium roqueforti* s.l. in kuilvoeder omvat de species *P. roqueforti* s.s. (*sensu stricto*) en *P. paneum*. Deze schimmelspecies worden dan ook zeer frequent aangetroffen in kuilvoerders in Noord-West Europa. De door *P. roqueforti* s.l. geproduceerde mycotoxinen, waaronder roquefortine C (ROC), kunnen zeer nadelig zijn voor de diergezondheid en kunnen een mogelijk risico vormen voor de mens door de contaminatie van melk en vlees. ROC heeft ook een antimicrobieel effect waardoor de pensflora bij rundvee verstoord kan worden, en het inademen van schimmelsporen kan luchtweginfecties veroorzaken.

In het kader van deze thesis wordt er onderzoek gedaan naar factoren die een significante invloed kunnen uitoefenen op de groei van deze schimmels en de eventuele productie van mycotoxinen. In eerder onderzoek werd er reeds nagegaan wat het effect is van verschillende temperatuursregimes en het toevoegen van melkzuurbacteriën op de groei van *Penicillium roqueforti* s.l. Ook de groei op verschillende koolstofbronnen en de invloed van azijnzuur op deze schimmels werden reeds onderzocht.

Door middel van twee experimenten wordt er in dit eindwerk onderzocht wat het effect is van stikstof en azijnzuur op *Penicillium roqueforti* s.l. In het eerste experiment wordt nagegaan in welke mate de schimmelgroei beïnvloed wordt door verschillen in het stikstofgehalte van het medium en metname qua anorganische en organische stikstof.

In het tweede experiment wordt er nagegaan hoe de schimmelgroei beïnvloed wordt door het gehalte aan melkzuur en azijnzuur in het medium.

Het doel was om bij beide experimenten na te gaan of eventueel geproduceerd roquefortine C zich in de sporen of in het mycelium bevindt, of dat het wordt afgescheiden in het medium. Effectieve ROC-kwantificeringen in deze stalen konden echter niet uitgevoerd worden.

Om tot een uiteindelijke kwantitatieve bepaling te komen van roquefortine C in kuilvoerders, dient eerst een methode ontwikkeld te worden m.b.v. UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). In deze thesis wordt beschreven hoe de methodeontwikkeling opgestart werd, alsook de verschillende stappen om de methode te optimaliseren om uiteindelijk tot een methode te komen die praktisch toegepast kan worden op de stalen bekomen in de twee uitgevoerde experimenten.

1. Literatuurstudie

1.1 Kuilvoeder en kuiladditieven

1.1.1 Kuilvoeder

Voedergewassen worden bij voorkeur geoogst wanneer de opbrengst en nutritionele waarde maximaal zijn. Om de hoogst mogelijke proportie van de originele voederwaarde te behouden, dient het voeder goed bewaard te worden. Dit wordt meestal gedaan door het voeder in te kuilen. Door het inkuilen van voedergewassen wordt er voorzien in het rantsoen van vee wanneer vers voeder niet aanwezig is. Ook wanneer er een overaanbod aan vers voeder is gedurende het groeiseizoen en wanneer het voeder niet kan worden afgegraasd, is inkuilen de efficiëntste manier om het voeder, met minimaal nutriëntenverlies, te behouden (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Het is mogelijk om bijna alle gewassen in te kuilen, inclusief de bijproducten ervan. De meest belangrijke gewassen wereldwijd om in te kuilen zijn maïs (gehele plant), luzerne en verschillende grassen. Ook andere gewassen zoals de gehele tarweplant en sorghum kunnen worden ingekuild. Inkuilen is een complex proces en wordt dus enkel toegepast in landen waar intensieve landbouwsystemen de basis vormen voor de productie van melk en vlees (Weinberg & Ashbell, 2003). Zo wordt er in Frankrijk maïskuilvoeder door 80% van de melkkoeien geconsumeerd doorheen het hele jaar. In Denemarken steeg het gebruik van maïskuilvoeder met meer dan 70% tussen 1990 en 2008. Wereldwijd maakt ingekuilde maïs 50 tot 75 % uit van het rantsoen van melkvee (Dunière et al., 2013; Rasmussen et al., 2010). Volgens Driehuis & Oude Elferink (2000) maakt ingekuild veevoeder 90% uit van het voeder dat gedurende lange tijd bewaard kan worden. Kuilvoerders vormen het hoofdbestanddeel in het voederrantsoen van vee in NW-Europa. Het voeder voorziet in voldoende vezels en structuur, wat noodzakelijk is voor een goede verteerbaarheid ervan. Gras- en maïskuilvoerders vertegenwoordigen gemiddeld 67% van de totale droge stof inname van melkkoeien in de herfst en winter in Nederland (Driehuis, 2013). In Duitsland werd in 2000 76,2 miljoen ton kuilvoeder geproduceerd in vergelijking tot slechts 2,3 ton hooi. Hiervan is maïskuilvoeder de belangrijkste met 58%, gevolgd door graskuilvoeder met 32% en gehele plant silage van graangewassen met 2% (Auerbach, 2006).

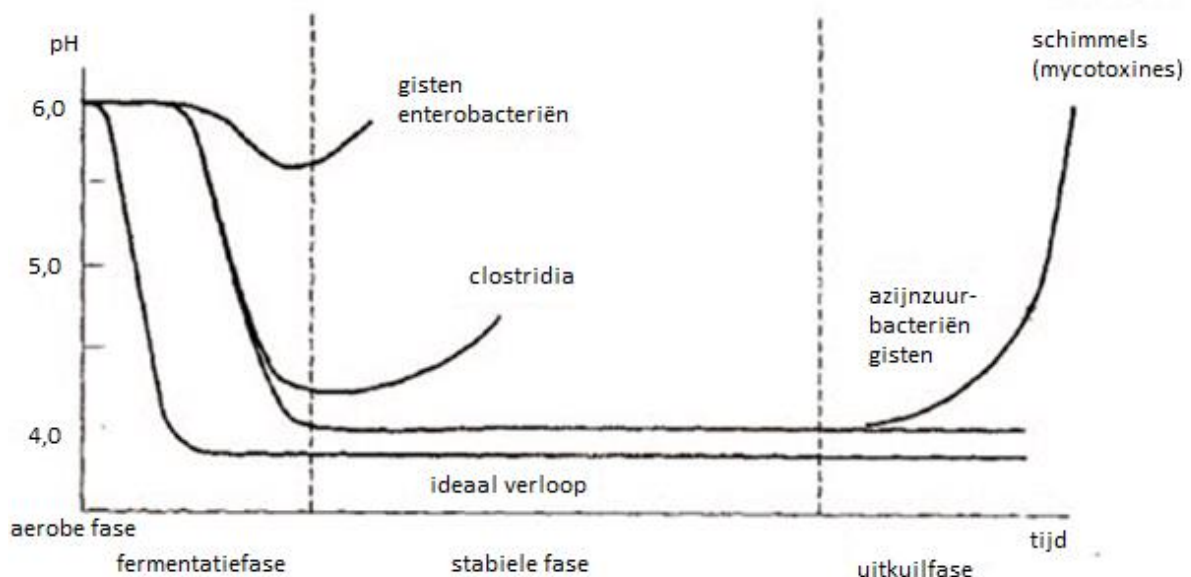
Het inkuilproces omvat een aantal stappen die geregeld, beheerd en zorgvuldig gecontroleerd moeten worden om succesvol in te kuilen, met minimale verliezen (Weinberg & Ashbell, 2003). Een gebrek aan management gedurende het inkuilen van groenvoedergewassen kan leiden tot ongewenste groei van aerobe, zuurtolerante schimmels. Schimmelgroei in kuilvoerders leidt dan weer tot het verlies van voedzame bestanddelen en kan ook resulteren in contaminatie met mycotoxinen, wat zeer nadelig kan zijn voor zowel mens als dier. Pre- en postharvest contaminatie van zowel voedings- als voedergewassen door mycotoxigeneschimmels is een algemeen probleem dat zich over de hele wereld voordoet (González-Pereyra et al., 2008). Om het kuilvoeder lang te kunnen bewaren is het noodzakelijk om het goed samen te drukken en luchtdicht af te dekken zodat er zo weinig mogelijk zuurstof in de kuil achterblijft. Ook het creëren van een zure omgeving

is nodig om verdere microbiële groei te voorkomen. Dit gebeurt door de spontane productie van organische zuren door melkzuurbacteriën. Stresssituaties bij de plant dienen geminimaliseerd te worden en het plant- en oogsttijdstip moet optimaal zijn. Het uitsluiten van lucht optimaliseert de fermentatie en de bewaring van het voeder. Ook een glad snijvlak en 15 tot 30 cm verwijderen per dag is aangewezen om geen aeroob bederf van het kuilvoeder te bekomen. De kuilafmetingen moeten dus aangepast zijn aan de voederbehoefte. Het voeder moet ook direct vervoederd worden na uitkuilen en beschimmeld voeder moet onmiddellijk weggegooid worden (Berge, 2011). Van een kleine hoeveelheid schimmelaantasting in het kuilvoeder zal noch de boer, noch de koe wakker liggen, maar indien er grote partijen schimmels vervoederd worden, dan zijn het altijd de hoogproductieve dieren die er als eerste aan ten onder gaan (Fink-Gremmels, 2003).

1.1.2 Inkuilproces

Het bewaren van kuilvoeder hangt in de eerste plaats af van de samenstelling van het voeder bij het inkuilen. De belangrijkste factoren hierbij zijn het gehalte aan droge stof, oplosbare suikers, de buffercapaciteit en de aantallen en soorten melkzuurbacteriën (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

Het inkuilproces bestaat uit 4 fasen: de aerobe fase, de fermentatie fase, de stabiele fase en de uitkuilfase. Figuur 1 geeft het verloop van de pH weer gedurende het inkuilproces van maïs, alsook de ontwikkeling van micro-organismen in de verschillende fasen van het inkuilproces.



Figuur 1: Verloop van de pH gedurende het inkuilproces en de ontwikkeling van micro-organismen (Verbeke, 2012).

De eerste fase is de aerobe fase. Het zuurstofgehalte in het kuilvoeder daalt door de respiratie van het plantenmateriaal en de aanwezige (facultatief) aerobe micro-organismen. Het snel verwijderen van lucht is belangrijk omdat het de groei van ongewenste bacteriën,

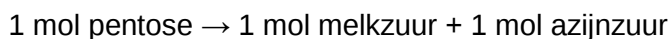
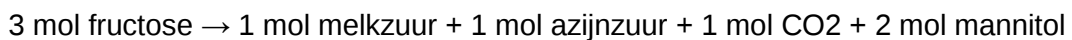
gisten en schimmels voorkomt (Kung, 2001). Deze verbruiken namelijk de aanwezige suikers, zoals glucose en fructose, waardoor er minder suikers beschikbaar zijn voor de melkzuurbacteriën. Volgens Weinberg & Ashbell (2003) varieert de initiële pH bij inkuilen van 6,0 tot 6,5.

De tweede fase is de fermentatie- of verzuringsfase waarbij er volledige anaërobie heerst en er voor een maïskuil een pH tussen 3,6 en 4,5 bereikt wordt. Aangezien gras binnen een bredere range van DS (20-70%) ingekuild kan worden, zal een graskuil een hogere pH hebben bij een hoger droge stofgehalte. De pH-daling komt tot stand door productie van organische zuren, voornamelijk melkzuur (Kung, 2001). Gebaseerd op het suikermetabolisme worden melkzuurbacteriën geklasseerd als homofermentatieve en heterofermentatieve species (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Homofermentatieve melkzuurbacteriën kunnen zeer efficiënt melkzuur produceren uit water en oplosbare koolhydraten. Heterofermentatieve melkzuurbacteriën produceren naast melkzuur ook nog azijnzuur, ethanol, waterstof en koolstofdioxide (Dunière et al., 2013):

Homofermentatief:



Heterofermentatief:



Azijnzuur zorgt voor een verdere onderdrukking van de ongewenste micro-organismen door inhibitie van gisten en schimmels. Een goed kuilvoeder zal stabiel blijven en dus niet veranderen in samenstelling en temperatuur van zodra lucht uit de kuil verwijderd is en een stabiele pH bereikt is (Kung, 2001). Een snelle verzuring van de kuil is noodzakelijk omdat dit de groei en ontwikkeling van de aerobe micro-organismen onderdrukt. Een snelle pH-daling is afhankelijk van de samenstelling van het plantenmateriaal en de buffercapaciteit van het kuilvoeder (Weinberg & Ashbell, 2003).

De derde fase is de stabiele fase of bewaarfase. Deze fase duurt gewoonlijk enkele weken of maanden, tot zelfs een volledig jaar of langer. Zolang de pH laag en de anaërobe omgeving intact blijft, gebeurt er zeer weinig in deze fase. Het actief microbiële leven is ook grotendeels stilgevallen. Sommige zuurtolerante micro-organismen overleven deze periode (zuurtolerante gistsoorten) en andere overleven als sporen (*Clostridia*, *Bacilli*).

Gedurende het inkuilproces wordt er een deel van het voedereiwit afgebroken tot peptiden, aminozuren en ammoniak door enzymen van plantaardige en bacteriële origine. Deze eiwitafbraak reduceert de voederwaarde van het kuilvoeder (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

De vierde en laatste fase is de uitkuilfase. Door het uitkuilen komt er opnieuw zuurstof in de kuil, afhankelijk van de densiteit en porositeit van het plantenmateriaal, de drukgradiënt in de kuil en de uitkuilsnelheid. Zuurstof zorgt uiteindelijk weer voor de groei van ongewenste micro-organismen, zoals gisten en schimmels. (Dunière, 2013). Het bederfproces wordt geïnitieerd door zuurtolerante gisten en in maïskuilvoerders ook door azijnzuurbacteriën. Deze micro-organismen oxideren de aanwezige zuren in het kuilvoeder, waardoor de pH stijgt en andere micro-organismen zich beginnen te ontwikkelen (Driehuis & Oude Elferink, 2000). In deze fase is het risico op broei (warmteproductie door verhoogd zuurstofgehalte in het kuilvoeder) dan ook reëel waardoor de aerobe stabiliteit zal dalen. De aerobe stabiliteit is een maat voor de snelheid waarmee uitgekuild voeder opwarmt bij de blootstelling aan lucht; het wordt uitgedrukt als het aantal uren vooraleer de temperatuur van het uitgekuilde materiaal 3°C boven de omgevingstemperatuur stijgt bij blootstelling aan lucht.

Invloedsfactoren

Om het fermentatieproces tijdens het inkuilen onder controle te houden, zijn de geschiktheid van het gewas om in te kuilen (het bevatten van fermenteerbare koolhydraten en de buffercapaciteit van de biomassa), het gepaste droge stofpercentage, de anaerobe omgeving, het gebruik van kuiladditieven en de aan- of afwezigheid van mycotoxinen de belangrijkste aspecten (Dinić et al., 2010).

- Zuurstof

De blootstelling van kuilvoeder aan zuurstof is onvermijdelijk nadat de kuil geopend is. Gedurende de bewaring zelf kan er zuurstof, door middel van diffusie of beschadiging van de afdekkende lagen, tot bij het voeder geraken. Zuurstof bevordert de groei van aerobe micro-organismen wat uiteindelijk leidt tot bederf van het voeder. Door de oxidatie van de fermentatieproducten die aanwezig zijn in het kuilvoeder, zal de temperatuur en de pH stijgen en andere micro-organismen zullen zich beginnen te ontwikkelen. Aeroob bederf veroorzaakt niet alleen nutritionele verliezen, maar heeft ook een effect op de hygiënische kwaliteit van het voeder en een verhoogd risico op ziekteverwekkende en ongewenste micro-organismen (Driehuis et al., 1999). Het is dus heel belangrijk om het materiaal goed aan te drukken om zo weinig mogelijk lucht in de kuil te hebben. De aandrukbaarheid is afhankelijk van de haksellengte en het droge stofpercentage van het materiaal. Een kleine haksellengte in combinatie met een hoog vochtgehalte van de plant en het aandrukken ervan, leidt echter tot grote verliezen in de vorm van sap (effluent). Hierdoor worden de hoogwaardige nutriënten van het kuilvoeder uitgespoeld. Een grote haksellengte en een hoog droge stofgehalte daarentegen zijn ook niet wenselijk daar het materiaal in dit geval niet goed aangedrukt kan worden en er meer zuurstof kan achterblijven. Er worden, naast fermentatieproducten van melkzuurbacteriën, ook nog boterzuur, ammoniak en andere ongewenste producten geproduceerd door ongewenste micro-organismen (Dinić et al., 2010).

- Wateroplosbare koolhydraten

Volgens Kung (2001) daalt het aantal wateroplosbare koolhydraten zeer snel wanneer het voeder niet onmiddellijk luchtdicht afgedicht wordt na het hakselen en aandrukken. Kwaliteitsvol kuilvoeder wordt gekarakteriseerd door een hoog gehalte aan koolhydraten en een laag gehalte aan eiwitten, behalve eiwitrijke gewassen zelf die ingekuild worden. Dankzij de hoge koolhydratenreserve wordt er voldoende melkzuur geproduceerd gedurende de eerste paar dagen van het inkuilproces. Van zodra de pH in maïskuilvoeder gedaald is naar een waarde rond 4, stopt de fermentatie door melkzuurbacteriën. Wanneer er een tekort van koolhydraten is in de kuil, wordt er weinig melkzuur geproduceerd. Deze hoeveelheid melkzuur is echter onvoldoende om de pH voldoende te laten dalen om de boterzuurfermentatie (productie van boterzuur door *Clostridia* bacteriën) te stoppen. Het geproduceerde melkzuur en de koolhydraten worden hierbij omgezet naar boterzuur waardoor de pH van het kuilvoeder stijgt en bederf optreedt. Dit kan voorkomen worden door gras voor te drogen, aangezien boterzuurbacteriën een vochtig milieu vereisen voor groei. De mate van pH-daling tijdens de fermentatie door melkzuurbacteriën hangt grotendeels af van het gehalte aan koolhydraten in de groene massa. Het koolhydratengehalte verschilt van plant tot plant. Zo bevat maïs veel koolhydraten en weinig eiwit, in tegenstelling tot luzerne dat weinig koolhydraten en veel eiwit bevat (Dinić et al., 2010).

- Buffercapaciteit

De mogelijke graad van verzuring hangt af van de samenstelling van het voeder en de weerstand dat het geeft tegen pH-verandering; dit wordt de buffercapaciteit genoemd en wordt vooral bepaald door het eiwitgehalte. Het wordt gedefinieerd als de hoeveelheid melkzuur die nodig is om de pH van de kuilmassa met 1 unit te doen dalen en wordt gemeten in meqv melkzuur per 100g droge stof (Dinić et al., 2010). De buffercapaciteit van de kuilmassa kan een effect hebben op de kuilfermentatie. Luzerne heeft een hoge buffercapaciteit in vergelijking met maïs. Er is dus meer zuurproductie nodig om de pH te verlagen in luzerne dan in maïskuilvoeder (Kung, 2001). De inbreng van grond in kuilvoeder verhoogt de buffercapaciteit. Als de buffercapaciteit hoog is zullen de aerobe micro-organismen, aanwezig in het begin van het inkuilproces, langer actief blijven en de aanwezige suikers die nodig zijn voor de verdere melkzuurfermentatie, verbruiken. Kuilverzuring wordt zo uitgesteld en er treedt secundaire fermentatie op door *Clostridia*, waarbij melkzuur omgezet wordt in boterzuur, gevolgd door een pH-verhoging en verder bederf (Dunière, 2013).

- Droge stofgehalte

Het gehalte aan droge stof is één van de belangrijkste invloedsfactoren op het inkuilproces. Voeders met een hoog droge stofgehalte kunnen niet goed aangedrukt worden waardoor het moeilijk wordt om zoveel mogelijk de lucht uit de kuil te krijgen. Hierdoor wordt de groei van melkzuurbacteriën geremd, neemt de omvang van de fermentatie af en krijgen andere micro-organismen de kans om zich te ontwikkelen (Dinić et al., 2010; Kung, 2001). Door Williams

(1994) is het aangetoond dat de permeabiliteit van een kuil lineair gecorreleerd is met zowel de dichtheid als het droge stofgehalte van het voeder. Het is bijgevolg aangewezen om de gewassen tussen 30 en 40% droge stof te oogsten, ook om de productie van effluent te voorkomen (Dunière et al., 2013). Effluent gaat gepaard met verliezen van nutriënten en is ook nadelig voor het milieu (Weinberg & Ashbell, 2003). Het drogestofgehalte is ook van belang voor de voederwaarde van het kuilvoeder. Een onderzoek van Vackier (2002) heeft namelijk uitgewezen dat de eiwitwaarde (DVE en OEB) alsook de energiewaarde (VEM, FOS en suiker) sterk beïnvloed worden door het gehalte droge stof. Zo stelde hij een positief verband vast tussen het droge stofgehalte en de VEM-, FOS-, suiker- en DVE- waarde, en een negatief verband tussen het droge stofgehalte en de OEB-waarde.

- Aard en hoeveelheid bacteriën

De aard en de hoeveelheid van bacteriën op de plant op het moment van inkuilen hebben ook een effect op de kuilfermentatie (Kung, 2001). Om bederf in kuilvoerders zo veel mogelijk te voorkomen, moeten pathogenen belet worden om de kuil binnen te kunnen dringen. Hiervoor moet schimmelaantasting in het veld tot een minimum herleid worden en dient er minstens 4 weken gewacht te worden tussen het bemesten van het grasland met dierlijke mest en het oogsten ervan om het gehalte aan boterzuurbacteriën in het kuilvoeder te limiteren. Dit verhindert ook de aanwezigheid van andere pathogenen zoals *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* en *E. coli*. Ook contaminatie met grond dient vermeden te worden. De groeiomstandigheden en de keuze van het oogsttijdstip hebben ook een belangrijke invloed. De beste manier om het mycotoxine gehalte in het kuilvoeder te verminderen is om eerst en vooral de aanwezigheid van mycotoxigene schimmels in het veld te voorkomen (Dunière et al., 2013).

- Haksellengte

De optimale haksellengte voor grassen varieert tussen 4 en 6 cm. Voor maïskuilvoeder voor melkkoeien is het aanbevolen dat het minder dan 1% grote partikels (>2cm) bevat, tussen de 8 en 12 % intermediaire partikels van 1 tot 2 cm en minder dan 50% zeer kleine partikels (<6mm) (Dunière et al., 2013). De haksellengte heeft ook vooral een invloed op het verteringsproces: fijngehakseld voedsel zal het verteringsproces helpen om nutriënten efficiënter te absorberen. Grof gehakseld voeder bevat meer vezels en vermindert de voederopname bij vee, en dit vooral bij jongvee (Mohd-Setapar et al., 2012). Een grotere haksellengte heeft daarentegen wel een positieve invloed op de structuurwaarde van het rantsoen (De Brabander, 2014).

- Fermentatieperiode

De fermentatieperiode heeft een significante invloed op de kwaliteit van het kuilvoeder en kan als een cruciale parameter beschouwd worden. Een optimale kwaliteit wordt pas bereikt nadat het fermentatieproces volledig afgelopen is. De tijd die nodig is om volledige fermentatie te bereiken, hangt af van het type voeder. Normaal wordt zestig dagen als voldoende beschouwd maar het aantal dagen moet ook overwogen worden om tijd en kosten

te reduceren en de nutriënteninhoud in het kuilvoeder te optimaliseren (Mohd-Setapar et al., 2012).

1.1.3 Microflora in kuilvoeder

De microflora speelt een belangrijke rol in het bewaringsproces van kuilvoerders. Algemeen kunnen micro-organismen opgedeeld worden in twee groepen: de gewenste en de ongewenste micro-organismen. Melkzuurbacteriën zijn gewenste micro-organismen in kuilvoerders. De ongewenste micro-organismen kunnen verder opgedeeld worden in micro-organismen die betrokken zijn in anaeroob bederf (onder andere *Clostridia* en *Enterobacteriën*) en micro-organismen die betrokken zijn in aeroob bederf (onder andere gisten, schimmels, *Bacilli* en *Listeria*) (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor bederf van het kuilvoeder veroorzaken hoofdzakelijk economische verliezen (Dunière et al., 2013). De meeste bederforganismen veroorzaken niet alleen een daling in de voederwaarde van het kuilvoeder maar hebben ook een nadelig effect op de diergezondheid en de melkqualiteit. Omdat er nog steeds niets kan gedaan worden om gecontamineerd voeder te decontamineren van mycotoxinen, moet het dus gewoon weggegooid worden. Ook dit brengt gezondheidsrisico's voor mens en dier met zich mee (Dunière et al., 2013).

De kwaliteit van het kuilvoeder hangt af van de competitie tussen de verschillende groepen micro-organismen. Meestal domineren melkzuurbacteriën de kuil-microflora. Toch kunnen er een aantal ongewenste micro-organismen, die verschijnen bij lage pH en lage zuurstofconcentratie, beginnen groeien tijdens de bewaring van het kuilvoeder en zo leiden tot bederf. Gisten zijn algemeen verantwoordelijk voor de start van aeroob bederf door het oxideren van de aanwezige zuren in het kuilvoeder. Naargelang dit proces doorgaat, zal de pH stijgen, wat andere aerobe organismen de kans geeft om te groeien (te Giffel et al., 2002). Uit een studie van Storm et al. (2010) bleek dat een lange opslagperiode van maïskuilvoeder geassocieerd is met significante veranderingen in de microflora van de kuil. Zo is het risico op bederf door schimmels het grootst na 5 tot 7 maanden na inkuilen, terwijl het risico het laagst is na 11 maanden na inkuilen.

Kuilvoeder is een belangrijke bron van contaminatie van rauwe melk met sporen. Sporen in de melk kunnen voedselprocessen overleven en op deze manier voedsel contamineren. Sporenvormende bacteriën in kuilvoerders behoren tot de geslachten *Clostridium* en *Bacillus*. Deze sporen passeren het darmkanaal van de koe en worden samen met de feces uitgescheiden en kunnen zo in de melk belanden door fecale contaminatie van de uier. Om bederf van melk en andere zuivelproducten door sporenvormende bacteriën te voorkomen, is het belangrijk om te verzekeren dat contaminatie naar de melk minimaal is (te Giffel et al., 2002).

1.1.3.1 Melkzuurbacteriën

Melkzuurbacteriën behoren tot de epifytische microflora van plantenmateriaal met als belangrijkste geslachten *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* en *Enterococcus* in kuilvoeder. Melkzuurbacteriën groeien het best bij een mesofiele temperatuur van 30°C en zijn zuurtolerant, waardoor ze in staat zijn om de kuil-pH te verlagen tot 4 of 5, afhankelijk van het species en het type gewas. Alle melkzuurbacteriën zijn facultatief anaeroob, maar sommige hebben een voorkeur voor een anaerobe omgeving (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Het microbiële ecosysteem van kuilvoeder wordt gedomineerd door melkzuurbacteriën met de homofermentatieve *Lactobacillus plantarum* als de meest frequente soort, maar ook heterofermentatieve species zoals *Lactobacillus buchneri* en *Lactobacillus brevis*. Storm et al. (2010) toonden aan dat het aantal melkzuurbacteriën daalt gedurende het hele inkuilproces.

1.1.3.2 Enterobacteriën

Verschillende species van de facultatief anaerobe enterobacteriën behoren tot de epifytische microflora van de meeste voedergewassen. *Erwinia herbicola* en *Rahnella aquitilis* domineren meestal de verse planten, maar na inkuilen worden deze species snel vervangen door andere soorten, waarbij *E. coli* de belangrijkste is. Gedurende de eerste fasen van het fermentatieproces concurreren enterobacteriën met melkzuurbacteriën voor dezelfde nutriënten. Ze hebben een zwakke proteolytische activiteit en ze zijn in staat om sommige aminozuren te desamineren en te decarboxyleren. Deze activiteiten leiden tot de vorming van ammoniak en biogene amines; dit zijn toxische componenten die een negatief effect hebben op de kuilsmakelijkheid en opname door herkauwers en uiteindelijk zullen de bacteriën in het rumen van de herkauwers deze amines afbreken (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

1.1.3.3 Clostridia

Bacteriën van het geslacht *Clostridium* zijn endosporenvormende obligaat anaerobe bacteriën die zowel koolhydraten als eiwitten fermenteren. *Clostridium* species die geassocieerd worden met kuilvoerders zijn *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* en *C. bifermentans*. Eiwitafbraak en afbraak van aminozuren door boterzuurbacteriën doen het niveau aan biogene amines stijgen. *C. tyrobutyricum* is een zuurtolerant species dat het meest bestudeerd is in kuilvoerders. Sporen van clostridia in kuilvoeder kunnen overgebracht worden naar de melk via fecale contaminatie van de uier. Kuilvoeder gecontamineerd met *Clostridium* wordt gekarakteriseerd door een hoge pH en hoge gehalten aan boterzuur, ammoniak en biogene amines. Een snelle en voldoende daling van de pH verlaagt dus de kans op de groei van *Clostridium* (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

1.1.3.4 Gisten

Gisten zijn facultatief aerobe eukaryote micro-organismen. Species die typisch geassocieerd worden met kuilvoeder zijn zuurtolerante species die behoren tot de genera *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces* en *Torulopsis* (Driehuis & Oude Elferink, 2000). In kuilvoerders is zowel anaerobe als aerobe activiteit van gisten ongewenst. Onder anaerobe

omstandigheden fermenteren gisten suikers tot ethanol en CO₂. Ethanolproductie in kuilvoeder laat niet alleen het gehalte aan suikers, nodig voor de zuurproductie in het voeder, dalen, maar laat ook de droge stofverliezen toenemen gedurende het inkuilproces en heeft een negatief effect op de smaak van de melk (Dunière et al., 2013). Onder aerobe omstandigheden oxideren gisten melkzuur, wat een verhoging van de kuil pH teweeg brengt en de groei en ontwikkeling van vele andere bederforganismen tot gevolg heeft. Gisten zijn gekend als de meest belangrijke groep van micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de initiatie van aerobe bederfprocessen in kuilvoerders. De overlevingskansen van gisten gedurende het bewaren van het voeder hangen hoofdzakelijk af van de mate van anaerobie, de pH en de concentratie aan organische zuren (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

1.1.3.5 Azijnzuurbacteriën

Azijnzuurbacteriën zijn obligaat aerobe, zuurtolerante bacteriën. Species geassocieerd met kuilvoerders behoren tot het geslacht *Acetobacter*. Driehuis & Oude Elferink (2000) stelden vast dat azijnzuurbacteriën, net zoals gisten, aeroob bederf van maïskuilvoeder kunnen veroorzaken, maar meestal spelen deze bacteriën een kleinere rol.

1.1.3.6 Schimmels

Schimmels zijn eukaryote aerobe micro-organismen. De groei van schimmels in kuilvoerders is meestal beperkt tot de oppervlaktelagen en duidt vaak een slechte afdichting van de kuil aan. Schimmels ontwikkelen zich gedurende de vergevorderde fasen van aeroob bederf van het kuilvoeder (Driehuis & Oude Elferink, 2000). De meest frequent voorkomende toxigene schimmelspecies in kuilvoeder in NW-Europa zijn *Penicillium roqueforti* s.s., *Penicillium paneum* en *Aspergillus fumigatus*.

Vooraf *P. roqueforti* s.l., die zuurtolerant is en in staat is om te groeien onder zuurstofarme condities, is gedetecteerd als het overheersende species in verschillende types van kuilvoerders. Behalve schimmelgroei gedurende het inkuilproces, vormen voedergewassen in het veld ook een risico voor infectie door een aantal schimmelspecies. Deze veldschimmels zijn verschillend van deze die zich normaalgezien ontwikkelen gedurende de bewaring en behoren tot de geslachten *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* en *Claviceps*.

Schimmels veroorzaken niet alleen een reductie van de voederwaarde en smakelijkheid van het kuilvoeder, maar kunnen ook een negatief effect hebben op diergezondheid door de productie van mycotoxinen (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Volgens Dunière et al. (2013) zijn *Penicillium* (70%), *Fusarium* (47%) en *Aspergillus* (34%) de meest frequente schimmels die mycotoxinen produceren in maïskuilvoerders (Storm et al., 2010).

Een minimale schimmelgroei wordt pas bereikt indien lucht de kuil minimaal kan binnentreden (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

1.1.3.7 Bacilli

Bacilli zijn aerobe of facultatief aerobe bacteriën die endosporen vormen. Species die het meest voorkomen in kuilvoerders zijn *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* en *B. polymyxa*. *Bacilli* in kuilvoeder kunnen een negatieve impact hebben op

de melkkwaliteit. Van belang hierbij zijn de sporen van *Bacillus cereus*, welke de melk kunnen contamineren na passage door het spijsverteringsstelsel van de koe. De groei en ontwikkeling van *Bacilli* gebeurt meestal gedurende de laatste fasen van aerob bederf van kuilvoeder. Hoge aantallen van *Bacillus* sporen zijn vooral gedetecteerd in de oppervlaktelagen van gras- en maïskuilvoeder (te Giffel et al., 2002).

1.1.3.8 Listeria

Bacteriën van het geslacht *Listeria* zijn aerobe of facultatief aerobe bacteriën. De aanwezigheid van *Listeria* species in kuilvoerders wordt geassocieerd met aerobe bederfprocessen. *Listeria* komt vrij frequent voor in kuilvoerders en is afhankelijk van de graad van anaërobie en de pH. Het species *Listeria monocytogenes*, veroorzaker van listeriosis, is van groot belang omwille van zijn pathogeniciteit naar mens en dier (Driehuis, 2013). *L. monocytogenes* die toegevoegd werd aan gras bij inkuilen verdween snel onder strikt anaërobe condities en bij een pH lager dan 4,4. Hogere zuurstofgehalten moedigen de groei van *L. monocytogenes* sterk aan (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

1.1.4 Kuiladditieven

Wanneer de omstandigheden gunstig zijn, kan een goed kuilvoeder bekomen worden. Wanneer de omstandigheden echter minder optimaal zijn, kunnen additieven helpen bij het fermentatieproces (Henderson, 1993). Er zijn twee belangrijke redenen om een kuiladditief te gebruiken en hiermee zowel de aerobe stabiliteit te verbeteren als de fermentatie te bevorderen. Een eerste reden is om verhitting van het kuilvoeder en de daarbijhorende droge stofverliezen te voorkomen. Een andere reden is om een daling van de dierlijke prestaties te voorkomen (Kung et al., 1998). Kwaliteitsverlies leidt immers tot een verminderde opname door de dieren (Latré et al., 1999). Een additief dient ook een economisch voordeel op te leveren dat groter is dan de kost ervan (Nkosi et al., 2009). De kostprijs van het additief mag niet de belangrijkste factor zijn bij de keuze ervan. Het moet efficiënt zijn, maar de meest duurste additieven zijn niet altijd de beste (Kung, 2001). Kwaliteitsvol kuilvoeder kan absoluut verkregen worden zonder additieven. Ondanks dat kuiladditieven geen noodzaak zijn op een landbouwbedrijf, zijn er verschillende commerciële producten beschikbaar die de kuilfermentatie en bederfprocessen onder controle kunnen houden. Inoculanten en enzymen zijn hierbij de meest gebruikte additieven (Ozduven et al., 2010). De chemische additieven (organische en anorganische zuren, alsook hun zoutvorm) worden vandaag vaak vervangen door biologische, ongeacht hun efficiëntie, omwille van negatieve invloeden zowel op het dier als op het milieu (Dinić et al., 2010). Ook de hogere kostprijs ervan zorgt ervoor dat de chemische additieven stilaan zullen verdwijnen. Inoculanten zijn namelijk veel veiliger en gemakkelijker in gebruik, zijn niet corrosief tegenover machines, hebben geen milieuvervuilend effect en worden aanzien als natuurlijke producten (Keles & Yazgan, 2011).

Hieronder worden de voornaamste kuiladditieven besproken, waaronder de suikerbronnen en de suikervrijstellende enzymen, alsook de fermentatiebevorderende als de broeieremmende kuiladditieven (zowel de chemische als de biologische), en producten die een combinatie van voorgaande bevatten.

1.1.4.1 Suikerbronnen en suikervrijstellende enzymen

- Substraten voor de fermentatie door melkzuurbacteriën

Melkzuurbacteriën zetten suikers om tot melkzuur. Indien de suikergehaltes van het gewas te laag zijn, kunnen er suikers toegediend worden als additief onder de vorm van melasse of zetmeelbronnen. Zetmeel en granen hebben een positief effect op de totale nutritionele waarde van het kuilvoeder en zorgen voor een daling van het vochtgehalte en daarmee ook van de sapverliezen (Dinić et al., 2010). Melasse zou geen effect hebben op de aerobe stabiliteit van het kuilvoeder (Huisden et al., 2009) maar dat zou vooral te wijten zijn aan het lagere droge stofgehalte van het gewas (Bruins, 1989). Adesogan et al. (2004) evalueerden de verschillen tussen de behandeling van kuilvoeder met enerzijds een heterofermentatief inoculant en anderzijds met melasse. Het gebruik van inoculanten in plaats van melasse resulteerde in een grotere productie van propionzuur. De behandeling met melasse daarentegen resulteerde in een toename van het aantal wateroplosbare koolhydraten.

- Enzymen

Er zijn additieven die naast microbiële inoculanten ook enzymen bevatten. Zowel cellulasen en hemicellulasen maar ook amylasen en xylanasen kunnen hiervoor aangewend worden (Kung, 2001). Enzymen breken de celwand van planten af zodat oplosbare suikers vrijkomen die voor de melkzuurbacteriën als voedingsbron kunnen dienen. Gedurende de bewaring van het kuilvoeder zetten de melkzuurbacteriën deze suikers om tot melkzuur. In graskuilen verlaagt hierdoor het vezelgehalte van het voeder, in maïskuilen echter niet (Sheperd & Kung, 1996a). Ook uit een onderzoek van Chen et al. (1994) blijkt dat enzym-inoculant kuiladditieven enkel een gunstige invloed hebben op de fermentatie in graskuilen en niet bij maïskuilen. Wanneer er een tekort is aan oplosbare suikers is het aangewezen om enzymadditieven in te zetten om de fermentatie te verbeteren. Hierdoor wordt er een lagere eind-pH van het kuilvoeder en een hoger melkzuurgehalte bereikt (Ozduven et al., 2010; Sheperd & Kung, 1996b). Behandeling van het kuilvoeder met enzymen verhoogt de voederopname en zelfs de melkproductie alsook het melkeiwitgehalte (Chamberlain & Robertson, 1992; Stokes, 1992).

1.1.4.2 Fermentatiebevorderende additieven

- Chemische additieven

Omdat homofermentatieve melkzuurbacteriën als kuiladditief een verhoogde concentratie aan resterende wateroplosbare suikers tot gevolg hebben, kan er een gebufferde oplossing van propionzuur aan toegevoegd worden om de aerobe stabiliteit te verbeteren (Kung et al., 2003). Propionzuurbacteriën, om in het kuilvoeder zelf propionzuur te produceren, worden in de praktijk nauwelijks toegepast. Ze zijn wel in staat om melkzuur en glucose om te zetten tot azijnzuur en propionzuur, die toxisch zijn voor gisten (Kung, 2001). In de praktijk hebben propionzuurbacteriën als inoculant echter geen significant effect op de pH of de concentraties aan wateroplosbare koolhydraten, ethanol, melkzuur en vluchtige vetzuren in het kuilvoeder. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de zure omgeving tijdens het fermentatieproces die niet ideaal is voor de groei van propionzuurbacteriën (Higginbotham et al., 1998).

- Biologische additieven

Fermentatiebevorderende inoculanten bevatten homofermentatieve melkzuurbacteriën omdat deze de meest efficiëntste produceerders zijn van melkzuur. *Lactobacillus plantarum* is het meest gebruikte species, gevolgd door *Pediococcus acidilactici* en *P. pentosaceus* en *Enterococcus faecium* (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Dergelijke inoculanten worden vooral gebruikt om voeder van hoge kwaliteit te produceren bij eiwitrijke gewassen en om te verzekeren dat er een onmiddellijke pH-daling volgt na inkuilen (Danner et al., 2003). Door de stimulatie van de melkzuurfermentatie en de pH-daling kan het voeder ook langer bewaard worden (Ozduven et al., 2010). Homofermentatieve inoculanten resulteren vaak in een snellere daling van de pH van het kuilvoeder en lagere eind-pH, hogere melkzuur/azijnzuur verhoudingen en lagere ethanolgehalten (Filya & Sucu, 2010). Ook een

gereduceerd droge stofverlies gedurende de fermentatie en een verminderde ammoniakconcentratie werden vastgesteld (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

Toevoegen van microbiële inoculanten die *L. plantarum* bevatten verhogen de hoeveelheid melkzuur tov azijnzuur, maar heeft geen significant effect op de beperking van de droge stofverliezen bij uitkuilen (Kleinschmit et al., 2005). Homofermentatieve melkzuurbacteriën zorgen echter voor een verminderde aerobe stabiliteit (Conaghan et al., 2010). Aeroob bederf van kuilvoeder dat behandeld werd met homofermentatieve melkzuurbacterie-inoculanten is te wijten aan het hoge gehalte aan wateroplosbare koolhydraten en melkzuur en een laag gehalte aan vluchtige vetzuren (Weinberg et al., 1993).

1.1.4.3 Broeiremmende kuiladditieven

- Chemische additieven

Belangrijke zuren die als kuiladditief gebruikt kunnen worden zijn korte keten vetzuren zoals mierenzuur, azijnzuur en propionzuur.

Propionzuur heeft het grootste inhiberend effect op de groei van gisten en schimmels, gevolgd door azijnzuur (Moon, 1983). De efficiëntie van propionzuur en zijn zouten is gerelateerd met hun oplosbaarheid in water. Hoe sterker de binding is tussen het zuur en de base, hoe minder oplosbaar het product is en dus minder effectief tegen ongewenste groei (Kung, 2001). Additieven die gebaseerd zijn op mierenzuur zorgen voor een daling in de activiteit van ongewenste micro-organismen; wat resulteerde in een afname van boterzuur en ammoniak. Wanneer de aerobe stabiliteit verbeterd dient te worden, wordt het gebruik van mierenzuur aangeraden als meest efficiënt (Mc Eniry et al., 2007). Op het gehalte aan Clostridia zou mierenzuur geen enkel effect hebben (Jonsson et al., 1990).

Ook natriumbenzoaat en kaliumsorbaat zijn effectief tegen de groei van gisten en schimmels in kuilvoeder en verbeteren de aerobe stabiliteit (Kleinschmit et al., 2005). De combinatie van natriumbenzoaat met natriumbisulfiet had een onvoldoende effect op de verbetering van de aerobe stabiliteit. Een combinatie van natriumbenzoaat, natriumpropionaat en propionzuur verbeterde dan weer wel de kuilkwaliteit (Knicky & Lingvall, 2004).

- Biologische additieven

Om de aerobe stabiliteit te verbeteren zijn heterofermentatieve melkzuurbacteriën veel efficiënter dan de homofermentatieve melkzuurbacteriën (Danner et al., 2003; Driehuis et al., 1999; Muck, 2002). *Lactobacillus buchneri* is hiervan het bekendste voorbeeld: het verhoogt de gehalten aan azijnzuur, propionzuur en antimicrobiële substanties zoals 1-propanol, 1,2-propaandiol, propylacetaat en 2-butanol. Het effect is ook een verlaging van de wateroplosbare koolhydraten (Driehuis & Oude Elferink, 2000; Dunière et al., 2013). Het is aangetoond dat azijnzuur gevormd uit melkzuur door *L. buchneri* uitsluitend verantwoordelijk is voor de toegenomen aerobe stabiliteit van het kuilvoeder (Holzer et al., 2003). *L. buchneri* kan als kuiladditief ingezet worden om het kuilvoeder te stabiliseren wanneer het blootgesteld wordt aan aerobe omstandigheden (Weinberg et al., 2002). Het effect van *L.*

buchneri is wel gewasspecifiek (Kleinschmit & Kung, 2006). Volgens Kristensen (2010) heeft een behandeling met microbiële inoculanten geen significante verandering in de melkproductie tot gevolg.

Uit een onderzoek van Phillip & Fellner (1992) blijkt dat inoculanten op basis van heterofermentatieve melkzuurbacteriën een negatief effect hebben op de verteerbaarheid van vezels en weinig invloed op de dierprestaties, maar volgens Filya et al (2006) hebben deze inoculanten geen significant effect op de pensverteerbaarheid en vezelafbraak. Dit wordt bevestigd door Filya & Sucu (2010), die ook nog stellen dat ze wel voor een verhoogde voederopname, voederefficiëntie en een hogere melkproductie zorgen. Steen et al (1989) stelden zelfs een grotere gewichtstoename vast als gevolg van het gebruik van inoculanten. Volgens Weinberg & Muck (1996) zouden microbiële inoculanten een probiotisch effect hebben in de pens van herkauwers, maar zouden ze niet altijd een verbetering teweegbrengen van de kuilfermentatie of de dierprestaties (Kung et al., 1993). Uit een onderzoek van Gordon (1989) blijkt dat het gebruik van inoculanten de dierprestaties wel kan verbeteren en dat er geen effect was van inoculanten op het gehalte aan vluchtige vetzuren in de pens van herkauwers.

De belangrijkste reden om bacteriële inoculanten te gebruiken is omdat er op het gewas meer enterobacteriën kunnen voorkomen dan melkzuurbacteriën (Dinić et al., 2010). Ook het gehalte aan zearalenone in het kuilvoeder werd drastisch verminderd na een behandeling met microbiële inoculanten (Teller et al., 2012).

1.1.4.4 Combi-producten

Bovendien werden er additieven ontwikkeld die zowel homofermentatieve als heterofermentatieve melkzuurbacteriën bevatten (Adesogan et al., 2004).

Aerobe stabiliteit is belangrijk omdat het kuilvoeder aan lucht blootgesteld wordt; zowel bij de bewaring als bij het uitkuilen. *Lactobacillus buchneri* species resulteren in aeroob stabielere kuilen door de hogere azijnzuurconcentraties, terwijl *L. plantarum* species resulteren in meer onstabiele kuilen wanneer ze aan zuurstof blootgesteld worden (Weinberg et al., 1999).

1.2 Toxigene kuilschimmels en hun mycotoxinen

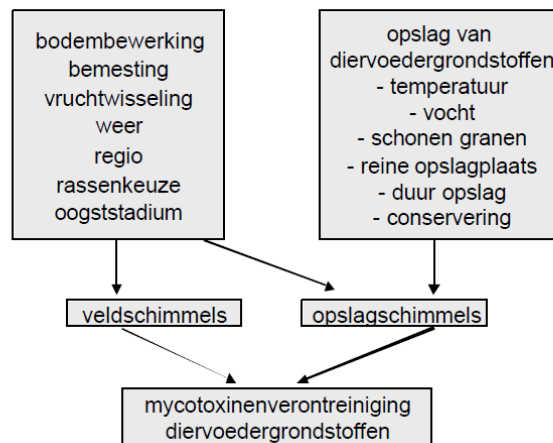
Kuilvoeder kan gecontamineerd worden door schimmels die aangepast zijn aan de omgevingscondities in kuilvoeder tijdens de uitkuilfase, namelijk aerobe en zure omstandigheden. Zo zijn er meer dan 80 schimmelsoorten gedetecteerd in kuilvoerders. De meest gevonden schimmels in kuilvoerders behoren tot het geslacht *Penicillium* omwille van zuurtolerantie en lage zuurstofbehoefte (González Pereyra et al., 2008). Uit een studie van Aleksandrov (1986) blijkt dat de mycoflora in het kuilvoeder zich vooral in de oppervlaktelagen ontwikkelt. Deze microflora bestaat dan vooral uit de genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monascus*, *Scopulariopsis* en *Trichoderma* (El-Shanawany et al., 2005). Sommige schimmels kunnen, afhankelijk van de omgevingscondities, ook mycotoxinen produceren. Mycotoxinen zijn toxische secundaire metabolieten van schimmels die onderling een grote variabiliteit vertonen, onder andere in chemische structuur en moleculair gewicht. Er zijn honderden mycotoxinen gekend, maar slechts enkele zijn uitgebreid bestudeerd (Auerbach, 2006).

Schimmelspecies die mycotoxinen produceren behoren meestal tot de genera *Aspergillus*, *Penicillium* en *Fusarium*. Mycotoxinen kunnen reeds in kleine hoeveelheden schadelijk zijn voor de gezondheid van dier en mens. Eens mycotoxinen gevormd zijn, kunnen ze heel stabiel en lang in het voeder aanwezig blijven, zelfs lang nadat de schimmel reeds afgestorven is (El-Shanawany et al., 2005). Andere mycotoxinen zijn dan weer onstabiel of binden zich met suiker- of eiwitmoleculen.

Schimmels zijn grosso modo onder te verdelen in twee categorieën, maar deze indeling is niet absoluut. Ten eerste zijn er de veldschimmels zoals *Fusarium* en *Claviceps* die groeien op de gewassen in het veld en daar mycotoxinen kunnen produceren. Ten tweede zijn er de bewaarschimmels (of opslagschimmels) zoals *Penicillium* en *Aspergillus* die groeien en mycotoxinen produceren tijdens de opslag van het gewas (Veldman et al., 2003).

De productie van mycotoxinen door schimmels is grotendeels onvoorspelbaar (González Pereyra et al., 2008). Ook het gehalte aan mycotoxinen kan sterk variëren van jaar tot jaar, net zoals de verspreiding ervan in kuilvoeder, dat plaatselijk hoge gehalten kan bevatten naast kwalitatief goed voeder (Auerbach, 2006). De aanwezigheid van schimmel in het kuilvoeder wijst niet rechtstreeks op de aanwezigheid van mycotoxinen in het kuilvoeder. Mycotoxineproductie is namelijk afhankelijk van tal van omgevingsfactoren.

Niet alle schimmels kunnen mycotoxinen produceren. De ontwikkeling van toxigene schimmelspecies is een eerste vereiste voor de productie van mycotoxinen (Auerbach, 2006). Figuur 2 geeft een overzicht van de risicofactoren voor de productie van mycotoxinen.



Figuur 2: Risicofactoren voor mycotoxinevorming in de diervoederproductieketen (Veldman et al., 2003).

Volgens Miller (2008) is het vooral belangrijk om de veranderingen van het klimaat tegen te gaan omdat deze een grote invloed uitoefenen op het alsnak vaker voorkomen van toxigene schimmels. Pelhate (1977) stelde dat schimmelvorming in kuilvoeder vooral een gevolg is van nalatigheden bij het inkuilen van het voeder. Er zijn zowel teelttechnische methoden beschikbaar als genetische aspecten om het gehalte aan mycotoxinen te reduceren. De teelttechnische praktijken die gebruikt worden in het veld hebben hun limiet bereikt en zorgen enkel voor een vermindering van het risico. Het grootste potentieel om het mycotoxineprobleem aan te pakken, zowel direct als indirect, ligt bij de genetische resistentie. Genetische resistentie bestaat zowel uit inheemse resistentie als uit transgene resistentie. Inheemse resistentie tegen toxigene schimmels bestaat al in maïs maar wordt nog niet efficiënt uitgevoerd. Erfelijkheidsstudies hebben additieve en dominante genactiviteit aangetoond in kruisingen tussen resistente en gevoelige inkruisingen. De resistentie werd gelinkt met een of meerdere kerneiwitten die zowel de schimmelgroei als de aflatoxineproductie remmen bij *Aspergillus flavus*. Hiervoor zou een trypsineremmend eiwit verantwoordelijk zijn. Dit kan dus ook als een merker gebruikt worden in veredelingsprogramma's. Dit geldt echter niet voor alle schimmelspecies wat maakt dat deze techniek dus nog niet toegepast kan worden voor bewaarschimmels zoals *Penicillium roqueforti* s.l. Ook eigenschappen van maïshybriden kunnen bijdragen tot een verminderde mycotoxine productie of schimmelinfectie zonder gebruik te maken van een directe resistentie. Planten onder stress zijn gewoonlijk meer vatbaar voor toxigene schimmels en door plaatselijk aangepaste hybriden te telen kan het risico voor abiotische stress en daarmee de mycotoxine contaminatie verminderd worden. De transgene resistentie is opgebouwd volgens drie basisstrategieën. Een eerste strategie is om de infectie door het pathogeen te verminderen. Een tweede strategie bestaat uit het inbouwen van genen die in staat zijn om het toxine af te breken. Een laatste strategie is om de mycotoxine-accumulatie te verminderen door te interfereren met de biosynthesepathway (Munkvold, 2003).

In graskuilvoeder komt er een meer diverse mycoflora voor dan in maïskuilvoeder (Auerbach, 2006). Volgens Scudamore & Livesey (1998) verschilt de schimmelflora van voedergrassen significant van deze van granen en verschilt de mycotoxine contaminatie zowel kwalitatief als kwantitatief. Nout et al. (1993) deden onderzoek naar de aanwezigheid

van schimmelgroei in kuilvoerders over een periode van vijf jaar. Hieruit bleek dat 40% van de genomen stalen bietenperspulp geïnfecteerd was met *Penicillium roqueforti* s.l. Andere voorkomende schimmels waren *Aspergillus fumigatus* (8%) en *Byssoschlamys* spp. (4%). De mycoflora op groeiende gewassen is ook zeer verschillend van deze op opgeslagen producten. Bijna elk deel van de groeiende plant kan aangetast worden en dit vooral door *Fusarium*, *Cladosporium* en *Alternaria*. Na de oogst wordt de contaminatie van het voeder vooral gekenmerkt door de mycotoxinen van *Fusarium*, *Penicillium* en *Aspergillus*. Omdat een zekere graad van contaminatie in het voeder onvermijdbaar lijkt onder de huidige landbouwpraktijken, werden er door de Europese Unie aanvaardbare gehalten opgelegd die het voeder mag bevatten. Deze maximumwaarden zijn afhankelijk van het toxine, het type voeder en het dier en zijn leeftijd en hebben betrekking op het dierenwelzijn, alsook op de blootstelling van mensen aan dierlijke producten (Cheli et al., 2013). Mycotoxinen hebben niet alleen een negatief effect op de gezondheid, maar veroorzaken ook economische verliezen. Sommige schimmels zijn in staat tot de productie van meer dan één mycotoxine, terwijl sommige mycotoxinen geproduceerd worden door meer dan één schimmel (Hussein & Brasel, 2001). Volgens O'Brien et al. (2005) is de meest voorkomende schimmel in graskuilvoeder *Penicillium roqueforti* s.l., die aanwezig bleek te zijn in 86% van de onderzochte stalen en goed was voor 52% van alle gevonden isolaten.

Deoxynivalenol en zearalenone zijn in Nederland geïdentificeerd als de mycotoxinen die het meest voorkomen in het rantsoen van melkvee (respectievelijk in 81 en 46 % van de genomen stalen). DON en ZEA komen samen in 44% van de rantsoenen voor. Hoge gehalten aan roquefortine C en mycofenolzuur (respectievelijk 23 en 17 %) werden vastgesteld, alsook fumonisine (4%), terwijl andere mycotoxinen zoals aflatoxin B1, ochratoxin A, sterigmatocystine en T-2 toxine niet gedetecteerd werden in het onderzoek van Driehuis et al. (2008). Maïskuilvoeder is de belangrijkste bron van mycotoxinen in het rantsoen. Onderzoek naar de mycotoxinen aflatoxine, ochratoxine, fumonisine en deoxynivalenol in maïskuilvoeder wees uit dat het gehalte aan aflatoxine B1 steeg na fermentatie in de kuil, terwijl de gehalten aan ochratoxine A, fumonisine en DON afnamen naarmate de bewaring van het voeder vorderde (Keller et al., 2013). Fermentatieprocessen in de kuil zorgen over het algemeen niet voor een reductie van mycotoxinen, maar dit is waarschijnlijk afhankelijk van het droge stofgehalte. Indien dit laag is, dan kan er wel een invloed zijn. Een andere studie naar schimmelgroei onder hoge CO₂-concentraties en lage zuurstofconcentraties wees in de richting dat de productie van aflatoxine, patuline en roquefortine C enorm gereduceerd werd onder alle geteste atmosferen. Schimmels hebben immers een minimaal gehalte aan zuurstof nodig voor groei (Taniwaki et al., 2009).

Hierna worden er twee typevoorbeelden besproken; als eerste *Fusarium* voor veldschimmels en vervolgens *Penicillium* voor bewaarschimmels, en meer specifiek *P. roqueforti* s.l.

1.2.1 *Fusarium*

Fusarium species overleven in de grond en komen tot ontwikkeling tijdens de veldperiode van het gewas waar het de planten kan infecteren. In de planten worden de mycotoxinen zearalenone (ZEA) en deoxynivalenol (DON) geproduceerd. Het is dan ook belangrijk om deze schimmel al tijdens de veldperiode van het gewas te bestrijden. *Fusarium* zelf overleeft niet in het zure, anaerobe milieu van het kuilvoeder, maar de gevormde mycotoxinen echter wel (Fink-Gremmels, 2003). Sterk door schimmel aangetaste gewassen bevatten niet noodzakelijk veel mycotoxinen. De mycotoxinen van *Fusarium* zijn een chemisch en biologisch heel diverse groep (González Pereyra et al., 2008). Mycotoxinen van *Fusarium* hebben een effect op het metabolisme en het immuunsysteem. Uit een onderzoek van Korosteleva et al. (2009) bleek dat DON het meest voorkomende mycotoxine bij tarwe, maïs, hooi en maïskuilvoeder is. Voeder gecontamineerd met *Fusarium* mycotoxinen heeft een negatief effect op de dierprestaties, zoals lichaamsgewicht, voederopname en op de gezondheid (metabolisme) en op het aantal immunoglobulinen en antilichamen (immuunsysteem) van melkkoeien. Ze hebben ook een negatief effect op de melkproductie en de melksamenstelling. De mycotoxinen met de grootste impact op de gezondheid zijn deoxynivalenol, fumonisine en zearalenone. Nutritionele factoren zoals vitamine- of eiwittekort, en zelfs milieu omstandigheden zoals stress, kunnen de gevoeligheid voor mycotoxinen wijzigen (Morgavi & Riley, 2007). *Fusarium* mycotoxinen zijn wijdverspreid in voeder. Uit een studie van Damoglou et al. (1984) bleek dat *Fusarium* species niet overleven in het kuilvoeder van raaigras maar in aerobe omstandigheden kan deze schimmel zich wel uitbreiden (Gunner & Alexander, 1964). Er kunnen ook geen mycotoxinen geproduceerd worden in de afwezigheid van zuurstof.

1.2.2 *Penicillium*

Zie 1.3 *P. roqueforti* s.l. in kuilvoerders.

1.2.3 Gezondheidsrisico's

Mycotoxinen hebben verschillende acute en chronische effecten op mens en dier, afhankelijk van het species en de gevoeligheid van het dier voor mycotoxinen (Hussein & Brasel, 2001). Schimmel in kuilvoeder heeft een negatieve invloed op de smakelijkheid van het voeder en veroorzaakt daardoor een daling van de opname van nutriënten. Voor melkvee blijft het probleem niet beperkt tot het dier zelf, want de mycotoxinen in het voeder kunnen leiden tot hun aanwezigheid in zuivelproducten (Alonso et al., 2013). In gedomesticeerde dieren zoals melkvee, varkens en pluimvee zorgt mycotoxinecontaminatie van voeder voor een verminderde groei, een lagere voederconversie en reproductieve stoornissen. Ook een verzwakt immuunstelsel en schade aan essentiële organen, zoals de lever, kunnen voorkomen. Er heerst ook een publieke bezorgdheid over de gezondheid van de mens over het consumeren van dierlijke producten die eventueel residuen van mycotoxinen kunnen bevatten (Melo dos Santos et al., 2002). Mensen en dieren worden meestal blootgesteld aan mengsels van mycotoxinen in lage concentraties, meer dan aan individuele componenten in hoge concentraties. De biologische effecten veroorzaakt door mycotoxinen zijn afhankelijk

van de ingenomen hoeveelheid, het aantal mycotoxinen die aanwezig zijn, de tijd van blootstelling en de gevoeligheid van het organisme.

In tegenstelling tot éénmagige dieren zijn herkauwers minder gevoelig aan de effecten veroorzaakt door contaminatie van voeder met mycotoxinen. Dit is gebaseerd op het feit dat de microflora in de pens van herkauwers de mycotoxinen kunnen inactiveren en zelfs afbreken om zo het dier te beschermen. Herkauwers worden daarentegen wel vaker blootgesteld aan voeders met mycotoxinen, die afkomstig zijn van zowel ruwvoeders als krachtvoerders (Fink-Gremmels, 2008a). De mate waarin mycotoxinen afgebroken kunnen worden door de pensflora is afhankelijk van de dosis en de aard van het mycotoxine. DON en ZEA kunnen zonder veel problemen afgebroken worden, maar *Penicillium* kan door de productie van antimicrobiële componenten de pensflora verstoren. Dit resulteert in een verminderde afbraak van andere mycotoxinen welke dan door het duodenum kunnen geabsorbeerd worden. Een verzwakking van de barrière-functie van het rumen kan de absorptiesnelheid doen toenemen (Fink-Gremmels, 2008b). Hoog productieve dieren hebben meer last van de opname van mycotoxinen omdat ze een hogere passagesnelheid door de pens hebben. Dit zorgt ervoor dat de mycotoxinen niet voldoende in aanraking komen met de pensmicroflora, zodat deze niet in staat is om veel mycotoxinen af te breken. Ook jonge dieren, waarvan de pens nog niet voldoende ontwikkeld is, zijn hierdoor gevoeliger voor mycotoxinen (Berge, 2011).

Er zijn ook producten op de markt die mycotoxinen kunnen binden. Een voorbeeld hiervan is Mycosorb (Alltech), een product gemaakt van gistcelwanden dat er voor zorgt dat de mycotoxinen via de mest het lichaam kunnen verlaten (Fink-Gremmels, 2003).

1.3 *P. roqueforti* s.l. in kuilvoerders

In tegenstelling tot *Fusarium* species, welke pathogenen en/of endofyten zijn van maïs in het veld, zijn *Penicillium* species postharvest bederforganismen. Bij warm en droog weer of bij insectenschade echter kunnen deze species en hun mycotoxinen ook in het veld teruggevonden worden. Het zijn dan meer saprofytische species dan pathogene species (Mansfield & Kulda, 2007). Jimenez et al. (1985) vonden een verband tussen het voorkomen van *Penicillium* op het veld en *Penicillium* in het kuilvoeder; het voorkomen van *Penicillium* zowel preharvest als in gestockeerd voeder verloopt parallel. Mycotoxigene species maken meer dan de helft uit van de *Penicillium* species die gevonden worden in kuilvoeder. Hier wordt het merendeel van de schimmelgroei geremd door de lage zuurstofgehaltenes en de productie van organische zuren door melkzuurbacteriën. *Penicillium* species zijn echter in staat om deze micro-aerofiele lage pH-omgeving te overleven. Dit verklaart dan ook de hoge frequentie aan toxigene schimmels in kuilvoerders. *Penicillium roqueforti* s.l. komt van al de mycotoxigene schimmels het meest voor in kuilvoerders en het tweede meest voor in vers plantmateriaal (Mansfield & Kulda, 2007).

1.3.1 Classificatie van *Penicillium roqueforti* s.l.

Het geslacht *Penicillium* behoort tot de klasse van de Ascomycota en de orde van de Eurotiales (Haesaert, 2014) en omvat in totaal 58 species. Deze species zijn geordend in 6 verschillende groepen volgens hun overeenkomstige ecologische en fylogenetische kenmerken. De verschillende groepen zijn Coronata, Chrysogena, Roqueforti, Expansa, Digitata en Viridicata (Frisvad & Samson, 2004). *Penicillium roqueforti* groep bestaat uit 2 species; enerzijds *P. roqueforti* s.l. wat onder andere gebruikt wordt voor de startercultuur van blauwe schimmelkaas, en anderzijds een patuline producerend species *P. carneum* (Boysen et al., 2000). *P. roqueforti* s.l. is verder onderverdeeld in 2 species: *P. roqueforti* s.s. en *P. paneum* (Nielsen et al., 2006; O'Brien et al., 2008).

De taxonomie van *Penicillium* is traditioneel gebaseerd op verschillen in morfologie (Skouboe et al., 1999). Omdat er echter grote gelijkenissen zijn tussen de species en deze daarom niet gemakkelijk te onderscheiden zijn, werden er nieuwe methoden ontwikkeld op basis van hun fylogenetische kenmerken. Een eerste techniek is gebaseerd op iso-enzyme elektroforese (Skouboe et al., 1999). Recenter worden er moleculaire technieken toegepast die variaties in nucleair en mitochondriaal rDNA gebruiken. De niet-coderende rDNA regio's, en vooral de ITS 1 en ITS 2 regio's, zijn meer variabel dan de rRNA genen. ITS staat voor Internal Transcribed Spacers en alle leden van de *P. roqueforti* s.l. groep hebben soortspecifieke ITS sequenties (Samson et al., 2004). Een andere moleculaire techniek is gebaseerd op de partiële sequenties van β -tubuline en acetyl co-enzyme A synthetase genen. β -tubuline sequenties zijn uitstekende merkers voor species; ze verstrekken soortspecifieke sequenties voor 50 van de 58 species en ze zijn goed gecorreleerd met de fenotypische eigenschappen (Samson et al., 2004). β -tubuline speelt een rol in de biosynthese van het globulair eiwit tubuline, wat het basis-structureel bestanddeel van microtubuli is in eukaryote cellen. Acetyl Co A synthetase is mogelijk betrokken bij een

belangrijke stap in de penicilline biosynthese (O'Brien et al., 2008). Ook RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) wordt gebruikt.

1.3.2 Karakteristieken

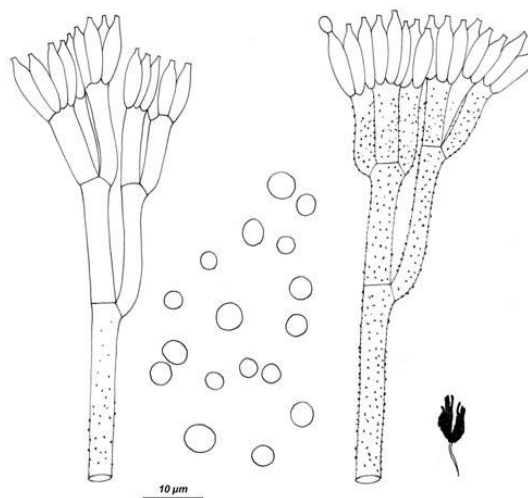
P. roqueforti s.l. is te zien als blauwe bollen in maïskuilvoeder en als donkere plekken in graskuilvoeder (Berge, 2011). Maar ook wanneer een voeder niet zichtbaar aangetast is door schimmels kan het toch schimmels en hun mycotoxinen bevatten. De meest frequent voorkomende species in kuilvoeder zijn *P. roqueforti* s.s. en *P. paneum* (Mansfield et al., 2008). *P. roqueforti* s.l. destabiliseert het kuilvoeder en resulteert in een verhoogde temperatuur van het voeder (Berge, 2011).

1.3.2.1 Macromorfologisch

De kleur van *P. roqueforti* s.s. en *P. paneum* is afhankelijk van het medium waarop ze aangetroffen worden. Zo kan *P. roqueforti* s.s. een zwart-groene kleur of een grijsgroene kleur aannemen (O'Brien et al., 2008) terwijl *P. paneum* dan weer een beige tot lichtbruine kleur of een groene kleur heeft (O'Brien et al., 2008; Frisvad & Samson, 2004). *P. roqueforti* s.s. is de dominantste schimmel in kuilvoeder maar dit neemt niet weg dat *P. paneum* sneller groeit dan *P. roqueforti* s.s. Bij lagere wateractiviteit daarentegen is de groeisnelheid van *P. roqueforti* s.s. dan weer hoger (O'Brien et al., 2008). Bij *P. paneum* worden er bij de helft van de isolaten ook exudaatdruppels geproduceerd. Geen enkel isolaat van *P. roqueforti* s.s. bezit deze eigenschap (O'Brien et al., 2008). *P. roqueforti* s.s. kan kleine, zachte, witte sclerotia-achtige structuren produceren na een langdurige incubatie (Frisvad & Samson, 2004).

1.3.2.2 Micromorfologisch

P. roqueforti s.s. en *P. paneum* hebben fijne, gladwandige conidia en iets ruwere conidioforen. Deze van *P. paneum* zijn ook iets groter dan deze van *P. roqueforti* s.s. (O'Brien et al., 2008). De kleur van de conidiën is donkergroen tot blauw-groen (Frisvad & Samson, 2004). De conidioforen en de conidia van *P. roqueforti* s.s. worden weergegeven in figuur 3.



Figuur 3: Conidioforen en conidia van *P. roqueforti* (Frisvad & Samson, 2004).

1.3.2.3 Voorkomen

P. roqueforti s.s. is het meest voorkomende species van de *Penicillium roqueforti* groep en dankzij zijn weerstand tegen organische zuren en zijn vermogen om te groeien bij een lage pH, komt dit species dan ook vooral voor op verwerkt voedsel zoals brood, bier, kaas. Ook in kuilvoerders gedijt het goed in de microaerofiele omgeving. Consumptie van aangetaste voeders door deze schimmel kan bijgevolg leiden tot verschillende toxische aandoeningen, waarvan enkele symptomen bloedingen en zelfs sterfte zijn (Nielsen et al., 2006).

1.3.3 Invloedsfactoren op de groei en ontwikkeling van *P. roqueforti* s.s. en *P. paneum*

De hoge gehalten aan *P. roqueforti* s.l. in kuilvoeder kunnen verklaard worden door zijn capaciteit om te groeien bij lage zuurstofconcentraties en hoge CO₂-concentraties, bij lage temperaturen en in de aanwezigheid van relatief hoge concentraties aan vluchtige vetzuren (Auerbach et al., 1998; Boysen et al., 2000; Frisvad & Samson, 2004). De hoge tolerantie van *P. roqueforti* s.l. tegenover organische zuren (propionzuur, azijnzuur, melkzuur en andere) en CO₂ kan verklaard worden doordat deze schimmel gedurende de evolutie steeds in competitie met melkzuurbacteriën leefde. *P. roqueforti* s.l. heeft zich als het ware aangepast aan de geproduceerde producten van melkzuurbacteriën zoals melkzuur en CO₂. Species van *P. roqueforti* s.l. worden dan ook uitsluitend teruggevonden in substraten waarin ook melkzuurbacteriën gegroeid hebben of gelijkaardige substraten (Frisvad & Samson, 2004).

Hieronder worden de verschillende factoren besproken die een invloed hebben op de groei en ontwikkeling van *P. roqueforti* s.l..

- Temperatuur

Een van de meest beïnvloedende factoren voor schimmelgroei is de temperatuur. Schimmels zijn niet in staat om hun inwendige temperatuur zelf te regelen en bijgevolg wordt dit gedaan door hun omgeving. Het effect van de temperatuur op de groeisnelheid en de metabolische efficiëntie is verschillend, zelfs wanneer de andere omgevingsfactoren zoals de nutriëntenbeschikbaarheid en de wateractiviteit constant blijven. *Penicillium roqueforti* s.l. heeft de grootste groeisnelheid bij 25°C terwijl C-substraatconversie-efficiëntie het hoogst is bij 20°C (Li et al., 2009). De optimale groei van *P. roqueforti* s.l. bevindt zich dus bij een temperatuur van 20-25°C maar hij groeit nog steeds bij 5°C; boven de 35°C echter kan hij zich niet meer ontwikkelen (Moreau, 1980). De optimale temperatuur voor toxineproductie is 25°C (Veldman et al., 2003). *P. roqueforti* s.l. is dus zwak mesofiel en niet psychrofiel (Frisvad & Samson, 2004).

- Vochtigheid

P. roqueforti s.l. verkiest vochtige omgevingen (Moreau, 1980). Kieming van *Penicillium* was het snelst bij een wateractiviteit van 0,90 a_w met een bijna lineaire toename met de tijd. De minimale a_w om te kiemen was algemeen lager dan deze voor groei en varieert met de temperatuur (Marin et al., 1998).

- Zuurstof

P. roqueforti s.l. heeft voor groei weinig zuurstof nodig, het is een microaerofiele schimmel (Veldman et al., 2003; Engel & Teuber 1978). Alle micro-aerofiele species hebben het voordeel dat ze vroeger kunnen beginnen ontwikkelen, bij een lager zuurstofgehalte en een hoger CO₂-gehalte. *P. roqueforti* s.l. vereist een minimale zuurstofconcentratie van 4,2% voor groei indien het CO₂-gehalte van de omgeving 80% niet overschrijdt (Auerbach, 2006; Moreau, 1980). *P. roqueforti* s.l. is ook de enige schimmel die een anaerobe bewaring kan overleven (Auerbach, 2006).

- Zuurtegraad

P. roqueforti s.l. kan heel goed pH-schommelingen tolereren, het merendeel ontwikkelt zich dan ook goed bij een pH tussen 3 en 10,5. De productie van mycelium is het best tussen een pH van 4,5 en 7,5 (Moreau, 1980) terwijl de optimale pH voor toxineproductie 6 à 6,5 is (Veldman et al., 2003). In vergelijking met andere schimmels kan *P. roqueforti* s.l. zich ontwikkelen in de aanwezigheid van hogere concentraties aan organische zuren (Auerbach, 2006). Zo worden gehalten van 1% propionzuur en 0,5% azijnzuur in het medium nog goed verdragen (Frisvad & Samson, 2004; Engel & Teuber, 1978; Boysen et al., 2000). Door Auerbach (2006) werd er een significante negatieve correlatie vastgesteld tussen het gehalte aan ongedissocieerd azijnzuur en het gehalte aan *P. roqueforti* s.l. op het einde van de anaerobe bewaring. Azijnzuur en melkzuur dringen het mycelium binnen onder hun niet geïoniseerde vorm. Azijnzuur en tot op een zekere hoogte ook melkzuur inhiberen de groei van *Penicillium* bij een pH van de omgeving die lager is dan de intercellulaire pH en dit als een gevolg van de ophoping van de zuren in het mycelium. Wanneer de interne pH echter gelijk is aan de pH van de omgeving, kunnen deze zuren gebruikt worden als voedingsbron (Vivier et al., 1992). Dit wijst er op dat deze schimmel de zuren als een verdere koolstofbron gebruikt (Frisvad & Samson, 2004). Vetzuren hebben ook een effect op de zuurstofopname door het mycelium van *P. roqueforti* s.l., afhankelijk van hun concentratie, de ketenlengte en de pH-waarde van de omgeving (Lawrence & Hawke, 1968).

- Zoutgehalte

De meeste species van *Penicillium* verdragen een gehalte van 5% NaCl zeer goed (Frisvad & Samson, 2004). In zuur milieu verdraagt *P. roqueforti* s.l. grote zoutconcentraties, zijn groei is namelijk het beste bij 5 à 8,5% zout (Moreau, 1980). Volgens Frisvad & Samson (2004) daarentegen zouden de species van *Penicillium roqueforti* s.l. echter sterk geremd worden bij 5% NaCl.

- Alcohol

P. roqueforti s.l. is het enige species dat op een medium kan groeien met hoge ethanol concentraties (Engel & Teuber, 1978; Moreau, 1980).

- Voedingsvereisten

De meeste kuilvoedergewassen bevatten een hoog gehalte aan stikstof. Gedurende de fermentatie van het voeder wordt het stikstof geheel of gedeeltelijk afgebroken tot ammonium en stikstofoxide (Spoelstra, 1985). *P. roqueforti* s.l. maakt geen gebruik van leucine, cysteïne en methionine als koolstofbron, ook lysine en glycine worden slechts matig gebruikt. *P. roqueforti* s.l. is wel in staat om het sulfaat van ammonium als enige stikstofbron te gebruiken (Moreau, 1980). Alle species groeien ook goed op creatine en nitriet als enige N-bron (Frisvad & Samson, 2004). De samenstelling van de aminozuren die geabsorbeerd worden uit het kuilvoeder is afhankelijk van het inkuilproces. Graskuilvoeder bevat substantiële hoeveelheden aan ruw eiwit voor herkauwers. Het gebruik van deze stikstoffracties verloopt zeer inefficiënt terwijl de efficiëntie van de microbiële eiwitsynthese in maïskuilvoeder een stuk hoger ligt (Givens & Rulquin, 2004).

1.3.4 *P. roqueforti* s.l. en zijn mycotoxinen

P. roqueforti s.l. is de belangrijkste contaminant in gras, maïs en suikerbietenpulp kuilvoerders in Europa (Yiannikouris & Jouany, 2002). Het is zichtbaar in het maïskuilvoeder onder de vorm van blauwe schimmelbollen die een aantal maanden na inkuilen kunnen verschijnen. Omdat deze schimmel slechts een minimale hoeveelheid zuurstof nodig heeft, is deze te zien over de gehele doorsnede van de kuil. In graskuilen verschijnt de schimmel onder de vorm van donkere, vette vlekken. *Penicillium roqueforti* s.l. produceert pas toxische stoffen in het kuilvoeder nadat andere bacteriën, na een aantal maanden in het zure milieu, verdwenen zijn (Fink-Gremmels, 2003). *Penicillium* species zijn in staat om verschillende mycotoxinen te produceren afhankelijk van het substraat waarop ze groeien. Dit werd bevestigd door een studie van Kokkonen et al. (2005).

Roquefortine C wordt geproduceerd door zowel *P. roqueforti* s.s. als door *P. paneum* (Veldman et al., 2003; Boysen et al., 2000; Frisvad & Samson, 2004;). *P. roqueforti* s.s. produceert daarnaast ook nog PR-toxine (Boysen et al., 2000; Frisvad & Samson, 2004; Wei et al., 1973; Frisvad & Filtenborg, 1989; Noroozian et al., 1998; Nielsen et al., 2006) en mycofenolzuur (Mansfield et al., 2008; Nielsen et al., 2006; Frisvad & Filtenborg, 1989). *P. paneum* produceert naast roquefortine C ook nog patuline (Boysen et al., 2000; Frisvad & Samson, 2004; Mansfield et al., 2008). PR-toxine en patuline zijn meer toxisch bevonden dan roquefortine C (Boysen et al., 2000). *P. roqueforti* s.s. en *P. paneum* zijn niet de enige species die roquefortine C kunnen produceren (Wagener et al., 1980), ook verschillende andere *Penicillium*species uit andere groepen dan de Roqueforti groep kunnen roquefortine C produceren, behalve de Coronata groep (Frisvad & Samson, 2004).

Uit een studie van Müller & Amend (1997) is gebleken dat de productie van mycofenolzuur, patuline en het PR toxine gepaard gaat met een stijging van de pH van het kuilvoeder van 4 naar 8 tot 9. Mycofenolzuur (MPA) is een toxische metaboliet en wordt vooral geproduceerd door species die op blauwe schimmelkaas voorkomen in een kunstmatig medium of in experimentele blauwe schimmelkaas. Al de andere species geïsoleerd van verschillende

blauwe schimmelkazen en commerciële startculturen synthetiseren meestal geen MPA (Engel et al., 1982; Nielsen et al., 2006).

Volgens O'Brien et al. (2006) verloopt de productie van PR toxine en patuline niet constant. Dit in tegenstelling tot roquefortine C, marcfortine A en andrastin A die wel constant geproduceerd worden. Om deze reden wordt roquefortine C gebruikt als een representatief indicatortoxine in kuilvoerders. Andere representatieve indicatortoxinen zijn aflatoxine B1 en DON voor respectievelijk aflatoxinen (geproduceerd door *Aspergillus* species) en trichothecenen (geproduceerd door *Fusarium* species) (Veldman et al., 2003; Auerbach et al., 1998).

Olivigni & Bullerman (1977) bemerkten de gelijktijdige productie van penicillinezuur en patuline door een atypische stam van *Penicillium roqueforti* op kaas, terwijl van commerciële stammen van *P. roqueforti* s.l., die gebruikt worden in de productie van blauwe schimmelkaas geen productie van penicillinezuur en patuline werd vastgesteld. Er is ook geen verband aangetoond tussen de productie van penicillinezuur en patuline. De laagste hoeveelheden aan deze mycotoxinen werden geproduceerd bij 25°C onafhankelijk van het substraat in een onderzoek bij 5, 12 en 25°C (Olivigni & Bullerman, 1977).

Ook de omgevingsomstandigheden voor de productie van mycotoxinen zijn van belang. Uit een studie van Kurtzman & Ciegler (1970) is namelijk gebleken dat maïsgraan met een hoog vochtgehalte en een bewaring op lage temperaturen (lager dan 10°C) een uitstekende bron is voor *Penicillium martensii*. Onder deze omstandigheden is de productie van penicillinezuur onvermijdelijk, terwijl bij hogere temperaturen (vanaf 15 °C) het toxine binnen de 45 dagen verdween. Oogsten in natte omstandigheden moet dus gevolgd worden door het voldoende drogen van het maïsgraan om het goed te kunnen bewaren en te kunnen gebruiken als diervoeder.

De toxiciteit van de verschillende *P. roqueforti* s.l. species vormt geen gevaar voor de volksgezondheid via de consumptie van blauwe schimmelkaas (Noroozian et al., 1998; Boysen et al., 1996).

1.3.5 Roquefortine C

Roquefortine C is een neurotoxine dat in kuilvoeder heel nadelige gevolgen kan hebben (Berge, 2011). Het is een wijdverspreide metabool van schimmels en wordt geproduceerd door verscheidene species, waaronder *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. chrysogenum*, *P. paneum*, *P. radicola*, *P. roqueforti* s.s. en *P. sclerotigenum* (Frisvad et al., 2006). De structuurformule van roquefortine C wordt in figuur 4 weergegeven. De 3,12-dubbele binding van roquefortine C is gedraaid volgens de E-configuratie (Scott et al., 1979).

Roquefortine is een alkaloïde en komt naast in kuilvoerders ook vaak voor in blauwe kaas (Scott et al., 1977). Het gehalte aan roquefortine C in kuilvoerders is relatief hoog in vergelijking met andere mycotoxinen in voeders (Tuller et al., 1998) maar de toxinen van *P. roqueforti* s.l. hebben wel een lage stabiliteit in kuilvoerders (Yiannikouris & Jouany, 2002).

Roquefortine C is een diketopiperazine dat gesynthetiseerd wordt uit tryptofaan, histidine en dimethylallyl pyrofosfaat. Zowel dehydrohistidyl-tryptofanyl-diketopiperazine (DHTD) en 3,12-dihydroroquefortine (roquefortine D) zijn gekende precursoren voor roquefortine C. De biosynthese van het natuurlijk product roquefortine C wordt dus eenvoudig bereikt door de dehydrogenatie van roquefortine D (Richard et al., 2004). Roquefortine C op zijn beurt is dan weer precursor voor glandicolines A en B, meleagrin en oxaline (Overy et al., 2005). In totaal zijn er 7 genen verantwoordelijk voor de productie van roquefortine C en zijn er 2 enzymen die meer dan één reactie katalyseren. Een eerste belangrijk enzym is het RoqD. RoqD katalyseert de reactie van histidyl-tryptofanyl-diketopiperazine (HTD) naar roquefortine D en de reactie van DHTD naar roquefortine C. Een tweede belangrijk enzym is het RoqR. RoqR katalyseert de reactie van HTD naar DHTD en de reactie van roquefortine D naar roquefortine C (Ali et al., 2013).

De biosynthese van roquefortine C wordt niet gecontroleerd door het LaeA eiwit, een nucleair methyltransferase eiwit dat verantwoordelijk is voor de synthese van diverse secundaire metabolieten zoals penicilline, maar ook voor de pigmentatie en de sporulatie (Kosalková et al., 2009).

Roquefortine C wordt niet alleen opgenomen door groeiend mycelium, maar wordt ook geïncorporeerd in eiwitten en myceliumresidu's. Transport van roquefortine C door cellulaire membranen gebeurt zowel via energie-afhankelijke als energie-onafhankelijke processen. Roquefortine C kan dus functioneren als een extracellulaire stikstofbron voor het organisme dat het produceert. De meeste schimmels kunnen zowel anorganische stikstof (nitraten en ammonium) als organische stikstofverbindingen (eiwitten en aminozuren) absorberen en gebruiken als een stikstof bron. Dit is essentieel voor de biosynthese van complexe moleculen, zoals aminozuren, eiwitten en nucleïnezuren (Overy et al., 2005).

1.3.5.2 Factoren die een invloed uitoefenen op de toxineproductie

De contaminatie van planten met schimmels en de biosynthese van mycotoxinen op het veld is afhankelijk van zowel abiotische als biotische factoren; namelijk van de omgevingscondities, de gezondheidstoestand van de plant voor de oogst en eventuele insectenschade, de meteorologische condities zoals de temperatuur, en de gehanteerde oogsttechnieken (Yiannikouris & Jouany, 2002; Magan et al., 2003). Ook de waterbeschikbaarheid in het groeiseizoen en de relatieve vochtigheid spelen een belangrijke rol op de aanwezigheid van mycotoxinen (Mansfield et al., 2008) evenals de aanwezigheid van andere contaminerende schimmels (Magan et al., 2003). De toxineproductie wordt positief beïnvloed door hogere temperaturen en waterbeschikbaarheid, behalve in het geval van roquefortine C waarbij hogere toxinegehalten bekomen worden bij lagere vochtgehalten gedurende de reproductieve en vroege korrelontwikkeling van maïs (Mansfield et al., 2008). De lage waterbeschikbaarheid en de hogere temperaturen zorgen voor stresssituaties voor de plant waardoor deze omstandigheden meer gunstig zijn voor de kolonisatie door *Penicillium* species. Het merendeel van de *Penicillium* species is in staat om te groeien bij gematigde tot lage temperaturen (Pitt, 2002) maar de productie van roquefortine C door *P.*

roqueforti s.l. kan zowel gebeuren bij een temperatuur van 25°C als van 15°C. De productie van roquefortine C wordt ook gestimuleerd door hoge concentraties aan sucrose (Hägglom, 1990). Zo is maïskuilvoeder een gunstigere omgeving voor de productie van roquefortine C dan graskuilvoeder. Schimmels groeien namelijk dubbel zo snel op suikers als op fermentatieproducten (Auerbach et al., 1998).

1.3.5.3 Toxiciteit

P. roqueforti s.l. in beschimmeld graan en maïskuilvoeder wordt geassocieerd met verwerping van de dracht, het ophouden van de nageboorte, een lagere voederopname, ketonemie, mastitis en zelfs verlamming (Hägglom, 1990; Tuller et al., 1998). Roquefortine C zelf is niet heel toxisch voor dieren (Mansfield et al., 2008; Auerbach et al., 1998). De acute toxiciteit die geassocieerd wordt met contaminatie door *P. roqueforti* s.l. is dus te wijten aan andere mycotoxinen zoals PR-toxine (Nielsen et al., 2006). Roquefortine C heeft wel een remmend effect op de progesteronsecretie en een daling van de pH van de pensvloeistof tot gevolg bij ooien (Tuller et al., 1998). Verder heeft roquefortine C ook nog antibacteriële eigenschappen. Het heeft een remmend effect op Gram-positieve bacteriën terwijl er op Gram-negatieve bacteriën geen invloed te bemerken is (Richard et al., 2004; Ali et al., 2013; Kopp-Holtwiesche & Rehm, 1990; Kopp & Rehm, 1979). Hoewel het exacte mechanisme van actie niet gekend is, lijkt het te interageren met cytochroom p450 en interfereert het met de RNA synthese (Ali et al., 2013). Roquefortine C remt enkel de bacteriele RNA synthese en heeft slechts een bescheiden invloed op de DNA- en eiwitproductie (Richard et al., 2004). Het antimicrobieel effect van roquefortine is enkel bacteriostatisch en heeft geen bactericide werking. De groeiremming kan een gevolg zijn van de invloed van roquefortine C op de bacteriele respiratie (Kopp-Holtwiesche & Rehm, 1990). Melkzuurbacteriën en *Clostridia* worden enkel verzwakt door roquefortine C (Kopp & Rehm, 1979). Roquefortine C vertoont ook een neurotoxische activiteit in muizen (Ali et al., 2013).

1.3.5.4 Mycotoxine bepaling

De determinatie van roquefortine C in kuilvoerders is gemakkelijk omdat het zeer stabiel is bij lage pH-waarden en er is geen enkele reactie mogelijk tussen roquefortine C en andere kuilcomponenten. Wanneer er roquefortine C gedetecteerd wordt in kuilvoeder kan dit ook wijzen op de aanwezigheid van meer toxische *P. roqueforti* s.l. toxinen. Dit omdat mycotoxinen vaak gelijktijdig geproduceerd kunnen worden (Auerbach et al., 1998). Vooraleer de bepaling van roquefortine C kan gebeuren, dient er een staal genomen te worden van het kuilvoeder. Deze eerste stap van de analytische procedure dient met veel aandacht en zorg te gebeuren. Het is namelijk van belang dat het monster representatief is voor het gehele kuilvoeder. Een analyse kan geen correcte informatie leveren indien het monster niet representatief is. Zo kan een monster van de toplaag verschillen van een monster genomen in het midden van het kuilvoeder of in de buurt van schimmelbollen. Niet alleen de plaats van staalname is van belang maar ook de periode waarin het monster genomen wordt. De analyse kan andere resultaten opleveren indien het monster tijdens de uitkuilfase, tijdens de stabiele fase of op een ander tijdstip genomen werd. Ook elke

mogelijke vorm van contaminatie van het monster dient vermeden te worden (De Doncker, 2013).

Er zijn verschillende methoden beschikbaar om mycotoxinen in kuilvoerders te bepalen. Het gebruik van ELISA-methoden is alleen geschikt voor de screening van grondstoffen (Veldman et al., 2003). PCR-methoden zijn ontwikkeld om een snelle en gevoelige detectie van potentiële toxigene schimmels uit te voeren (Richard et al., 2009). De aanwezigheid van roquefortine C kan ook bevestigd worden door de absorbantie in UV-licht, namelijk vloeistofchromatografie (LC) (Häggbloom, 1990). De fotostabiliteit van roquefortine C is echter nog onzeker daar gedurende de analyse van roquefortine C het analyt fotodecompositie kan ondergaan. Zo merkten Noroozian et al. (1998) een significante verandering op in het UV-absorbantiespectrum van roquefortine-oplossingen die blootgesteld werden aan licht. Ook met behulp van massaspectrometrie (MS) kan het gehalte aan roquefortine C bepaald worden (Häggbloom, 1990; Richard et al., 2009). Een combinatiemethode van vloeistofchromatografie met massaspectrometrie (LC-MS) is ook een veelbelovende ontwikkeling (Schneweis et al., 2000; Veldman et al., 2003). Hierbij kunnen er tot wel 17 mycotoxinen gelijktijdig bepaald worden. Bij de bepaling met LC-MS/MS kan het aantal mycotoxinen dat bepaald kunnen worden, oplopen tot wel 27 (Rasmussen et al., 2010). Recenter werden er enkele multi-mycotoxine methoden ontwikkeld, op basis van high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC kan ook gecombineerd worden met MS om mycotoxinen te kwalificeren na vaste fase extractie (Garon et al., 2006). Ook de combinatie van HPLC met diode array detectie en HPLC met fluorescentie detectie komt voor, net zoals de combinatie van PCR met HPLC-MS (Richard et al., 2009). De meest recente techniek is UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography). Deze techniek vertoont heel wat correlatie met de huidige HPLC-methode, maar kan, door het gebruik van een hogere druk, veel lagere concentraties detecteren (Ding et al., 2010). De huidige LC-technieken hebben een hogere analysetijd en in sommige gevallen zijn er zelfs twee injecties nodig. De meer gevoelige UHPLC-techniek dankt zijn hogere snelheid en resolutie aan het gebruik van kolommen die gevuld zijn met een partikelgrootte kleiner dan 2 µm en aan instrumenten die een hogere vloeistofdruk toelaten (Frenich et al., 2009).

2 Materiaal en methoden

Om het effect van stikstof en azijnzuur op de groei van *Penicillium roqueforti* s.l. na te gaan worden er twee experimenten uitgevoerd. In het eerste experiment wordt nagegaan in welke mate de schimmelgroei en ROC-productie beïnvloed worden door verschillen in het stikstofgehalte van het medium en metname qua anorganische en organische stikstof. Er wordt ook nagegaan of het toxine zich in de sporen of in het mycelium bevindt, of dat het wordt afgescheiden in het medium. In het tweede experiment wordt vervolgens nagegaan hoe de schimmelgroei en ROC-productie beïnvloed worden door het gehalte aan melkzuur en azijnzuur in het medium.

De kwantificatie van roquefortine C in de sporen, in de totale biomassa en in het mycelium zal bepaald worden met UHPLC. Aangezien deze methode nog in ontwikkeling is aan de Universiteit Gent, zal enkel de methode-ontwikkeling besproken worden. De effectieve kwantificatie van roquefortine C in de stalen kon niet uitgevoerd worden binnen het tijdsbestek van deze thesis.

2.1 Oplossingen

2.1.1 Fysiologisch water

Fysiologisch water bestaat uit gedemineraliseerd water en NaCl (0,85%). Deze bereiding dient geautoclaveerd te worden.

2.2 Media

2.2.1 Czapek Dox Yeast Extract (CDYE) agar

De media die gebruikt worden, bevatten een combinatie van anorganische stikstof en organische stikstof. Er wordt gebruik gemaakt van het CzapekDoxYeast Extract agar (CDYE) als basis (Sumarah et al., 2005). In tabel 1 is de samenstelling per liter CDYE agar weergegeven. Deze samenstelling komt overeen met medium A. De media B, C en D zijn hiervan afgeleid door te variëren met de hoeveelheid Yeast extract en NaNO₃.

Tabel 1: Basissamenstelling van CDYE agar per liter (medium A).

Component	Hoeveelheid
Sucrose	30 gram
Agar	15 gram
Yeast extract	5 gram
NaNO ₃	3 gram
K ₂ HPO ₄	1 gram
MgSO ₄	0,5 gram
KCl	0,5 gram
FeSO ₄	0,01 gram

Na autoclaveren wordt er nog 100 mg chloramphenicol per liter medium toegevoegd om bacteriële contaminatie te voorkomen.

2.2.1.1 Voor experiment stikstof

Voor dit experiment worden er 4 verschillende media gebruikt. De media worden in de laminaire flow in platen gegoten van 90 mm diameter. Elk medium wordt bedekt met een cellofaancirkel, die gesteriliseerd werd gedurende 3 uur in 70% ethanol in een warmwaterbad van 55°C (Carmichael, 1963). Medium A is het klassieke CDYE medium (tabel 1). Voor de overige media (B, C en D) wordt er t.o.v. het basismedium A gevarieerd met anorganische stikstof (NaNO₃) en organische stikstof (yeast extract) (tabel 2).

Tabel 2: Verschillende combinaties van anorganische en organische stikstof per liter medium.

	Medium A	Medium B	Medium C	Medium D
Yeast extract	5 gram	5 gram	1 gram	1 gram
NaNO₃	3 gram	0,6 gram	3 gram	0,6 gram

2.2.1.2 Voor experiment melkzuur en azijnzuur

Voor dit experiment worden er 2 verschillende media gebruikt met verschillende concentraties aan melkzuur en azijnzuur. De media worden opnieuw in de laminaire flow in platen gegoten van 90 mm diameter. Elk medium wordt eveneens bedekt met een cellofaancirkel, die gesteriliseerd werd gedurende 3 uur in 70% ethanol in een warmwaterbad van 55°C (Carmichael, 1963). Als basis wordt het medium B (tabel 2) gebruikt.

Aan medium 1 worden er normale niveaus aan melkzuur en azijnzuur toegevoegd, terwijl er aan medium 2 hoge niveaus aan melkzuur en azijnzuur worden toegevoegd (tabel 3). Voor de bepaling van de gehalten aan organische zuren in het kuilvoeder wordt er uitgegaan van een gemiddelde maïskuil.

Tabel 3: Verschillende combinaties van melkzuur en azijnzuur per liter medium.

	Medium 1	Medium 2
Melkzuur	0,89 ml	22,34 ml
Azijnzuur	0,35 ml	8,9 ml

Een gemiddelde maïskuil heeft een dichtheid van 200 kg DS/m³ waardoor een liter kuilvoeder 20 gram DS bevat. Een gemiddelde maïskuil met 33,5% DS bevat vervolgens 53,6 g melkzuur per kg DS. Per liter kuilvoeder is er dus 1,07 g melkzuur aanwezig met een dichtheid van 1,209 g/ml, wat neerkomt op 0,89 ml melkzuur.

Volgens dezelfde berekening bevat een gemiddelde maïskuil 18,5 g azijnzuur per kg DS. Per liter kuilvoeder is er dus 0,37 g azijnzuur aanwezig met een dichtheid van 1,0492 g/ml, wat neerkomt op 0,35 ml azijnzuur.

Voor medium 2 wordt er verondersteld dat de schimmel rechtstreeks in contact staat met de waterfase. Gemiddeld bevindt er zich 17,96 gram melkzuur op 1 kg VS (335 g DS en 665 g water) waardoor 1 liter water 27,01 gram melkzuur bevat met een dichtheid van 1,209 gram melkzuur per ml. Dit geeft een totaal van 22,34 ml melkzuur per liter water.

Ook bevindt er zich gemiddeld 6,2 gram azijnzuur op 1 kg VS waardoor 1 liter water gemiddeld 9,3 gram azijnzuur bevat met een dichtheid van 1,0492 gram azijnzuur per ml. Dit geeft vervolgens een totaal van 8,9 ml azijnzuur per liter water.

2.3 Sporenoplossingen

De schimmels *Penicillium roqueforti* s.s. (MUCL 46746) en *Penicillium paneum* (CBS 112295) werden op petriplaten opgekweekt en de sporen werden na 2 weken geïsoleerd met behulp van fysiologisch water waaraan Tween toegevoegd werd. Na 15 minuten in de centrifuge bij 8500 rpm werd het supernatans verwijderd en opnieuw heropgelost in fysiologisch water met Tween. Na vortexen werden de oplossing opnieuw gecentrifugeerd en heropgelost in fysiologisch water, nu zonder Tween. Na vortexen en filtratie werden er sporenoplossingen bekomen. De concentratie van deze oplossingen werd bepaald met behulp van de bürkertelkamer. De oplossingen werden vervolgens verdund met fysiologisch water en 50% glycerol tot een concentratie van $0,5 \cdot 10^6$ en bewaard gedurende 1 uur bij 4°C, nadien 23 u bij 20°C en tenslotte bij -80°C.

2.4 Proefopzet experiment stikstof

2 schimmelisolaten: *P. roqueforti* s. s. MUCL 46746 en *P. paneum* CBS 112295.

4 media: medium A t.e.m. D

Voor elk van de acht objecten worden er 35 petriplaten voorzien. De petriplaten worden centraal geïnoculeerd met 20 µl sporenoplossing. Dit komt overeen met $1 \cdot 10^{10}$ sporen per plaat. De petriplaten worden vervolgens aeroob geïncubeerd in het donker bij 22°C.

Het experiment wordt gedurende 15 dagen elke 3 dagen opgevolgd. Per opvolgmoment worden er telkens 6 petriplaten per object geobserveerd voor groei. Doel is om schimmelgroei te kwantificeren, te koppelen aan ROC-productie en bovendien de verdeling van ROC te bepalen over sporen, mycelium en medium.

2.4.1 Sporen

Per object worden er 3 petriplaten gebruikt, waarvan er 2 platen ook dienen voor de staalname van het medium. De begroeide cellofaanlaag wordt samen met 10 ml gedemineraliseerd water met 0,1% Tween80 in een 50-ml falcon gebracht om de sporen los te wassen. De bekomen oplossing wordt vervolgens over een dubbele miracloth gefiltreerd in

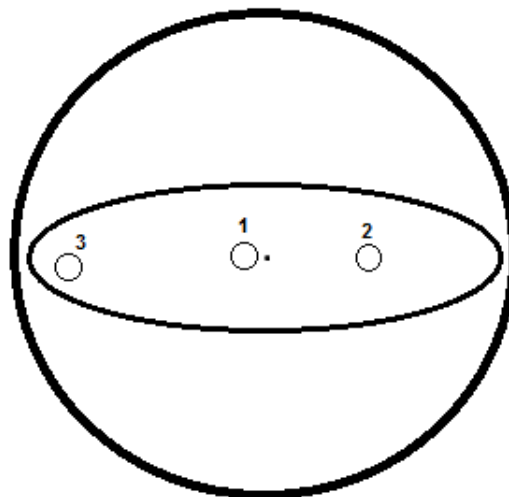
een 10-ml falcon. Dit filtraat wordt gecentrifugeerd bij 4000 rcf gedurende 10 minuten. Het gewicht van de bekomen sporenpellet wordt bepaald met een precisiebalans.

2.4.2 Totale fungale biomassa

Per object worden er 3 petriplaten gebruikt, waarvan er 2 platen ook dienen voor de staalname van het medium. De begroeide cellofaanlaag wordt samen met 10 ml gedemineraliseerd water in een 50-ml falcon gebracht. Na verwijderen van de cellofaan wordt de oplossing gecentrifugeerd bij 4000 rcf gedurende 10 minuten. Het gewicht van de totale fungale biomassa wordt bepaald met een precisiebalans.

2.4.3 Medium

Per object worden er 4 petriplaten bemonsterd: per petriplaat worden er 3 agarplugs van 9 mm diameter genomen en overgebracht naar een epje. De eerste agarplug wordt genomen kort bij de plaats van inoculatie (zie 1, figuur 6), de tweede agarplug wordt genomen halfweg de totale begroeiing (zie 2, figuur 6) en de derde agarplug wordt genomen op het uiteinde van de begroeiing (zie 3, figuur 6). Het gewicht van het medium wordt bepaald met een precisiebalans.



Figuur 6: Staalname van het medium.

De genomen stalen worden bewaard bij -20°C tot bepaling van roquefortine C.

2.5 Proefopzet experiment melkzuur en azijnzuur

2 schimmelisolaten: *P. roqueforti* s. s. MUCL 46746 en *P. paneum* CBS 112295.

2 media: medium 1 en medium 2.

Per object worden er 35 petriplaten voorzien. De petriplaten worden centraal geïnoculeerd met 20 µl sporenoplossing. Dit komt overeen met $1 \cdot 10^{10}$ sporen per plaat. De petriplaten worden vervolgens aeroob geïncubeerd in het donker bij 22°C.

De opvolging van het experiment met melkzuur en azijnzuur verliep analoog aan het experiment met stikstof.

2.6 Statistische verwerking resultaten

De bekomen resultaten voor de groei van *Penicillium roqueforti* s.l. en *P. paneum* werden statistisch verwerkt met behulp van het Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM). Per isolaat werd er nagegaan of de gewichten van respectievelijk de sporen, de biomassa en het mycelium significant verschilden voor de verschillende media per observatiemoment. Er werd ook nagegaan of er een correlatie is tussen de hoeveelheid geproduceerde sporen en de hoeveelheid mycelium. Eerst werd telkens de normaliteit gecontroleerd met de Shapiro Wilk test, een voorwaarde om verder te gaan met parametrische testen. Indien er aan deze voorwaarde was voldaan, werd er een ANOVA-analyse uitgevoerd om te testen of er verschillen waren tussen de verschillende media. Indien dit het geval was, werden de verschillende media vergeleken met de Tukey test. Er werd steeds gewerkt met een significantieniveau van 95%.

2.7 Kwantitatieve bepaling van roquefortine C

Aan het Labo voor Chemische Analysen (LCA) van de Universiteit Gent is een methode in ontwikkeling om het gehalte aan roquefortine C te kunnen bepalen in de matrices bekomen bij de twee uitgevoerde experimenten. De ontwikkeling van deze methode wordt beschreven in 3.4. De methode die finaal zal gebruikt worden voor de roquefortine C bepaling wordt hieronder weergegeven.

2.7.1 Materiaal

- ✓ UHPLC toestel van Perkin Elmer Flexar
- ✓ Mobiele fase A: zuiver acetonitrile (LC Grade) afkomstig van VWR
- ✓ Mobiele fase B: 10 mM NH_4Ac (opgelost in zuiver milli Q afkomstig van de Universiteit Gent zelf) afkomstig van Merck + azijnzuur AcAc met pH 5,6 afkomstig van VWR
- ✓ Kolom: standaard kolom (Phenomenex Kinetex C18) en pre-kolom (Phenomenex Security Guard C18)
- ✓ Vials met schroefdop van 1,5 mm (VWR)
- ✓ Oplosmiddel: methanol (sigma-aldrich)

2.7.2 Methode

- Bereiding mobiele fase B
 - 0,77 gram NH_4Ac afwegen en kwantitatief overbrengen in maatkolf van 1 liter
 - Milli Q toevoegen tot net onder de maatstreep
 - Op pH stellen met AcAc tot pH 5,6
 - Verder aanlengen met milli Q tot het volume bereikt is

- Finale methode

De geoptimaliseerde methode wordt weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Parameters in de finale methode voor de kwantificatie van roquefortine C.

Oplosmiddel:		MeOH					
Concentratie ROQ C oplossing:		Range: 500 ppb - 100 ppm					
Kolom:		Phenomenex Kinetex C18, 2,1 mm ID x 150 mm, 2,6 µm deeltjesgrootte					
Pre-kolom:		Phenomenex Security Guard C18 voor 2,1 mm ID kolommen					
Kolomtemperatuur:		30 °C					
Mobiele fase:		A: ACN					
		B: NH ₄ Ac + AcAc					
Gradiënt:	Tijd (min)	1 (eq)	4	0,1	2,9	0,1	0,9
	%A	40	80	100	100	40	40
	%B	60	20	0	0	60	60
Injectievolume:		10 µL					
Debiet:		0,4 mL/min					
Autosampler temperatuur:		4 °C					
Detectie:		330 nm					

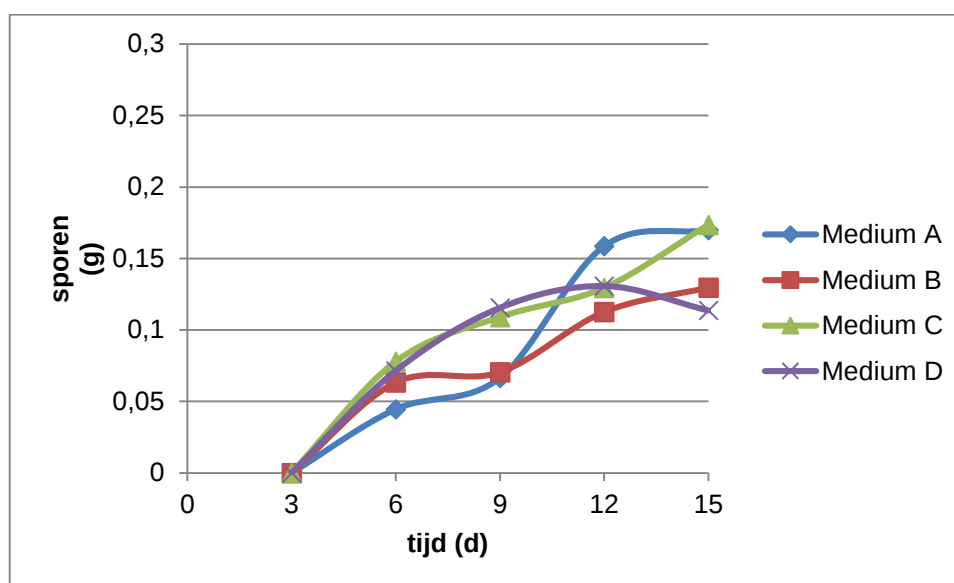
3. Resultaten en bespreking

3.1 Experiment 1: Stikstof

3.1.1 *Penicillium roqueforti* s.s.

3.1.1.1 Sporen

Op figuur 7 is de massa van de sporen van *P. roqueforti* s.s. MUCL 46746 weergegeven. Op de figuur zijn er geen duidelijke verschillen waar te nemen van de gewichtstoename van de sporen op de verschillende media.



Figuur 7: De massa van de sporen van *P. roqueforti* s.s. MUCL 46746 op verschillende media.

Tabel 5 geeft de gemiddelde hoeveelheid sporen weer in gram die geproduceerd worden door *P. roqueforti* s.s. op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Deze tabel bevestigt dat er geen significante verschillen tussen de verschillende media zijn aangezien ze allemaal dezelfde letter gekregen hebben. Er werd nog geen sporulatie vastgesteld na 3 dagen waardoor de metingen pas vanaf dag 6 konden starten.

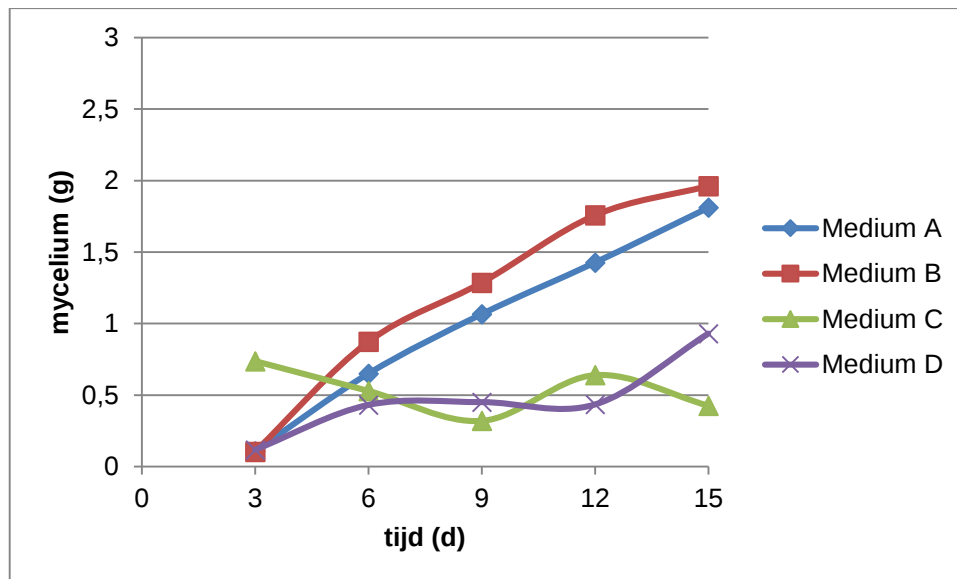
Tabel 5: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door *P. roqueforti* s.s. (PR).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid sporen (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PR	A	3	0,0000	0,0000	/
PR	B	3	0,0000	0,0000	/
PR	C	3	0,0000	0,0000	/
PR	D	3	0,0000	0,0000	/
PR	A	6	0,0446	0,0118	a

PR	B	6	0,0632	0,0134	a
PR	C	6	0,0779	0,0340	a
PR	D	6	0,0715	0,0220	a
PR	A	9	0,0665	0,0309	a
PR	B	9	0,0704	0,0102	a
PR	C	9	0,1091	0,0303	a
PR	D	9	0,1155	0,0263	a
PR	A	12	0,1586	0,0539	a
PR	B	12	0,1126	0,0142	a
PR	C	12	0,1295	0,0292	a
PR	D	12	0,1308	0,0196	a
PR	A	15	0,1699	0,0935	a
PR	B	15	0,1297	0,0160	a
PR	C	15	0,1735	0,0614	a
PR	D	15	0,1137	0,0340	a

3.1.1.2 Mycelium

Op figuur 8 is de myceliumgroei van *P. roqueforti* s.s. weergegeven. Op deze figuur valt op dat de myceliumgroei van de schimmel geremd wordt door lagere hoeveelheden aan organische stikstof in het medium.



Figuur 8: De groei van het mycelium van *P. roqueforti* s.s. MUCL 46746 op verschillende media.

Tabel 6 geeft de gemiddelde hoeveelheid mycelium weer in gram die geproduceerd wordt door *P. roqueforti* s.s. op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

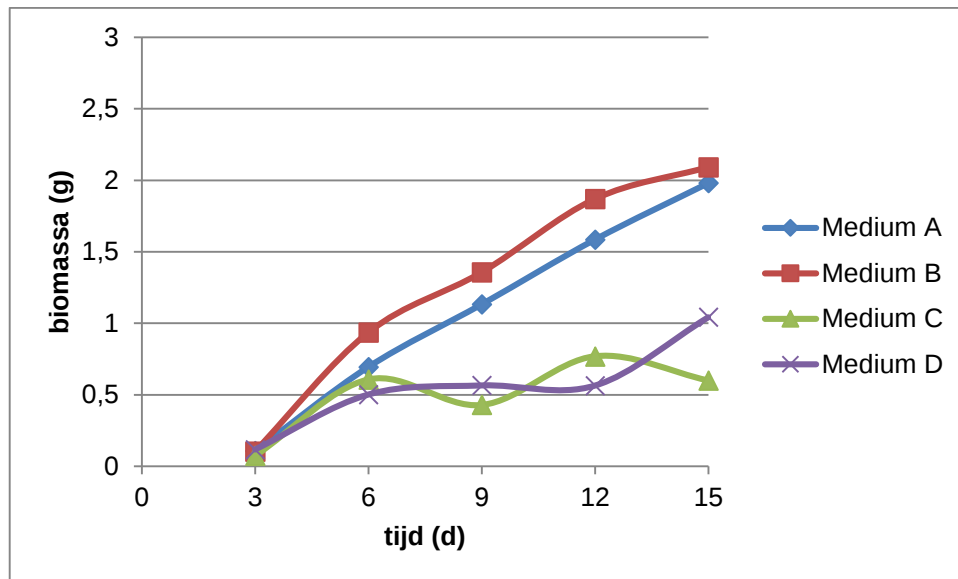
Na 3 en na 6 dagen werden er geen significante verschillen vastgesteld tussen de verschillende media. Uit de tabel kan afgeleid worden dat medium B en medium C telkens significant verschillende myceliumgroei opleveren na 9, 12 en 15 dagen. Hieruit blijkt dat *P. roqueforti* s.s. beter groeit op een medium met veel organische en weinig anorganische stikstof en dat zijn myceliale groei dus significant geremd wordt door een tekort aan organische stikstof.

Tabel 6: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van *P. roqueforti* s.s. (PR).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid mycelium (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PR	A	3	0,1082	0,0000	a
PR	B	3	0,1030	0,0000	a
PR	C	3	0,7373	0,0000	a
PR	D	3	0,1172	0,0000	a
PR	A	6	0,6498	0,0000	a
PR	B	6	0,8724	0,0000	a
PR	C	6	0,5289	0,0000	a
PR	D	6	0,4306	0,0000	a
PR	A	9	1,0661	0,0000	bc
PR	B	9	1,2856	0,0000	c
PR	C	9	0,3198	0,0000	a
PR	D	9	0,4503	0,0000	ab
PR	A	12	1,4271	0,0000	bc
PR	B	12	1,7573	0,0000	c
PR	C	12	0,6393	0,0000	ab
PR	D	12	0,4340	0,0000	a
PR	A	15	1,8106	0,0000	ab
PR	B	15	1,9623	0,0000	b
PR	C	15	0,4260	0,0000	a
PR	D	15	0,9294	0,0000	ab

3.1.1.3 Totale biomassa

Op figuur 9 is de groei van de totale biomassa van *P. roqueforti* s.s. weergegeven. Ook hier valt op dat de groei van de schimmel sterker is op media die veel organische stikstof bevatten.



Figuur 9: De groei van de biomassa van *P. roqueforti* s.s. MUCL 46746 op verschillende media.

Tabel 7 geeft de gemiddelde hoeveelheid biomassa weer in gram die geproduceerd wordt door *P. roqueforti* s.s. op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Ook hier valt op dat na 3 en na 6 dagen nog geen significante verschillen waargenomen konden worden tussen de verschillende media. Na 9, 12 en 15 dagen is er opnieuw een significant verschil waar te nemen tussen medium B en medium C. De totale biomassa geproduceerd door *P. roqueforti* s.s. wordt dus duidelijk geremd bij een tekort aan organische stikstof.

Tabel 7: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van *P. roqueforti* s.s. (PR).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid biomassa (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PR	A	3	0,1082	0,0244	a
PR	B	3	0,1030	0,0254	a
PR	C	3	0,0737	0,0226	a
PR	D	3	0,1172	0,0276	a
PR	A	6	0,6944	0,0568	a
PR	B	6	0,9356	0,3387	a
PR	C	6	0,6068	0,1390	a
PR	D	6	0,5020	0,0941	a
PR	A	9	1,1326	0,4592	bc
PR	B	9	1,3561	0,1549	c
PR	C	9	0,4288	0,1105	a
PR	D	9	0,5658	0,1289	ab
PR	A	12	1,5857	0,1277	bc

PR	B	12	1,8699	0,6761	c
PR	C	12	0,7688	0,1910	ab
PR	D	12	0,5648	0,1010	a
PR	A	15	1,9805	0,7274	b
PR	B	15	2,0920	0,5798	b
PR	C	15	0,5996	0,1809	a
PR	D	15	1,0431	0,3810	ab

3.1.1.4 Correlatie tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium

In tabel 8 wordt de correlatie nagegaan tussen de geproduceerde hoeveelheid sporen en mycelium door *P. roqueforti* s.s.

Na 3 dagen werden er nog geen sporen geproduceerd en dus kan hier geen correlatie berekend worden. Na 6, 12 en 15 dagen is de p-waarde groter dan 0,05. Hierdoor kan er besloten worden met 95% zekerheid dat er geen significante correlatie is tussen de sporenproductie en de hoeveelheid mycelium van *P. roqueforti* s.s.

Na 9 dagen is de p-waarde kleiner dan het 0,05 waardoor er met 95% zekerheid kan besloten worden dat er een significante correlatie is tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium van *P. roqueforti* s.s. Dit verband is negatief en de Pearson-correlatiecoëfficiënt r bedraagt -0,810. Concreet betekent dit dat de hoeveelheid mycelium die geproduceerd wordt, afneemt terwijl de hoeveelheid sporen die geproduceerd worden, toenemen, en omgekeerd. Wanneer de schimmel m.a.w. minder mycelium produceert en dus een afnemende groei kent, zal de hoeveelheid geproduceerde sporen toenemen.

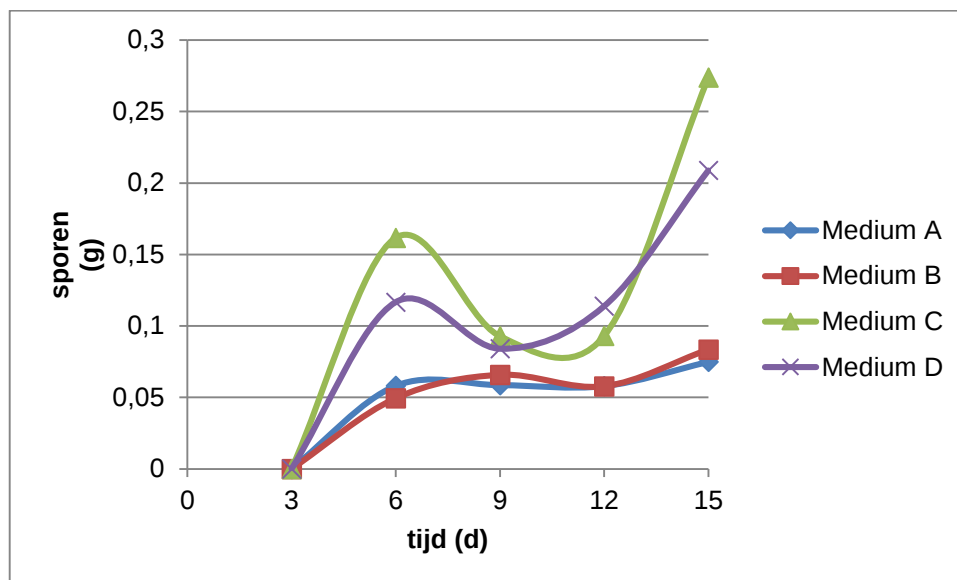
Tabel 8: Correlatie tussen sporen en mycelium van *P. roqueforti* s.s.

Dagen	p-waarde	r
3	/	/
6	0,924	-0,031
9	0,001	-0,810
12	0,516	-0,208
15	0,226	-0,377

3.1.2 *Penicillium paneum*

3.1.2.1 Sporen

Op figuur 10 is de massa van de sporen, geproduceerd door door *P. paneum*, weergegeven. Het gewicht van de sporen lijkt meer toe te nemen op media die arm zijn aan organische stikstof.



Figuur 10: De massa van de sporen van *P. paneum* CBS 112295 op verschillende media.

Tabel 9 geeft de gemiddelde hoeveelheid sporen weer in gram die geproduceerd wordt door *P. paneum* op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Na 3 dagen had er nog geen sporulatie plaats gevonden waardoor de metingen voor de hoeveelheid sporen pas gestart werden na 6 dagen. Op dag 6 werd er een significant verschil bekomen tussen de media A en B en de media C en D. Vanaf dag 9 zijn de resultaten eerder verdeeld door de grote schommelingen in productie van sporen door *P. paneum*.

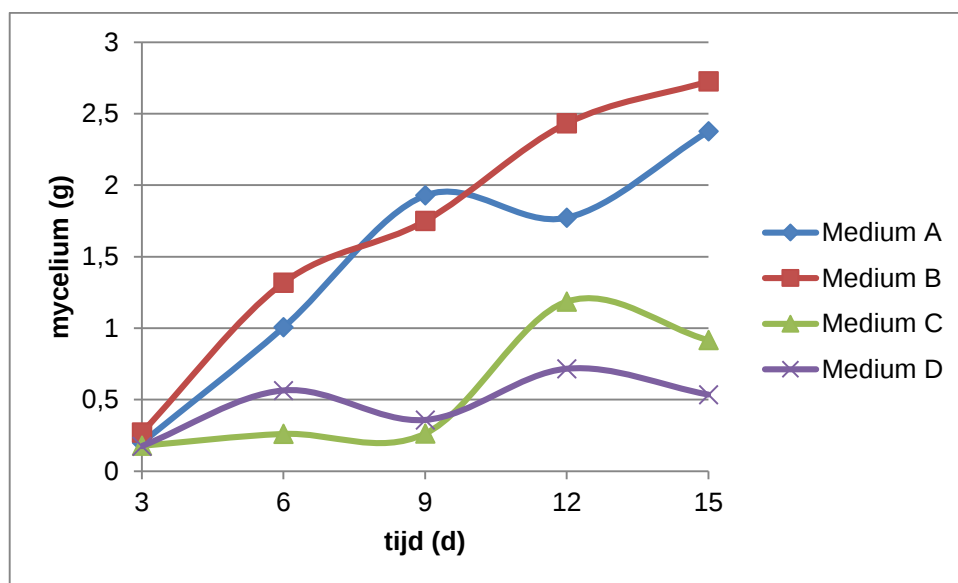
Tabel 9: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door *P. paneum* (PP).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid sporen (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PP	A	3	0,0000	0,0000	/
PP	B	3	0,0000	0,0000	/
PP	C	3	0,0000	0,0000	/
PP	D	3	0,0000	0,0000	/
PP	A	6	0,0582	0,0080	a
PP	B	6	0,0495	0,0055	a
PP	C	6	0,1617	0,0309	b

PP	D	6	0,1167	0,0196	b
PP	A	9	0,0587	0,0104	a
PP	B	9	0,0658	0,0040	ab
PP	C	9	0,0928	0,0140	b
PP	D	9	0,0841	0,0107	ab
PP	A	12	0,0580	0,0052	a
PP	B	12	0,0578	0,0013	a
PP	C	12	0,0930	0,0238	ab
PP	D	12	0,1138	0,0291	b
PP	A	15	0,0749	0,0145	a
PP	B	15	0,0836	0,0111	a
PP	C	15	0,2737	0,0527	b
PP	D	15	0,2088	0,1057	ab

3.1.2.2 Mycelium

Op figuur 11 is de myceliumgroei van *P. paneum* weergegeven. Ook deze schimmel wordt duidelijk geremd door een lagere hoeveelheid aan organische stikstof in het medium.



Figuur 11: De groei van het mycelium van *P. paneum* CBS 112295 op verschillende media.

Tabel 10 geeft de gemiddelde hoeveelheid mycelium weer in gram die geproduceerd wordt door *P. paneum* op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

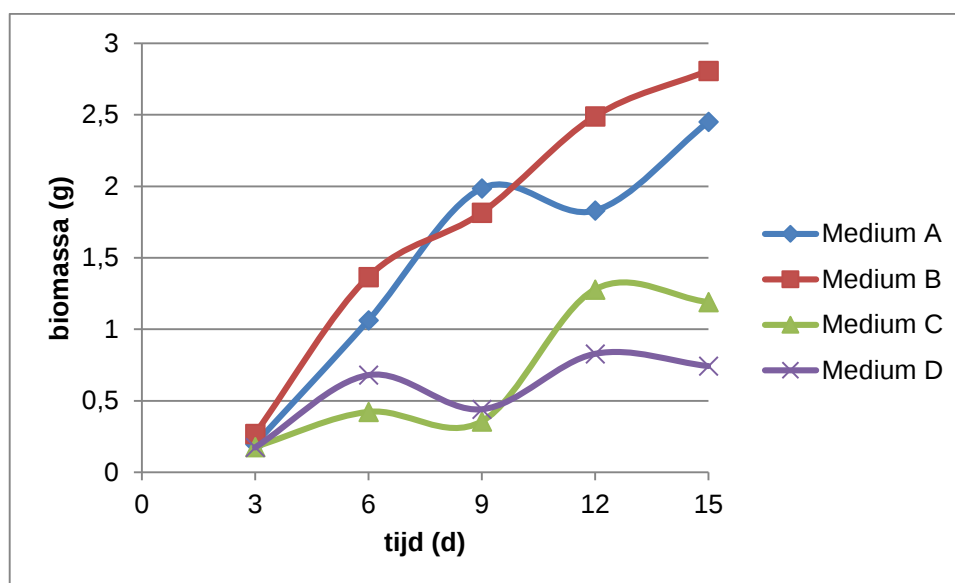
Op dag 9 en dag 15 is er een duidelijk significant verschil tussen de media arm aan organische stikstof en de media die veel organische stikstof bevatten. Op dag 12 is het verschil tussen medium A en medium C kleiner door de compensatie van de grotere hoeveelheid anorganische stikstof in de media.

Tabel 10: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van *P. paneum* (PP).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid mycelium (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PP	A	3	0,1981	0,0000	a
PP	B	3	0,2695	0,0000	b
PP	C	3	0,1777	0,0000	a
PP	D	3	0,1746	0,0000	a
PP	A	6	1,0054	0,0000	bc
PP	B	6	1,3173	0,0000	c
PP	C	6	0,2608	0,0000	a
PP	D	6	0,5639	0,0000	ab
PP	A	9	1,9280	0,0000	b
PP	B	9	1,7495	0,0000	b
PP	C	9	0,2623	0,0000	a
PP	D	9	0,3577	0,0000	a
PP	A	12	1,7731	0,0000	bc
PP	B	12	2,4321	0,0000	c
PP	C	12	1,1862	0,0000	ab
PP	D	12	0,7154	0,0000	a
PP	A	15	2,3766	0,0000	b
PP	B	15	2,7252	0,0000	b
PP	C	15	0,9168	0,0000	a
PP	D	15	0,5348	0,0000	a

3.1.2.3 Totale biomassa

Op figuur 12 is de groei van de totale biomassa van *P. paneum* weergegeven. De groei van de schimmel lijkt ook hier groter op media die veel organische stikstof bevatten.



Figuur 12: De groei van de biomassa van *P. paneum* CBS 112295 op verschillende media.

Tabel 11 geeft de gemiddelde hoeveelheid biomassa weer in gram die geproduceerd wordt door *P. paneum* op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Net als voor de hoeveelheid mycelium van *P. paneum* is er ook voor de totale biomassa een significant verschil tussen media A en B en media C en D op dag 9 en dag 15. En ook op dag 12 is het verschil tussen medium A en medium C niet meer significant.

Tabel 11: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van *P. paneum* (PP).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid biomassa (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PP	A	3	0,1981	0,0268	a
PP	B	3	0,2695	0,0192	b
PP	C	3	0,1777	0,0149	a
PP	D	3	0,1746	0,0319	a
PP	A	6	1,0636	0,3020	bc
PP	B	6	1,3668	0,1588	c
PP	C	6	0,4224	0,1543	a
PP	D	6	0,6806	0,0972	ab
PP	A	9	1,9867	0,2565	b
PP	B	9	1,8153	0,1987	b
PP	C	9	0,3552	0,0325	a
PP	D	9	0,4418	0,1287	a
PP	A	12	1,8311	0,2580	bc
PP	B	12	2,4899	0,1897	c
PP	C	12	1,2792	0,6348	ab
PP	D	12	0,8293	0,1913	a
PP	A	15	2,4515	0,0342	b
PP	B	15	2,8087	0,1645	b
PP	C	15	1,1905	0,4056	a
PP	D	15	0,7436	0,4577	a

3.1.2.4 Correlatie tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium

In tabel 12 wordt de correlatie nagegaan tussen de geproduceerde hoeveelheid sporen en mycelium door *P. paneum*.

Na 3 dagen werden er nog geen sporen geproduceerd door *P. paneum* waardoor er geen correlatie tussen sporen en mycelium vastgesteld kon worden. Na 6, 9, 12 en 15 dagen is de p-waarde overal kleiner dan 0,05. Er kan dus met 95% zekerheid besloten worden dat er een significante correlatie is tussen de sporen en het mycelium. Dit verband is overal negatief en de respectievelijke Pearson-correlatiecoëfficiënten r worden weergegeven in tabel 12.

Tabel 12: Correlatie tussen sporen en mycelium van *P. paneum*.

Dagen	p-waarde	r
3	/	/
6	0,000	-0,866
9	0,001	-0,834
12	0,004	-0,768
15	0,000	-0,866

3.1.3 Besluit

Uit de resultaten blijkt dat zowel *P. roqueforti* s.s. als *P. paneum* geremd worden in groei door een tekort aan organische stikstof in het medium. Dit uit zich door een verminderde hoeveelheid mycelium en totale biomassa die geproduceerd kan worden. De hoeveelheid sporen geproduceerd door *P. roqueforti* s.s. ondervond geen significant verschil tussen de verschillende media, terwijl de hoeveelheid sporen van *P. paneum* daarentegen wel een verhoogde productie van sporen kende bij een tekort aan organische stikstof in het medium. Voor *P. paneum* kon er een negatieve correlatie vastgesteld worden tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium dat geproduceerd werd. Voor *P. roqueforti* s.s. was dit verschil minder het geval.

Uit de literatuurstudie is gebleken dat de meeste schimmels zowel anorganische als organische stikstof kunnen absorberen en gebruiken als een stikstofbron (Overy et al., 2005). Gedurende de fermentatie van het kuilvoeder wordt de organische stikstof geheel of gedeeltelijk afgebroken tot anorganische stikstof (Spoelstra, 1985). Hierdoor komen er veel nutriënten ter beschikking van de schimmel. Bij een tekort aan organische stikstof echter zal er een voorraad aangelegd worden door de schimmel waardoor deze de stikstof op een later tijdstip kan gebruiken. Hierdoor zal de groei van de schimmel gereduceerd worden en de sporenproductie toenemen door de verhoogde stresssituatie.

De productie van roquefortine C zal waarschijnlijk het hoogst zijn wanneer de schimmel zich in een stresssituatie bevindt. Op deze manier zou het zich beter kunnen verdedigen tegen de vijandige omgeving. Het effectieve gehalte aan roquefortine C in de sporen, het mycelium en in het medium zal blijken uit de resultaten van de UHPLC.

3.2 Experiment 2: Azijnzuur

De resultaten worden weergegeven in tabel 13.

Tabel 13: Resultaten van Experiment 2: Azijnzuur.

	<i>P. roqueforti</i> s.s.	<i>P. paneum</i>	<i>P. roqueforti</i> s.s.	<i>P. paneum</i>	<i>P. roqueforti</i> s.s.	<i>P. paneum</i>
	Sporen (g)		Mycelium (g)		Biomassa (g)	
na 3 d						
medium 1	0,0000	0,0000	0,0881	0,1493	0,0881	0,1493
medium 2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
na 6 d						
medium 1	0,0934	0,0979	0,4935	1,5872	0,5869	1,6851
medium 2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
na 9 d						
medium 1	0,1558	0,1008	0,7960	2,4369	0,9519	2,5377
medium 2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0734	0,0000	0,0734
na 12 d						
medium 1	0,1912	0,1674	0,7821	2,4221	0,9733	2,5895
medium 2	0,0000	0,0000	0,0528	0,0926	0,0528	0,0926
na 15 d						
medium 1	0,2059	0,188	1,2044	2,4782	1,4103	2,6662
medium 2	0,0793	0,0688	0,1578	0,2698	0,2371	0,3386

Uit tabel 13 is af te leiden dat zowel *P. roqueforti* s.s. als *P. paneum* een kleinere massa aan sporen produceerde op het medium met hoge concentraties aan melkzuur en azijnzuur. Deze sporenproductie startte ook pas na 12 dagen na inoculatie.

Ook de myceliumgroei werd duidelijk geremd door de hogere gehalten aan melkzuur en azijnzuur. Het isolaat van *P. paneum* blijkt hier agressiever te zijn dan dit van *P. roqueforti* s.s. omdat deze eerder startte met de productie van mycelium.

De totale schimmelgroei was het sterkst op het medium met relatief minder melkzuur en azijnzuur. De groei van *P. roqueforti* s.s. startte pas vanaf dag 9 na inoculatie terwijl *P. paneum* reeds begon te groeien 6 dagen na inoculatie.

3.2.1 *Penicillium roqueforti* s.s.

3.2.1.1 Sporen

Tabel 14 geeft de gemiddelde hoeveelheid sporen weer in gram die geproduceerd worden door *P. roqueforti* s.s. op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

De tabel bevestigt het vermoeden dat medium 1 en medium 2 wel degelijk significant verschillen van elkaar qua sporenopbrengst: de sporenproductie van *P. roqueforti* s.s. wordt geremd door de hogere concentraties aan melkzuur en azijnzuur in het medium.

Tabel 14: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door *P. roqueforti* s.s. (PR).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid sporen (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PR	1	3	0,0000	0,0000	/
PR	2	3	0,0000	0,0000	/
PR	1	6	0,0934	0,0357	a
PR	2	6	0,0000	0,0000	b
PR	1	9	0,1558	0,0153	a
PR	2	9	0,0000	0,0000	b
PR	1	12	0,1912	0,0263	a
PR	2	12	0,0000	0,0000	b
PR	1	15	0,2059	0,0173	a
PR	2	15	0,0793	0,0080	b

3.2.1.2 Mycelium

Tabel 15 geeft de gemiddelde hoeveelheid mycelium weer in gram die geproduceerd wordt door *P. roqueforti* s.s. op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Medium 1 en medium 2 verschillen ook hier significant van elkaar wat wil zeggen dat de hoeveelheid mycelium, die gevormd wordt door *P. roqueforti* s.s., lager is bij de hogere gehalten aan melkzuur en azijnzuur in het medium.

Tabel 15: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van *P. roqueforti* s.s. (PR).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid mycelium (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PR	1	3	0,0881	0,0455	a
PR	2	3	0,0000	0,0000	b
PR	1	6	0,4935	0,1515	a
PR	2	6	0,0000	0,0000	b
PR	1	9	0,7960	0,1056	a
PR	2	9	0,0000	0,0000	b
PR	1	12	0,6759	0,1939	a
PR	2	12	0,0528	0,0081	b
PR	1	15	1,2044	0,4290	a
PR	2	15	0,1578	0,1131	b

3.2.1.3 Totale biomassa

Tabel 16 geeft de gemiddelde hoeveelheid biomassa weer in gram die geproduceerd wordt door *P. roqueforti* s.s. op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Ook voor de totale biomassa van *P. roqueforti* s.s. geldt dus dat er een significant verschil optreedt tussen de twee media, met sterkere groei bij de lagere zuurconcentraties.

Tabel 16: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van *P. roqueforti* s.s. (PR).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid biomassa (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PR	1	3	0,0881	0,0455	a
PR	2	3	0,0000	0,0000	b
PR	1	6	0,5869	0,1159	a
PR	2	6	0,0000	0,0000	b
PR	1	9	0,9519	0,0931	a
PR	2	9	0,0000	0,0000	b
PR	1	12	0,8671	0,2127	a
PR	2	12	0,0528	0,0081	b
PR	1	15	1,4103	0,4459	a
PR	2	15	0,2371	0,1195	b

3.2.1.4 Correlatie tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium

In tabel 17 wordt de correlatie nagegaan tussen de geproduceerde hoeveelheid sporen en mycelium door *P. roqueforti* s.s.

Na 3 dagen was er nog geen sporulatie en na 6 dagen was de p-waarde groter dan 0,05 waardoor er geen significante correlatie is tussen hoeveelheid sporen en mycelium. Na 9, 12 en 15 dagen echter is de p-waarde overal kleiner dan 0,05, wat er op wijst dat er een significant verband bestaat tussen de hoeveelheid geproduceerde sporen en mycelium van *P. roqueforti* s.s. Dit verband wordt weergegeven door de Pearson-correlatiecoëfficiënten r en is overal positief. Concreet betekent dit dat wanneer de hoeveelheid mycelium die geproduceerd wordt, toeneemt, de hoeveelheid geproduceerde sporen eveneens zal toenemen. Wanneer de schimmel m.a.w. meer mycelium produceert en dus een toenemende groei kent, dan zal de hoeveelheid geproduceerde sporen ook toenemen.

Tabel 17: Correlatie tussen sporen en mycelium van *P. roqueforti* s.s.

Dagen	p-waarde	r
3	/	/
6	0,101	0,727
9	0,002	0,968
12	0,002	0,966

15	0,003	0,956
----	-------	-------

3.2.2 *Penicillium paneum*

3.2.2.1 Sporen

Tabel 18 geeft de gemiddelde hoeveelheid sporen weer in gram die geproduceerd wordt door *P. paneum* op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Na 3 dagen werd er nog geen sporulatie van de schimmel vastgesteld. Vanaf 6 dagen na de inoculatie kunnen er wel significante verschillen vastgesteld worden tussen de twee media. De sporulatie van *P. paneum* wordt duidelijk geremd door een verhoogde concentratie aan melkzuur en azijnzuur in het medium.

Tabel 18: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid sporen geproduceerd door *P. paneum* (PP).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid sporen (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PP	1	3	0,0000	0,0000	/
PP	2	3	0,0000	0,0000	/
PP	1	6	0,0979	0,0058	a
PP	2	6	0,0000	0,0000	b
PP	1	9	0,1008	0,0119	a
PP	2	9	0,0000	0,0000	b
PP	1	12	0,1975	0,0599	a
PP	2	12	0,0000	0,0000	b
PP	1	15	0,1786	0,0169	a
PP	2	15	0,0688	0,0007	b

3.2.2.2 Mycelium

Tabel 19 geeft de gemiddelde hoeveelheid mycelium weer in gram die geproduceerd wordt door *P. paneum* op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

Ook voor het geproduceerde mycelium geldt dat *P. paneum* significant geremd wordt door hogere zuurconcentraties.

Tabel 19: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid mycelium van *P. paneum* (PP).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid mycelium (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PP	1	3	0,1493	0,0489	a
PP	2	3	0,0000	0,0000	b

PP	1	6	1,5872	0,2095	a
PP	2	6	0,0000	0,0000	b
PP	1	9	2,6148	0,4591	a
PP	2	9	0,0734	0,0566	b
PP	1	12	2,3920	0,1513	a
PP	2	12	0,0926	0,0287	b
PP	1	15	2,4876	0,6210	a
PP	2	15	0,2698	0,1307	b

3.2.2.3 Totale biomassa

Tabel 20 geeft de gemiddelde hoeveelheid biomassa weer in gram die geproduceerd wordt door *P. paneum* op de verschillende media en op de verschillende meettijdstippen, alsook de bijhorende standaarddeviatie. In de laatste kolom worden de significante verschillen tussen de media weergegeven.

De totale hoeveelheid geproduceerde biomassa door *P. paneum* verschilt significant tussen de twee media, waarbij sterkere groei vastgesteld werd bij lagere zuurconcentraties.

Tabel 20: Significante verschillen tussen de verschillende media in hoeveelheid biomassa van *P. paneum* (PP).

Isolaat	Medium	Dagen	Gemiddelde hoeveelheid biomassa (g)	St. dev.	Sign. verschil tussen media
PP	1	3	0,1493	0,0489	a
PP	2	3	0,0000	0,0000	b
PP	1	6	1,6851	0,2059	a
PP	2	6	0,0000	0,0000	b
PP	1	9	2,7155	0,4597	a
PP	2	9	0,0734	0,0566	b
PP	1	12	2,5895	0,0920	a
PP	2	12	0,0926	0,0287	b
PP	1	15	2,6662	0,6079	a
PP	2	15	0,3386	0,1302	b

3.2.2.4 Correlatie tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium

In tabel 21 wordt de correlatie nagegaan tussen de geproduceerde hoeveelheid sporen en mycelium door *P. paneum*.

Na 3 dagen kon er geen correlatie tussen sporen en mycelium berekend worden daar er nog geen sporulatie was van *P. paneum*. Voor de andere dagen is de p-waarde overal kleiner dan 0,05 waardoor er met 95% zekerheid besloten kan worden dat er een significante correlatie is tussen de hoeveelheid sporen en mycelium. Dit verband is overal positief en wordt weergegeven door de Pearson-correlatiecoëfficiënten r in tabel 21.

Tabel 21: Correlatie tussen sporen en mycelium van *P. paneum*.

Dagen	p-waarde	r
3	/	/
6	0,001	0,980
9	0,001	0,971
12	0,010	0,916
15	0,017	0,893

3.2.3 Besluit

Uit de resultaten blijkt dat op media met hogere gehalten aan melkzuur en azijnzuur de groei van *P. paneum* reeds startte na 6 dagen, terwijl *P. roqueforti* s.s. pas begon te groeien na 9 dagen. De sporenproductie begon hier pas na 12 dagen na inoculatie.

Voor de beide schimmels geldt dat zowel de sporenproductie als de hoeveelheid mycelium en de hoeveelheid totale biomassa geremd wordt door de hogere gehalten aan melkzuur en azijnzuur in het medium. Er werd voor zowel *P. roqueforti* s.s. als voor *P. paneum* een positieve correlatie bekomen tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium dat geproduceerd werd.

Uit de literatuurstudie is gebleken dat *P. paneum* sneller groeit dan *P. roqueforti* s.s. (O'Brien et al., 2008) wat bevestigd kan worden uit de resultaten. Volgens Auerbach (2006) kan *P. roqueforti* s.l. zich, in vergelijking met andere schimmels, nog goed ontwikkelen op media die hogere concentraties bevatten aan organische zuren zoals melkzuur en azijnzuur. Een verklaring voor de vertraagde groei op media met hoge gehalten aan organische zuren werd gegeven door Vivier et al. (1992). Zij stelden dat azijnzuur, en tot op een zekere hoogte ook melkzuur, de groei inhiberen van *Penicillium roqueforti* s.l. bij een pH van de omgeving die lager is dan de intercellulaire pH en dit als een gevolg van de ophoping van de zuren in het mycelium. Wanneer de interne pH dan gelijk is aan de pH van de omgeving, kunnen deze zuren gebruikt worden als voedingsbron. Dit wijst er op dat deze schimmels de zuren als een verdere koolstofbron kunnen gebruiken (Frisvad & Samson, 2004) voor hun groei.

3.3 Methode-ontwikkeling voor de bepaling van roquefortine C

De methode-ontwikkeling voor de kwantitatieve bepaling van roquefortine C in de stalen bekomen bij de twee experimenten bestaat uit twee stappen.

De eerste stap is de methode-ontwikkeling zelf. Deze bestaat op zijn beurt opnieuw uit twee delen. Het eerste deel van de ontwikkeling bestaat erin om een methode te ontwikkelen om roquefortine C te kunnen detecteren in een standaard-milieu, namelijk in een substantie waaraan enkel roquefortine C werd toegevoegd en waar geen andere elementen inzitten die voor eventuele pieken in het chromatogram kunnen zorgen. Dit noemt men het *substance level*. Het tweede deel omvat dan de bepaling van roquefortine C in een matrix (analoog aan de stalen bekomen in de uitgevoerde experimenten) en wordt methode-ontwikkeling op *product level* genoemd.

De tweede stap is de methode validatie. Hier zal de methode gevalideerd worden door het testen van de lineariteit, de nauwkeurigheid en de accuraatheid van het systeem.

3.3.1 Stap 1: Methode-ontwikkeling

3.3.1.1 Substance level

De start voor de ontwikkeling van UHPLC voor de kwantificatie van roquefortine C is gebaseerd op een methode van Oskar Tropitzsch (2009). De parameters van deze “standaardmethode” worden geoptimaliseerd door middel van trial-and-error analyses om uiteindelijk een goede scheiding te bekomen van roquefortine C.

Tabel 22: Parameters in de methode voor de kwantificatie van roquefortine C (Tropitzsch, 2009).

Oplosmiddel:		MeOH				
Concentratie ROQ C oplossing:		10 mg/20 mL = 500 mg/L = 500 ppm				
Kolom:		Phenomenex Kinetex C18, 2,1 mm ID x 150 mm, 2,6 µm deeltjesgrootte				
Pre-kolom:		Phenomenex Security Guard C18 voor 2,1 mm ID kolommen				
Kolomtemperatuur:		30 °C				
Mobiele fase:		A: ACN				
		B: milli Q				
Gradiënt:	Tijd (min)	1 (eq)	25	5	0,1	4,9
	%A	30	100	100	30	30
	%B	70	0	0	70	70
Injectievolume:		1 µL				
Debiet:		0,4 mL/min				
Autosampler temperatuur:		4 °C				
Detectie:		330 nm				

De parameters in het groen weergegeven in tabel 22 worden gevarieerd. Hieronder worden de verschillende parameters besproken.

- Oplosmiddel selectie

Als oplosmiddel wordt er gebruik gemaakt van methanol. Uit de literatuur (Sigma-Aldrich, 2015) blijkt dat roquefortine C hier goed in oplost.

- Kolomselectie

Een standaard kolomtype (150 mm) Phenomenex Kinetex C18 met een interne diameter van 2,1 mm en een partikelgrootte van 2,6 μm wordt gebruikt (Tropitzsch, 2009).

Een pre-kolom Phenomenex Security Guard C18 met een interne diameter van 2,1 mm wordt gebruikt (Tropitzsch, 2009).

- Kolom en autosample temperatuur selectie

De kolomtemperatuur bedraagt 30 ± 5 °C (Tropitzsch, 2009).

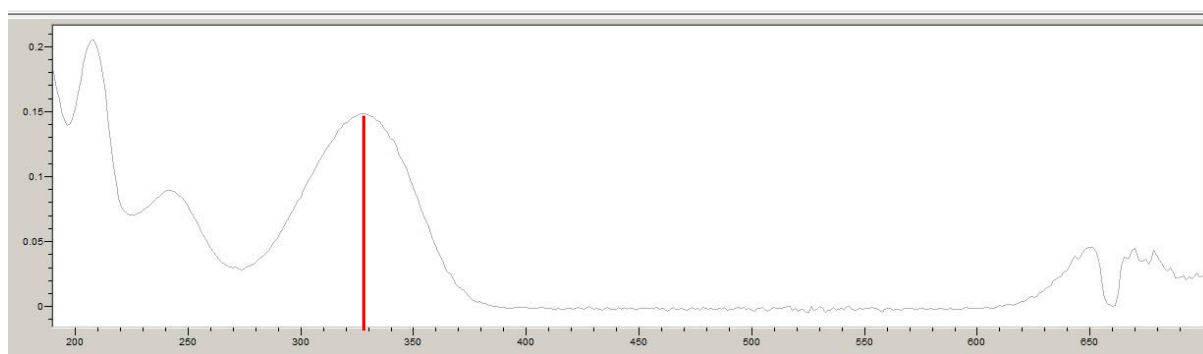
De temperatuur van de stalen bedraagt 4 ± 5 °C (Tropitzsch, 2009). Omdat roquefortine C onstabiel is bij kamertemperatuur werd er voor een zo laag mogelijke temperatuur gekozen.

- Debiet selectie

Deze parameter werd ingesteld op 0,4 mL/min en werd niet gevarieerd tijdens de ontwikkeling.

- Golflengte selectie

Figuur 13 geeft het absorptiespectrum weer van roquefortine C.

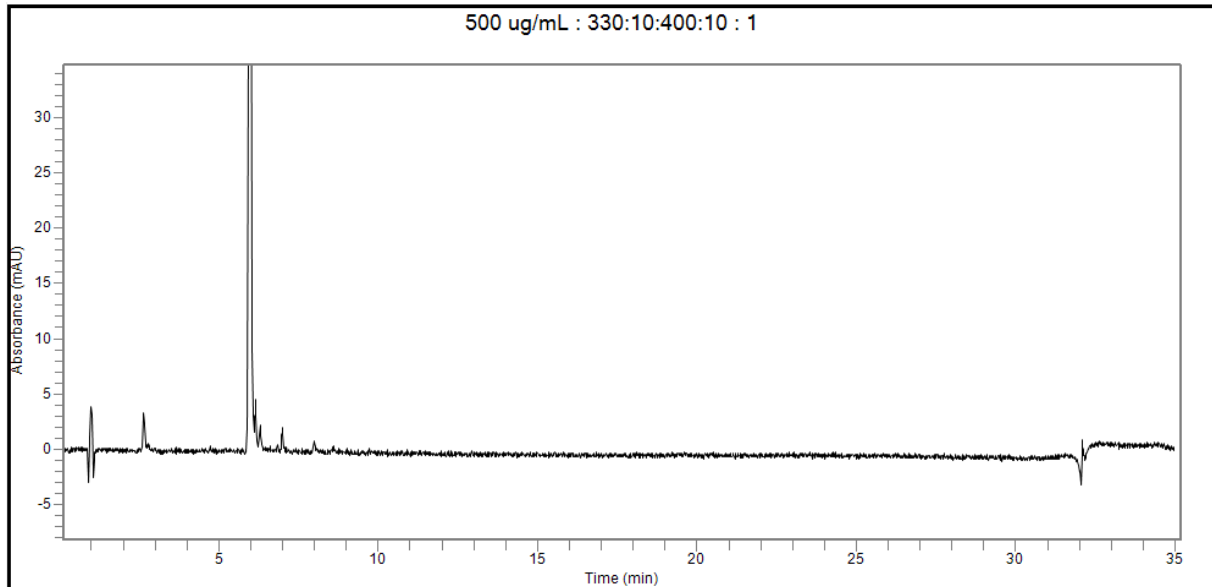


Figuur 13: Absorptiespectrum ROQ C (x-as: golflengte (nm); y-as: absorptie (Au), met 1 Au = 1 absorptie unit).

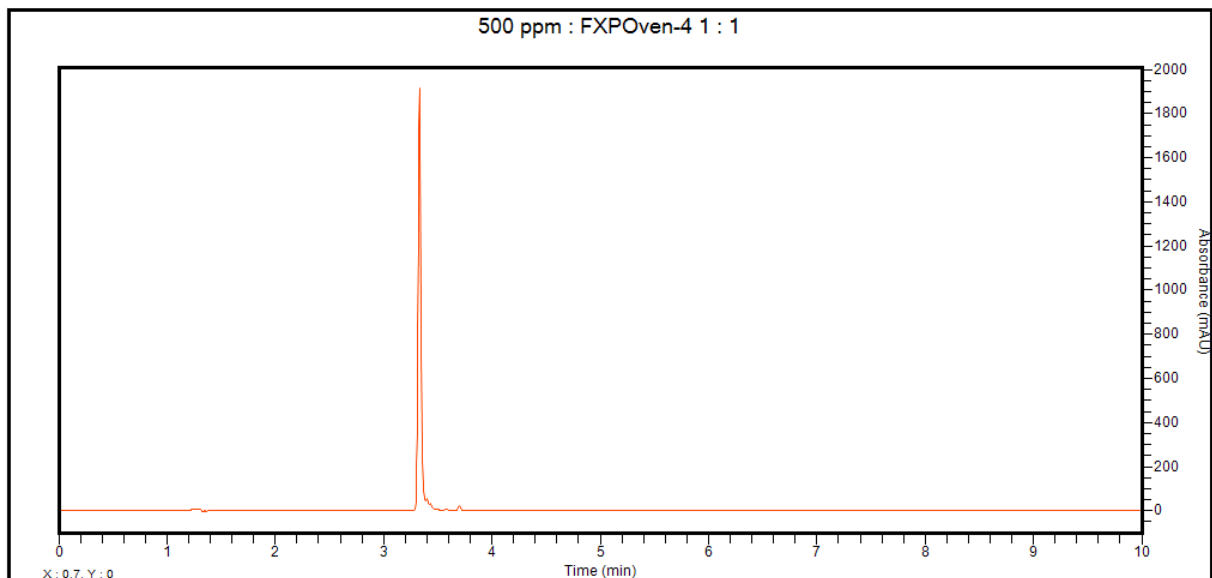
De detector werd ingesteld op 330 nm. Figuur 13 bevestigt maximale absorptie van roquefortine C op 330 nm.

- Gradiënt selectie

In figuur 14 en figuur 15 zijn respectievelijk het eerste en het finale chromatogram weergegeven. Met het chromatogram uit figuur 15 werd er een kortere runtijd bereikt en een betere scheiding bekomen van de onzuiverheden en roquefortine C.



Figuur 14: Gradiëntselectie – methode Tropitzsch.



Figuur 15: Gradiëntselectie – geoptimaliseerde methode.

In tabel 23 is de uiteindelijke gradiënt weergegeven die overeenkomt met het chromatogram uit figuur 15.

Tabel 23: Gradiënt voor de geoptimaliseerde methode.

Gradient:	Time (min)	1 (eq)	4	0,1	2,9	0,1	0,9
	% A	40	80	100	100	40	40
	% B	60	20	0	0	60	60

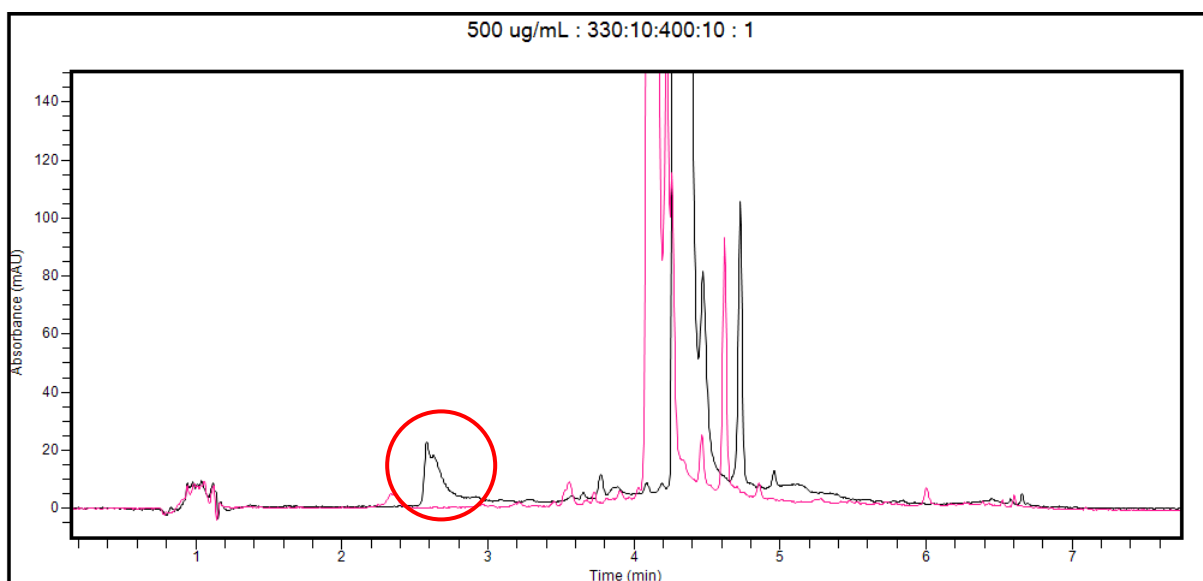
- Mobiele fase selectie

Lijn A: ACN (acetonitrile), deze parameter werd niet gevarieerd tijdens de methode-ontwikkeling

Lijn B: milli Q werd veranderd naar 10 mM ammoniumacetaat (NH₄Ac) + azijnzuur (AcAc) tot een pH van 5,6 bereikt werd.

In figuur 16 is het chromatogram weergegeven voor de parameter 'mobiele fase'. Het roze chromatogram is dit voor NH₄Ac en het zwarte chromatogram voor milli Q als mobiele fase.

De piek binnen de rode cirkel in figuur 16 was niet aanwezig bij gebruik van ammoniumacetaat. Vermoedelijk was deze piek een geprotoneerde/gedeprotoneerde vorm van roquefortine C en is deze afwezig bij een lagere pH. Door de mobiele fase te veranderen naar NH₄Ac werd ook een betere piekscheiding bekomen.

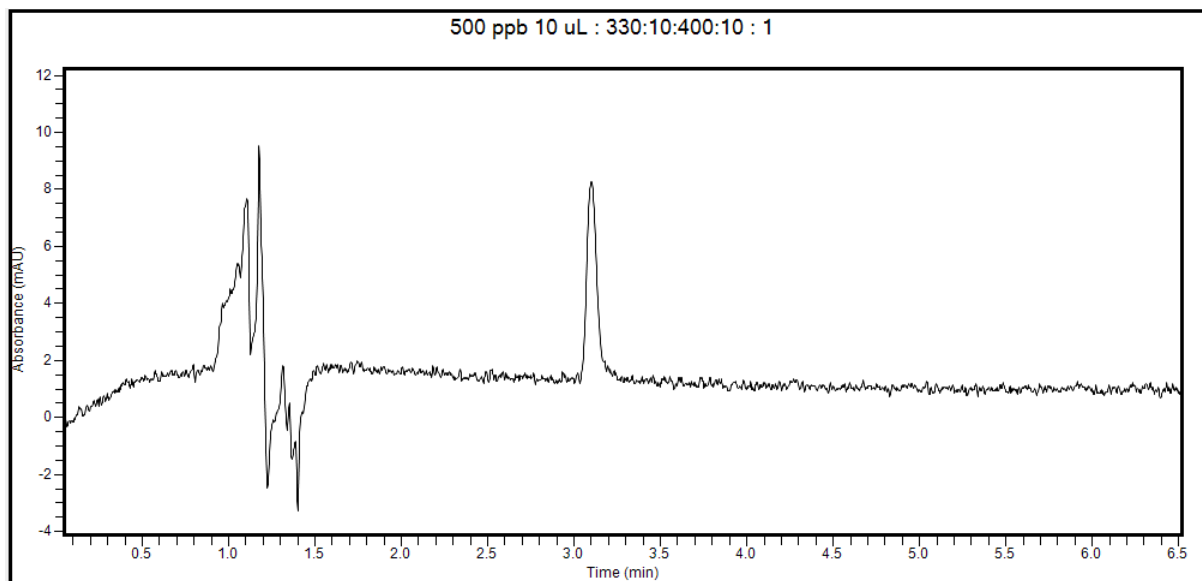


Figuur 16: Chromatogram mobiele fase.

- Concentratie selectie / injectievolume

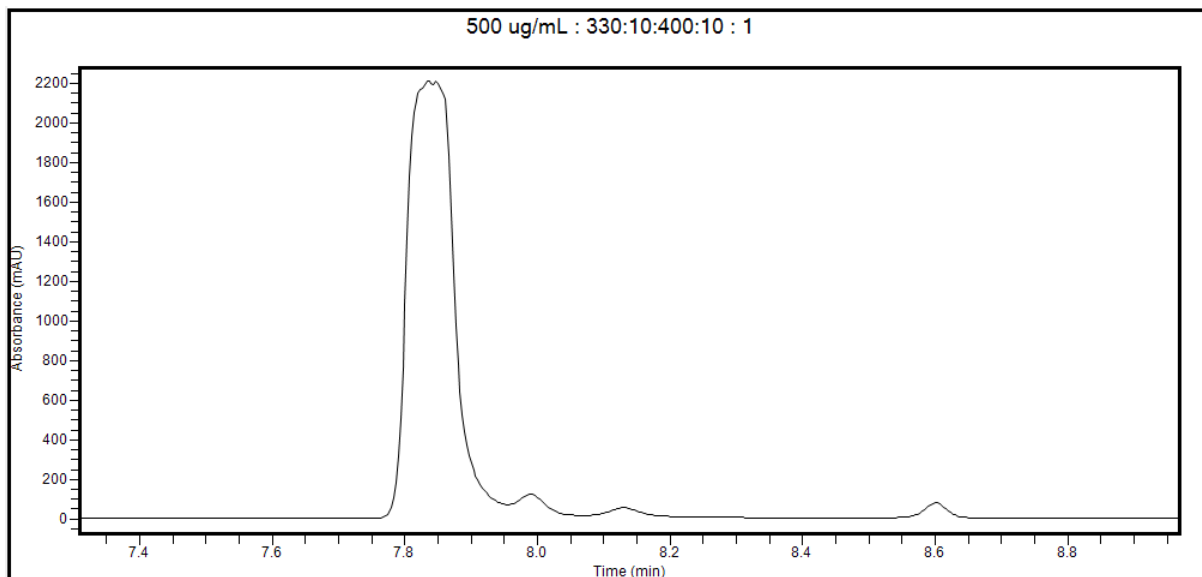
Het injectievolume werd uiteindelijk vastgelegd op 10 µL. Voor de concentratie van de roquefortine C oplossing werd de ondergrens vastgelegd op 500 ppb, wat overeenkomt met 0,5 ppm. In figuur 17 is het chromatogram weergegeven voor een injectievolume van 10 µL

en een concentratie van 500 ppb. De piek in het chromatogram is een Gaussiaanse piek waarbij de Limit of Quantification (dit is 10 keer de signaal/ruis verhouding) wordt behaald.



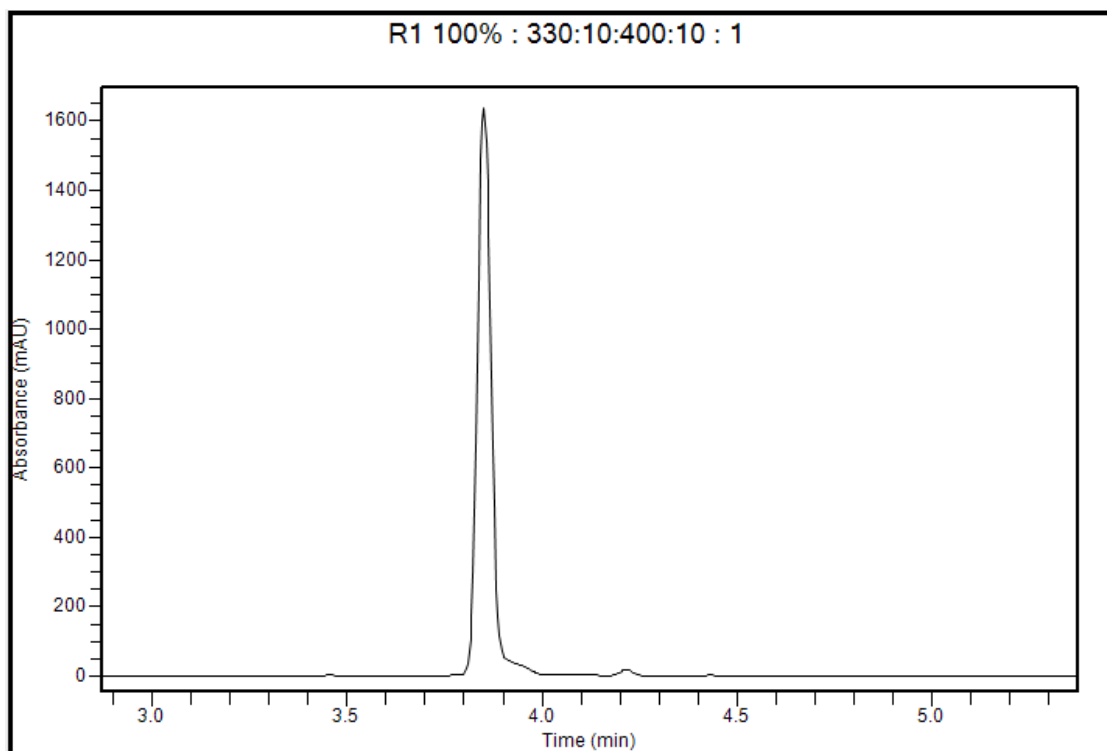
Figuur 17: Chromatogram (injectievolumen: 10 μ L; concentratie: 500 ppb).

In figuur 18 is het chromatogram weergegeven voor een injectievolumen van 10 μ L en een concentratie van 500 ppm. Dit chromatogram heeft een slechte piekvorm (een afplattung van de top) waardoor een verlaging van de concentratie noodzakelijk is.



Figuur 18: Chromatogram (injectievolumen: 10 μ L; concentratie: 500 ppm).

De bovengrens van de concentratie wordt uiteindelijk vastgelegd op 100 ppm. Dit chromatogram is weergegeven in figuur 19. De piekvorm is hier beter dan bij een concentratie van 500 ppm; er is namelijk geen afplattung van de top en de curve vertoont een Gaussiaanse vorm.



Figuur 19: Chromatogram (injectievolume: 10 μ L; concentratie: 100 ppm).

- Finale methode

De finale methode zoals weergegeven in tabel 24 zal worden gevalideerd.

Tabel 24: Parameters in de finale methode voor de kwantificatie van roquefortine C.

Oplosmiddel:		MeOH					
Concentratie ROQ C oplossing:		Range: 500 ppb - 100 ppm					
Kolom:		Phenomenex Kinetex C18, 2,1 mm ID x 150 mm, 2,6 μ m deeltjesgrootte					
Pre-kolom:		Phenomenex Security Guard C18 voor 2,1 mm ID kolommen					
Kolomtemperatuur:		30 °C					
Mobiele fase:		A: ACN					
		B: NH ₄ Ac + AcAc					
Gradiënt:	Tijd (min)	1 (eq)	4	0,1	2,9	0,1	0,9
	%A	40	80	100	100	40	40
	%B	60	20	0	0	60	60
Injectievolume:		10 μ L					
Debiet:		0,4 mL/min					
Autosampler temperatuur:		4 °C					
Detectie:		330 nm					

3.3.1.2 Product level

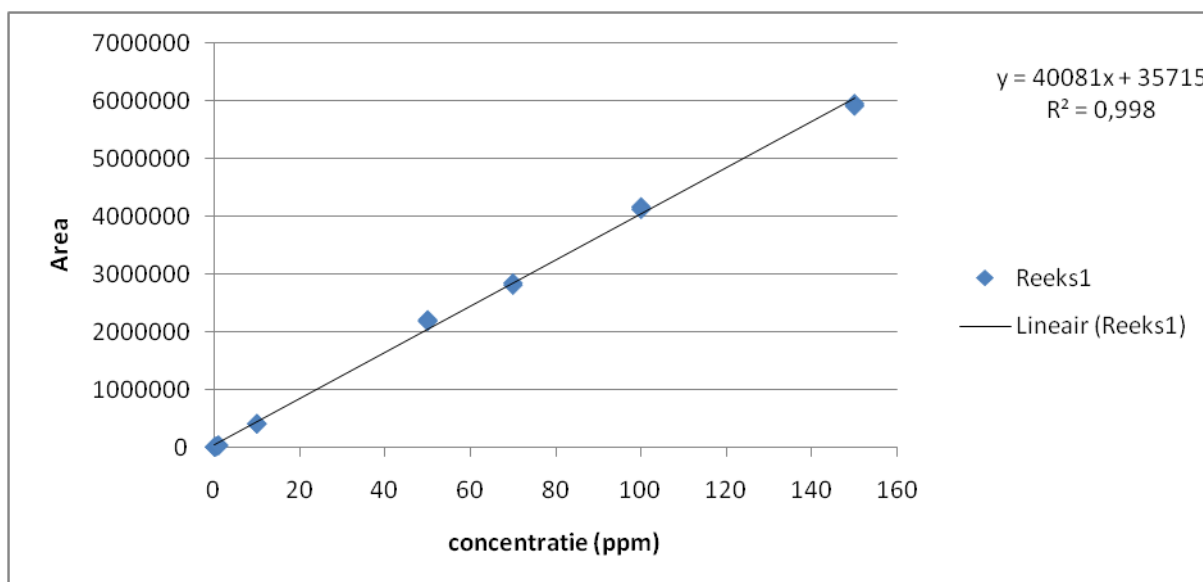
Deze analyses zullen in de toekomst uitgevoerd worden.

3.3.2 Stap 2: Methode validatie

De methode uit tabel 24 zal worden gevalideerd door het controleren van de lineariteit, de nauwkeurigheid en de accuraatheid van het systeem (Yin, 2011).

- Lineariteit

De lineariteit moet gecontroleerd worden omdat er in de toekomst gewerkt zal worden met een kalibratielij. Voordat een kalibratielij gebruikt mag worden moet er nagegaan worden of er een lineair verband is tussen de concentratie van de gemeten standaarden en de bijhorende respons. Hiervoor dienen er minstens 5 verschillende concentraties getest te worden. De kalibratielij wordt weergegeven in figuur 20. De kalibratielij zal slechts lineair zijn indien de correlatiecoëfficiënt R^2 groter of gelijk is aan 0,995. Aangezien $R^2 = 0,998$ is het criterium aanvaard en bijgevolg is de lineariteit aangetoond.



Figuur 20: Lineariteitsrechte.

- Precisie – nauwkeurigheid

Om de precisie te bepalen, dient er 5 keer een staal met dezelfde concentratie geïnjecteerd te worden. Vervolgens moeten de standaarddeviatie en het relatieve standaard afwijgingspercentage (RSD%) bepaald worden. De precisie is weergegeven in tabel 25. Indien het RSD% kleiner is dan 2%, zal het criterium aanvaard worden.

Tabel 25: Precisie.

ppm	Area	Gemiddelde	Stdev	RSD%
100	3959411	3935618	65885	1,67407
100	3994484			
100	3967091			
100	3932535			
100	3824568			

Het RSD% bedraagt 1,67407 en is dus kleiner dan 2%. De systeemnauwkeurigheid is bijgevolg ook aangetoond.

- Accuraatheid

Om de accuraatheid te bepalen, dient er een staal met gekende concentratie gekwantificeerd te worden ten opzichte van de kalibratiecurve die opgesteld werd via lineariteit. Hieruit kan dan het recovery-percentages bepaald worden. Recovery is de verhouding van de gemeten concentratie ten opzichte van de werkelijke concentratie. Indien de accuraatheid niet goed is, kan dit te wijten zijn aan de methode die niet goed is of aan de verdunning die niet goed werd aangemaakt. De accuraatheid wordt weergegeven in tabel 26. De theoretische concentratie van de oplossing is 100 ppm die werd aangemaakt en tweemaal werd geïnjecteerd.

Tabel 26: Accuraatheid.

Conc gemeten (ppm)	Recovery (%)
110,0	110
107,8	107,8

Het recovery-percentages ligt binnen de limiet 90-110 % en is dus net aanvaardbaar. Aangezien het maar net binnen de limiet ligt, zal de accuraatheidsbepaling in de toekomst ook nog eens herhaald worden.

4. Besluit

Het doel van dit onderzoek was enerzijds het bepalen van het effect van stikstof en azijnzuur op de groei van *Penicillium roqueforti* s.l. Anderzijds werd er een methode ontwikkeld om tot een kwantitatieve bepaling te komen van het mycotoxine roquefortine C dat door *P. roqueforti* s.l. geproduceerd wordt.

Om het effect van stikstof op *P. roqueforti* s.l. te bepalen, werden er vier media getest met verschillende gehalten aan organische en anorganische stikstof. Er werden twee schimmelisolaten getest: *P. roqueforti* s.s. MUCL 46746 en *P. paneum* CBS 112295. De groei van deze schimmels werd gedurende 15 dagen om de drie dagen opgevolgd. Voor zowel *P. roqueforti* s.s. als *P. paneum* kon er bij een laag gehalte aan organische stikstof in het medium een significant verminderde groei worden vastgesteld. Bij *P. paneum* kwam dit tot uiting in de hoeveelheid sporen, mycelium en de totale biomassa die geproduceerd werden. Verder werd er een negatieve correlatie vastgesteld tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium. Bij *P. roqueforti* s.s. werd er enkel een significant verschil vastgesteld tussen de verschillende media voor de hoeveelheid mycelium en de totale biomassa. Bij deze schimmel werd er daarenboven geen duidelijke correlatie vastgesteld tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium.

Om het effect van azijnzuur op *P. roqueforti* s.l. te bepalen, werden er twee media getest met verschillende gehalten aan melkzuur en azijnzuur. Deze media werden eveneens geïnoculeerd met de isolaten *P. roqueforti* s.s. MUCL 46746 en *P. paneum* CBS 112295 en gedurende 15 dagen om de drie dagen opgevolgd. Na een statistische analyse kon er besloten worden dat zowel *P. roqueforti* s.s. als *P. paneum* worden geremd door de hogere gehalten aan melkzuur en azijnzuur in het medium. Voor beide schimmels kwam dit tot uiting in de hoeveelheid sporen, mycelium en totale biomassa die geproduceerd werden. Voor de beide isolaten werd bovendien een positieve correlatie bekomen tussen de hoeveelheid sporen en de hoeveelheid mycelium.

De methode voor de kwantitatieve bepaling van roquefortine C werd op *substance level* ontwikkeld en gevalideerd. Vooraleer er effectief stalen zullen worden gemeten, dient de methode nog getest en mogelijks geoptimaliseerd te worden op *product level* en dient de methode gevalideerd te worden.

Referentielijst

- Adesogan, A.T., Krueger, N., Salawu, M.B., Dean, D.B. & Staples, C.R. (2004). The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. *Journal of Dairy Sciences*, 87, pp. 3407-3416.
- Aleksandrov, M. (1986). The mycoflora of corn silage. *Veterinarno-meditinski Nauki*, 23, 9, pp. 57-60.
- Ali, H., Ries, M.I., Nijland, J.G., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Vreeken, R.J. & Driesen, A.J.M. (2013). A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS ONE*, 8, 6, pp. 1-12.
- Alonso, V.A., Pereyra, C.M., Keller, L.A.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M. & Cavaglieri, L.R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115, pp. 637-643.
- Auerbach, H. (2006). Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions. Geraadpleegd op 1 december op <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm>
- Auerbach, H., Oldenburg, E. & Weissbach, F. (1998). Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 76, 4, pp. 565-572.
- Berge A.C. (2011). *Penicillium* moulds in silage. How they affect rumen health. *Dairy Solutions Newsletter*, issue 7.
- Boysen, M.E., Jacobsson, K. & Schnürer, J. (2000). Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4, pp. 1523-1526.
- Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J. & Rossen, L. (1996). Reclassification of the *Penicillium roqueforti* Group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology*, 142, pp. 541-549.
- Bruins, W.J. (1989). Effect droge-stofgehalte en soort toevoegmiddel bij kuilvoer. *Praktijkonderzoek Rundvee, Schapen en Paarden*, 2, 5, pp. 7-9.
- Carmichael, J.W. (1963). Dried mold colonies on cellophane. *Mycologia*, 55, nr. 3, pp. 283-288.
- Chamberlain, D.G. & Robertson, S. (1992). The effects of the addition of various enzyme mixtures on the fermentation of perennial ryegrass silage on its nutritional value for milk production in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 37, 3-4, pp. 257-264.

- Cheli, F., Campagnoli, A. & Dell'Orto, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183, pp. 1-16.
- Chen, J., Stokes, M.R. & Wallace, C.R. (1994). Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silages. *Journal of Dairy Science*, 77, pp. 501-512.
- Conaghan, P., O'Kiely, P. & O'Mara, F.P. (2010). Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. *Journal of Dairy Science*, 93, 2, pp. 628-643.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E. & Braun, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1, pp. 562-567.
- Damoglou, A. P., Shannon, W. & Downey, G. A. (1984). The interaction between fusaria and their mycotoxins in grass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 3, pp. 279-284.
- De Brabander, D. (2014). *Melkveevoeding* [cursus]. Universiteit Gent. Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen.
- De Doncker, K. (2013). *Analytische chemie: Chemische analyse en instrumentele analyse* [cursus]. Universiteit Gent. Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen.
- Ding, S., Schoenmakers, I., Jones, K., Koulman, A., Prentice, A. & Volmer, D.A. (2010). Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, pp. 779-789.
- Dinić, B., Dordević, N., Andelković, B., Sokolović, D. & Terzić, D. (2010). Management of fermentation process in ensilaged livestock feed. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 26, 1-2, pp. 105-115.
- Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. & Spoelstra, S.F. (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, 87, pp. 583-594.
- Driehuis, F. & Oude Elferink, S.J.W.H. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quarterly*, 22, 4, pp. 212-217.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. & te Giffel, M.C. (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science*, 91, 11, pp. 4261-4271.
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 22, pp. 16-34.

- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I. & Thévenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed and Technology*, 182, pp. 1-15.
- El-Shanawany, A.A., Mostafa, E. & Barakat, A. (2005). Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic Aspergilli toxins. *Mycopathologica*, 159, pp. 281-289.
- Engel, G. & Teuber, M. (1978). Simple aid for the identification of *Penicillium roqueforti* Thom. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, 1, pp. 107-111.
- Engel, G., Von Milczewski, K.E., Prokopek, D. & Teuber, M. (1982). Strain-specific synthesis of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 5, pp. 1034-1040.
- Filya, I. & Sucu, E. (2010). The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass and Forage Science*, 65, pp. 446-455.
- Filya, I., Sucu, E. & Karabulut, A. (2006). The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology*, 101, pp. 1216-1223.
- Fink-Gremmels, J. (2003). Kleurenwaaier aan schimmels. *Veeteelt*, 2, pp. 12-15.
- Fink-Gremmels, J. (2008a). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176, pp. 84-92.
- Fink-Gremmels, J. (2008b). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25, 2, pp. 172-180.
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A. & Dragoni, I. (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *Journal of Food Protection*, 2, pp. 147-276, pp. 246-251.
- Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., Romero-González, R., del Mar Aguilera-Luiz, M. (2009). Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 117, 4, pp. 705-712.
- Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (1989). Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81, 6, pp. 837-861.
- Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, pp. 1-174.
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A. & Pitt, J.I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, pp. 3-31.

- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D. & Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 3479-3484.
- Givens, D.I. & Rulquin, H. (2004). Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 114, pp. 1-18.
- González Pereyra, M.L., Alonso, V.A., Sager, R., Morlaco, M.B., Magnoli, C.E, Astoreca, A.L., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A.M. & cavaglieri, L.R. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 4, pp. 1034-1041.
- Gordon, F.J. (1989). A further study on the evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculants as an additive for grass silage. *Grass and Forage Science*, 44, 3, pp. 353-357.
- Gunner, H.B. & Alexander, M. (1964). Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Bacteriology*, 87, 6, pp. 1309-1316.
- Haesaert, G. (2014). *Gewasbescherming*. [Cursus]. Universiteit Gent. Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen.
- Hägglblom, P. (1990). Isolation of roquefortine C from feed grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 9, pp. 2924-2926.
- Henderson, N. (1993). Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*, 45, 1, pp. 35-56.
- Higginbotham, G.E., Mueller, S.C., Bolsen, K.K. & DePeters, E.J. (1998). Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 81, 8, pp. 2185-2192.
- Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H. & Braun, R. (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *TRENDS in Biotechnology*, 21, 6, pp. 282-287.
- Huisden, C.M., Adesogan, A.T., Kim, S.C. & Ososanya, T. (2009). Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 92, 2, pp. 690-697.
- Hussein, H.S. & Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, pp. 101-134.
- Jimenez, M., Sanchis, V., Santamarina, P. & Hernandez, E. (1985). *Penicillium* in pre-harvest corn from Valencia (Spain), Influence of different factors on the contamination. *Mycopathologia*, 92, 1, pp. 53-57.

- Jonsson, A., Lindberg, H., Sundas, S., Lingvall, P. & Lindgren, S. (1990). Effect of additives on the quality of big-bale silage. *Animal Feed Science and Technology*, 31, 1-2, pp. 139-155.
- Keles, G. & Yazgan, O. (2011). Fermentation characteristics of maize silages ensiled with lactic acid bacteria and the effect of inoculated baled maize silages on lamb performance. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 2, pp. 229-234.
- Keller, L.A.M., González Pereyra, M.L., Keller, K.M., Alonso, V.A., Oliviera, A.A., Almeida, T.X., Barbosa, T.S., Nunes, L.M.T., Cavaglieri, L.R. & Rosa, C.A.R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52, pp. 42-47.
- Kleinschmit, D.H. & Kung, L.Jr. (2006). A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science*, 89, 10, pp. 4005-4013.
- Kleinschmit, D.H., Schmidt, R.J. & Kung, L.Jr. (2005). The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 88, 6, pp. 2130-2139.
- Knicky, M. & Lingvall, P. (2004). Ensiling of high wilted grass-clover mixture by use of different additives to improve quality. *Journal of Animal Science*, 54, pp. 197-205.
- Kokkonen, M., Jestoi, M. & Rizzo, A. (2005). The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 99, pp. 207-214.
- Kopp-Holtwiesche, B. & Rehm, H.J. (1990). Antimicrobial action of roquefortine. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 10, 1-2, pp. 41-44.
- Kopp, B. & Rehm, H.J. (1979). Antimicrobial action of roquefortine. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, 4, pp. 397-401.
- Korosteleva, S.N., Smith, T.K. & Boermans, H.J. (2009). Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 4, pp. 1585-1593.
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teixeira, F., Mauriz, E. & Martín, J.F. (2009). The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, 9, 1, pp. 214-225.
- Kristensen, N.B., Sloth, K.H., Hojberg, O., Spliid, N.H., Jensen, C. & Thogersen, R. (2010). Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science*, 93, 8, pp. 3764-3774.

Kung, L. (2001). Silage fermentation & additives. *Direct-fed Microbial, Enzyme & Forage Additive Compendium*.

Kung, L.Jr., Chen, J.H., Kreck, E.M. & Knutsen, K. (1993). Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76, 12, pp. 3763- 3770.

Kung, L.Jr., Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Bessett, C.A., Ranjit, N.K. & Glancey, J.L. (1998). The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 81, 5, pp. 1322-1330.

Kung, L.Jr., Taylor, C.C., Lynch, M.P. & Neylon, J.M. (2003). The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 1, pp. 336-343.

Kurtzman, C.P. & Ciegler, A. (1970). Mycotoxin from a blue-eye mold of corn. *Applied Microbiology*, 20, 2, pp. 204-207.

Latré, J., Haesaert, G. & Derycke, V. (1999). Het gebruik van bewaarmiddelen bij het inkuilen van gras. *Brochure LCV – Gras: van veld tot voer*, pp. 61-69.

Lawrence, R.C. & Hawke, J.C. (1968). The oxidation of fatty acids by mycelium of *Penicillium roqueforti*. *Journal of General Microbiology*, 51, pp. 289-302.

Li, Y., Wadsö, L. & Larsson, L. (2009). Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti* – correlations between produced heat, ergosterol content and biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp. 1494-1501.

Magan, N., Hope, R., Cairns, V. & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109, pp. 723-730.

Mansfield, M.A., Jones, A.D. & Kuldau, G.A. (2008). Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology*, 98, 3, pp. 330-336.

Mansfield, M.A. & Kuldau, G.A. (2007). Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia*, 99, 2, pp. 269-278.

Marin, S., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I. & Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 84, pp. 25-36.

Mc Eniry, J., O’Kiely, P., Clipson, N.J.W., Forristal, P.D. & Doyle, E.M. (2007). Manipulating the ensilage of wilted, unchopped grass through the use of additive treatments. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 46, pp. 77-91.

- Melo dos Santos, V., Dorner, J.W. & Carreira, F. (2002). Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigates* from moldy silage. *Mycopathologia*, 156, pp. 133-138.
- Miller, J.D. (2008). Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants*, 25, 2, pp. 219-230.
- Mohd-Setapar, S.H., Abd-Talib, N. & Aziz, R. (2012). Review on crucial parameters of silage quality. *APCBEE Procedia*, 3, pp. 99-103.
- Moon, N.J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 3, pp. 453-460.
- Moreau, C. (1980). Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. (Révision bibliographique). *Le Lait*, 60 (595-596), pp. 254-271.
- Morgavi, D.P. & Riley, R.T. (2007). An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 137, pp. 201-212.
- Muck, R.E. (2002). Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *The Society for Engineering in agricultural, food, and biological systems*.
- Munkvold, G.P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Phytopathology*, 41, pp. 99-116.
- Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C. & Miller, J.D. (2006). Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10, pp. 3756-3763.
- Nkosi, B.D., Meeske, R., Palic, D. & Langa, T. (2009). Laboratory evaluation of an inoculant for ensiling whole crop maize in South Africa. *Animal Feed Science and Technology*, 150, pp. 144-150.
- Noroozian, E., Lagerwerf, F., Lingeman, H., Brinkman, U.A.TH. & Kerkhoff, M.A.T. (1998). Determination of roquefortine C in blue cheese using on-line column-switching liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, pp. 1215-1223.
- Nout, M.J.R., Bouwmeester, H.M., Haaksma, J. & Van Dijk, H. (1993). Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *The Journal of Agricultural Science*, 121, 3, pp. 323-326.
- O'Brien, M., Egan, D., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Doohan, F.M. & Fuller, H.T. (2008). Morphological and molecular characterization of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycological Research*, 112, pp. 921-932.

- O'Brien, M., Nielsen, K.F., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T. & Frisvad, J. (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 24, pp. 9268- 9276.
- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P.D. & Fuller, H.T. (2005). Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *FEMS Microbiology Letters*, 247, pp. 131-135.
- Olivigni, F.J. & Bullerman, L.B. (1977). Simultaneous production of penicillic acid and patulin by a *Penicillium* species isolated from cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 42, 6, pp. 1654-1657.
- Overy, D.P., Nielsen, K.F. & Smedsgaard, J. (2005). Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium ser. Corymbifera*: in planta production and implications for competitive fitness. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 10, pp. 2373-2390.
- Ozduven, M.L., Kursun Onal, Z. & Koc, F. (2010). The effects of bacterial inoculants and/or enzymes on the fermentation, aerobic stability and in vitro dry and organic matter digestibility characteristics of triticale silages. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 5, pp. 751-756.
- Pelhate, J. (1977). Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Veterinaria Latina*, 7, 1, pp. 1-16.
- Phillip, L.E. & Fellner, V. (1992). Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. *Journal of Animal Science*, 70, pp. 3178-3187.
- Pitt, J.I. (2002). Biology and Ecology of Toxigenic *Penicillium* Species. *Mycotoxins and Food Safety: Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504, pp. 29-41.
- Rasmussen, R.R., Storm, I.M.L.D., Rasmussen, P.H., Smedsgaard, J. & Nielsen, K.F. (2010). Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2, pp. 765-776.
- Richard, D.J., Schiavi, B. & Joullié, M.M. (2004). Synthetic studies of roquefortine C: Synthesis of isoroquefortine C and a heterocycle. *PNAS*, 101, 33, pp. 11971-11976.
- Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V. & Garon, D. (2009). Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 148, pp. 309-320.
- Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P. & Frisvad, J.C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology*, 49, pp. 175-200.

Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S. & Bauer, J. (2000). Mycophenolic acid in silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp. 3639-3641.

Scott, P.M., Kennedy, B.P.C., Harwig, J. & Blanchfield, B.J. (1977). Study of conditions for production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roqueforti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 2, pp. 249-253.

Scott, P.M., Polonsky, J. & Merrien, M.A. (1979). Configuration of the 3,12 double bond of roquefortine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1, pp. 201-202.

Scudamore, K.A. & Livesey, C.T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, pp. 1-17.

Sheperd, A.C. & Kung, L.Jr. (1996a). An enzyme additive for corn silage: effects on silage composition and animal performance. *Journal of Dairy Science*, 79, 10, pp. 1760-1766.

Sheperd, A.C. & Kung, L.Jr. (1996b). Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. *Journal of Dairy Science*, 79, 10, pp. 1767-1773.

Sigma-Aldrich (2015). Roquefortine C. Geraadpleegd op 24 april 2015 via

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0406>

Skouboe, P., Frisvad, J.C., Taylor, J.W., Lauritsen, D., Boysen, M. & Rossen, L. (1999). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research*, 103, 7, pp. 873-881.

Spoelstra, S.F. (1985). Nitrate in silage. *Grass and Forage Science*, 40, 1, pp. 1-11.

Steen, R.W.J., Unsworth, E.F., Gracey, H.I., Kennedy, S.J., Anderson, R. & Kilpatrick, D.J. (1989). Evaluation studies in the development of a commercial bacterial inoculant as an additive for grass silage. *Grass and Forage Science*, 44, 4, pp. 381-390.

Stokes, M.R. (1992). Effects of an enzyme mixture, an inoculants, and their interaction on silage fermentation and dairy production. *Journal of Dairy Science*, 75, 3, pp. 764-773.

Storm, I.M.L.D., Kristensen, N.B., Raun, B.M.L., Smedsgaard, J. & Thrane, U. (2010). Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology*, 109, pp. 1017-1026.

Sumarah, M.W., Miller, J.D. & Blackwell, B.A. (2005). Isolation and metabolite production by *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* and *P. crustosum* isolated in Canada. *Mycopathologia*, 159, pp. 571-577.

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & Fleet, G.H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 132, pp. 100-108.

- Te Giffel, M.C., Wagendorp, A., Herrewegh, A. & Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, pp. 625-630.
- Teller, R.S., Schmidt, R.J., Whitlow, L.W. & Kung, L.Jr. (2012). Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 95, 3, pp. 1428-1436.
- Tropitzsch, O. (2009). HPLC Conditions: Roquefortine C. Niet gepubliceerd document. (Leverancier aangekochte standaard)
- Vackier, J. (2002). Droge stof gehalte: zeer bepalend voor de voederkwaliteit van uw graskuill!. *Bovi Info, Quartes*, 1, pp. 4.
- Veldman, B., Blok, M.C., Hessing, M., De Keijzer, J., Maij, B., Margry, R.J.C.F., Mathot, P.J., Scholten, R. & De Vos, N.W. (2003). Mycotoxinen: Deskstudie naar de aanwezigheid en detectie van mycotoxinen in diervoedergrondstoffen. *Productschap Diervoeder*, 100, pp. 10-35.
- Verbeke, W. (2012). Graskracht, eindrapport. *Inverde*, pp.25-30.
- Vivier, D., Rivemale, M., Reverbel, J.P., Ratomahenina, R. & Galzy, P. (1992). Some observations on the physiology of *Penicillium roqueforti* Thom and *Penicillium cyclopium* Westling. *Le Lait*, 72, 3, pp. 277-283.
- Wagener, R.E., Davis, N.D. & Diener, U.L. (1980). Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, pp. 882-887.
- Wei, R., Still, P.E., Smalley, E.B., Schnoes, H.K. & Strong, F.M. (1973). Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Applied Microbiology*, 25, 1, pp. 111-114.
- Weinberg, Z.G. & Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13, pp. 181-188.
- Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y. & Azrieli, A. (1993). The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 6, pp. 512-518.
- Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Azrieli, A., Szakacs, G. & Filya, I. (2002). Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, pp. 7-11.
- Weinberg, Z.G. & Muck, R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 1, pp. 53-68.

Weinberg, Z.G., Szakacs, G., Ashbell, G. & Hen, Y. (1999). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *L. plantarum*, applied at ensiling, on the ensiling fermentation and aerobic stability of wheat and sorghum silages. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, pp. 218-222.

Williams, A.G. (1994). The permeability and porosity of grass silage as affected by dry matter. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 59, pp. 133-140.

Yiannikouris, A. & Jouany, J. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, pp. 81-99.

Yin, H. (2011). Method and Validation basics – HPLC case study. Geraadpleegd op 6 mei 2015 via
http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0CCcQFjAB&url=http%3A%2F%2Fapps.who.int%2Fprequal%2Ftrainingresources%2Fpq_press%2FTraining_PQAssessment-2011%2Fpresentations%2F2-4_Method-validation_HPLC-case-study.ppt&ei=BT9KVeDIFcOiyAPm04C4Aw&usg=AFQjCNGZDcaeXJ5kvzkvx5bQtjSKpC4YqA&sig2=_0Ytc67BL660yhGjDWFcLA