



Bruikbaarheid van non-destructieve detectie-technologieën voor routinematige inspecties

Willem Jan de Kogel¹, Hans Helsper¹, Henk Jalink², Roel Jansen², Gerrie Wieggers¹ & Peter van Deventer¹

¹ Plant Research International, Wageningen-UR

² Wageningen UR-Glastuinbouw

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Bio-Interacties en Plantgezondheid

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit onderzoek werd geïnitieerd door de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen en gefinancierd door het ministerie van LNV (project nummer 2008/008/1)

Plant Research International

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 69, 6700 AB Wageningen
Tel. : 0317 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting en aanbevelingen	1
Inleiding	5
Routinematige inspecties in de praktijk	5
Aanpak	6
Fase 1: Literatuuronderzoek.	7
Detectie van beeld.	7
State-of-the-art	7
Perspectievolle mogelijkheden	11
Slotconclusies	14
Relevante Literatuur	15
Detectie van geur	16
State-of-the-art	16
Perspectievolle mogelijkheden	17
Slotconclusies	21
Relevante Literatuur	21
Detectie van geluid	22
State-of-the-art	22
Perspectievolle mogelijkheden	22
Slotconclusies	24
Relevante Literatuur	24
Afsluitende discussie en conclusie uit het literatuuronderzoek	27
Fase 2: experimenteel onderzoek	29
Niet-invasieve detectie van (Q-)pathogenen op basis van vluchtige stoffen	29
Doelstelling	29
Gebruikte methoden	29
Resultaten	31
Conclusies en aanbevelingen	37
Detectie van larven in houtige materialen met akoestische en/of Doppler microwave scantechnieken (Termatrac).	38
Doelstelling	38
Gebruikte methoden	39
Conclusies en discussie	43
Detectie van boorgangen met Röntgenapparatuur.	44
Doelstelling	44
Röntgen & beeldverwerking	44
Materiaal en methoden	46
Resultaten	48
Discussie & conclusie	52
Literatuur	53
Aanbevelingen naar aanleiding van fase 2	53
Akoestische detectie insectenlarven	54
Röntgen detectie boorgangen	54

Samenvatting en aanbevelingen

Routinematige inspecties binnen het fyto-sanitaire domein vinden doorgaans plaats door middel van steekproefsgewijze visuele inspecties van de producten. Hierbij wordt gelet op de symptomen en/of aanwezigheid van schadelijke organismen volgens EG richtlijn 2000/29. De vraag is of hier een efficiëntie-/verbeteringsslag mogelijk is door invoering van non-destructieve technologieën die op snelle, goedkope en betrouwbare wijze de aanwezigheid van deze organismen verraden. Dit rapport geeft de bevindingen weer van een onderzoek naar dergelijke technologieën. Dit onderzoek is opgesplitst in twee delen: fase 1 literatuur onderzoek en fase 2 experimenteel onderzoek.

Het onderzoek is er op gericht om enerzijds een overzicht te krijgen van de meest recente ontwikkelingen op het gebied van non-invasieve detectietechnologieën en hun mogelijke toepassingen in verschillende sectoren en anderzijds de eisen die potentiële gebruikers in het fyto-sanitaire domein aan dergelijke technieken stellen. Vervolgens is een inschatting gemaakt welke van deze technologieën vertaald kunnen worden naar het domein van fyto-sanitaire inspecties. Hierbij zijn zowel overwegingen van technische en logistieke aard gehanteerd als economische overwegingen.

De onderzochte technologieën zijn onderverdeeld in:

- detectie van beeld
- detectie van geur
- detectie van geluid

De bevindingen uit fase 1 van het rapport zijn in workshopvorm besproken met vertegenwoordigers van keuringsdiensten en Plantenziektenkundige Dienst.

De voornaamste conclusies zijn:

- Er is een veelheid aan beeldtechnieken waarmee allerlei vormen van specifieke schade in beeld gebracht kunnen worden bij individuele objecten. Bewegende insectenlarven in houtige materialen zijn in beeld te brengen met een commercieel te huren apparaat (Termatrac, 4 euro/dag).
- Er zijn verschillende commercieel verkrijgbare apparaten waarmee op basis van geluid insectenlarven in houtige materialen gedetecteerd kunnen worden (bv AEConsulting insectdetectiekit a 4000 euro), hiermee worden individuele objecten gemeten, waardoor de techniek geschikt lijkt voor detectie in relatief kostbare objecten (bonsai bomen, palmen, esdoorns).
- Geurdetectie methoden zijn complementair aan de eerste twee, omdat deze juist goed toepasbaar zijn op grotere afgesloten volumes vochtrijke producten zoals bv containers met sinaasappels. Deze methodes (bv elektronische neuzen, 25.000 tot 65.000 euro) zouden goed inzetbaar kunnen zijn om verdachte, afwijkende partijen van gezonde partijen te onderscheiden (voorselectie van te inspecteren partijen).

De technieken zijn vooral interessant als:

- De tijd per monster en de trefkans samen beter scoren dan visuele inspectie, bij een gegeven vastgesteld of voorgeschreven garantieniveau. Het gaat dus niet om gevoeliger detectiemethoden maar wel om goedkopere en snellere methoden bij een 'overeengekomen' gevoeligheid.
- Ze een voorselectie van containers mogelijk maken, zodat alleen nog die containers geïnspecteerd hoeven te worden waarin een aantasting kan worden verwacht.
- Ze verborgen organismen detecteren in materiaal dat zo kostbaar is (bv bonsais of boktor in levende bomen in de natuur) dat destructieve bemonstering bezwaarlijk is.

Op basis hiervan werd aanbevolen een tweetal pilots nader uit te werken in fase 2:

1. Voorselectie van te inspecteren containers met bulkproducten middels geurdetectie met bv elektronische neus of microGC.
2. Detectie van larven in houtige materialen met akoestische en/of Doppler microwave scantechieken (Termatrac). Later aangevuld met detectie van boorgangen in houtige materialen met behulp van röntgen.

Fase twee heeft het doel gehad de potentie, haalbaarheid en beperkingen van een deze detectietechnieken voor routinematige inspecties in beeld te brengen, ondersteund door experimentele gegevens en *hands-on* ervaringen. De verschillende hoofdstukken zijn afgesloten met conclusies en aanbevelingen. Deze kunnen als volgt samengevat worden.

Geurdetectie aangetast materiaal:

Potentie

Potentie om aangetaste/verdachte partijen te identificeren. In de onderzochte cases bleek aangetast materiaal een afwijkend geurpatroon te hebben (zowel kwalitatief als kwantitatief).

Beperking

Soortspecifieke detectie zal afhankelijk van de gekozen pathogeen-plantinteractie wel of niet mogelijk zijn. Dit zal per geval bepaald moeten worden. In het geval van sinaasappel en *Guinardia* is soortspecifieke detectie onwaarschijnlijk. De bredere wetenschappelijke literatuur toont voorbeelden bij andere waardplant x pathogeeninteracties waarbij wel specifieke detectie mogelijk is.

Toepassingsgebied

Toepassingsmogelijkheden met name bij bulkproducten (containers/dozen met fruit) zowel na aankomst op locaties als tijdens transport.

Vervolgonderzoek

Vervolgonderzoek zou zich moet richten op inventarisatie van pathogeen-plant interacties waarbij specifieke detectie gewenst en mogelijk is. Vervolgens opschaling richting praktijksituaties, robuustheid, specificiteit en bepalen van de meest geëigende meetapparatuur voor de praktijk (micro-GC).

Akoestische detectie insectenlarven

Potentie

Wanneer larven actief zijn en op de juiste plaats gemeten wordt is in korte tijd, non-destructief vast te stellen of larven aanwezig zijn

Beperking

De voornaamste beperkingen zijn: 1) vals-negatieve metingen door inactiviteit larven of ontwikkelingsstadia (eieren, poppen), 2) vooralsnog niet soortspecifiek, 3) meting per individueel object nodig, 4) achtergrondruis en signalen van niet-doel organismen leiden tot vals-positieve metingen.

Toepassingsgebied

Op dit moment lijkt het belangrijkste toepassingsgebied metingen aan zeer waardevolle bomen waarbij het ongewenst/onacceptabel is een destructieve meting te doen. Routinematig gebruik voor inspecties lijkt nog niet aan de orde.

Vervolgonderzoek

Zowel binnen als buiten Europa wordt gewerkt aan het in kaart brengen en oplossen van de beperkingen. Aanbeveling is bij dit onderzoek aan te haken of de resultaten af te wachten, om op basis daarvan te besluiten of de techniek ingepast dient te worden binnen routinematige inspecties.

Röntgen detectie boorgangen

Potentie

Goede mogelijkheden om individuele objecten te screenen op aanwezigheid boorgangen veroorzaakt door keverlarven.

Beperking

Voornaamste beperking is dat vooralsnog de techniek niet soortspecifiek is.

Toepassingsgebied

Inspecties van individuele objecten. Automatisering lijkt goed mogelijk.

Vervolgonderzoek

Vervolgonderzoek dient zich te richten op robuustheid (verschillende materialen, houtsoorten, diktes, en onderscheid van andere soorten aantasting (schimmels)). Goede mogelijkheden voor onderzoek aan vergaande automatisering mbt detecteren en kwantificeren.

De resultaten en aanbevelingen zullen januari 2010 in een workshop aan de stakeholders voorgelegd worden.

Inleiding

Routinematige inspecties in de praktijk

Het Europese fyto-sanitaire beleid is er op gericht te voorkomen dat schadelijke organismen zich vestigen in de Europese Unie. Hiertoe worden binnenkomende partijen plantaardig materiaal gecontroleerd door de Plantenziektenkundige Dienst en de keuringsdiensten. Daarnaast worden ook exportpartijen gecontroleerd. Bij deze inspecties wordt volgens vastgestelde protocollen steekproefsgewijs gecontroleerd door de inspecteurs.

In deze protocollen is o.a. vastgelegd welke steekproefgrootte genomen moet worden afhankelijk van de aard en grootte van de partij.

Een snelle en betrouwbare detectie is voor een import/export land als Nederland cruciaal. Ongewenste introductie van quarantainesoorten kan een aantal ongewenste gevolgen hebben waaronder:

- directe schade aan planten en plantaardige producten
- handelsbelemmeringen
- kosten van noodzakelijke bestrijdingsmaatregelen
- milieueffecten van bestrijdingsmaatregelen



Figuur 1. Inspectie van appels op een veiling.

De inspecties vinden plaats door visuele waarneming van symptomen en/of organismen op/in het materiaal dan wel door indirecte waarneming met bijvoorbeeld feromoonvallen, lichtvallen of gekleurde vangplaten.

Een aantal organismen is door hun verborgen levenswijze moeilijk waarneembaar. Voorbeelden van deze cryptische organismen zijn larven van boktorren en boorvliegen die zich in het plantaardig materiaal bevinden. Juist voor

dergelijke moeilijk waarneembare soorten zijn betere, snellere en betrouwbaardere technieken gewenst. Voorwaarde is wel dat dergelijke technieken binnen de logistiek van de huidige fytosanitaire inspecties inpasbaar zijn en dat deze economisch rendabel zijn.

De huidige inspecties zijn zoals gezegd voornamelijk gebaseerd op visuele waarnemingen aan individuele producten (bv individuele appels of sinaasappels). Met non-destructieve technieken is het denkbaar dat ook op andere niveaus geïnspecteerd kan worden (bv op doos/krat niveau of zelfs op container/vrachtwagen niveau). Een dergelijke nieuwe aanpak zal ingebed moeten worden binnen wettelijke kaders, zowel op nationaal niveau maar ook binnen de EU, en geaccepteerd moeten worden door de diverse stakeholders.

Ten slotte moet opgemerkt worden dat de daadwerkelijke inspecties doorgaans plaatsvinden onder omstandigheden die als volgt gekenschetst kunnen worden:

- koud (tussen -3 C en 15 C, afhankelijk van het product).
- lawaaierig (geluid van laden, lossen, ventilatoren, koeling)
- veel luchtbeweging (door koeling, ventilatie).

Het is van belang deze omstandigheden te onderkennen omdat deze invloed kunnen hebben op de toepasbaarheid van potentieel interessante detectietechnologieën.

Aanpak

Fase 1 van het project bestaat uit literatuuronderzoek.

Voor het literatuuronderzoek zijn verschillende bronnen gebruikt: wetenschappelijke literatuur, patentendatabases en websites van techniekontwikkelaars en producenten van direct beschikbare technologieën. Daarnaast zijn contacten geweest met bedrijven en onderzoeksinstituten en zijn bezoeken gebracht aan een keuringsdienst (KCB) en twee inspectielocaties; een veiling en een importeur.

Het literatuuronderzoek heeft zich gericht op de vraag welke technische mogelijkheden aanwezig zijn, welke 'cryptische' organismen (brede verkenning) in aanmerking komen voor toepassing van deze technieken (specificiteit), wat de gevoeligheid en betrouwbaarheid is bij de verschillende substraten (hout, vruchten, siergewassen), al dan niet verpakt in krat, doos of container, en stabiliteit bij wisselende omgevingsfactoren. Tevens is nagegaan welke softwarematige aanpassingen en technologische evaluaties nodig zijn om de perspectiefvolle technieken geschikt te maken voor fytosanitaire inspecties.

Stapsgewijs:

- inventarisering van combinaties van organisme/product/technologie: dit levert een groslijst op van mogelijkheden;
- toetsen van de combinaties op doeltreffendheid (gevoeligheid/specificiteit/betrouwbaarheid);
- toetsen van de combinaties op doelmatigheid (kosten/baten analyse),
- toetsen van de combinaties op toepasbaarheid (ICT, infrastructuur) bij keuringsdiensten en PD.

Workshop: Als afsluiting van deze verkenning werd een workshop georganiseerd om de resultaten te presenteren en te bediscussiëren met potentiële gebruikers van de technologieën.

In Fase 2 is experimenteel onderzoek gedaan aan een aantal technieken die op grond van de literatuurinventarisatie en de workshop geselecteerd zijn:

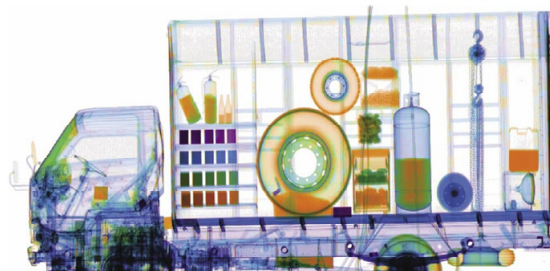
1. Voorselectie van te inspecteren containers met bulkproducten middels geurdetectie met bv elektronische neus.
2. Detectie van larven in houtige materialen met akoestische en/of Doppler microwave scantechieken (Termatrac). Later aangevuld met detectie van boorgangen in houtige materialen met behulp van röntgen.

Fase 1: Literatuuronderzoek.

Detectie van beeld.

State-of-the-art

Optische technieken die nu al gebruikt worden voor screening in de voedselindustrie, kwaliteitscontrole groenten en fruit, explosieven- of metaaldetectie, gezondheidszorg etc. zijn technieken die veelal gebruik maken van infrarood-, laser- MRI- of röntgenstraling. Voedsel wordt met infrarood apparatuur op inhoudsstoffen gemeten en gecontroleerd. Lasers worden ingezet om nauwkeurig de vorm van de producten in 3D te meten en te controleren of zij voldoen aan de toleranties wat betreft de maatvoering (o.a. auto-industrie). MRI en röntgen technieken worden in de gezondheidszorg ingezet om in het lichaam te kunnen kijken. Op macroschaal is het in de praktijk mogelijk om binnenkomende goederen te screenen. In de haven van Rotterdam worden hele containers met röntgenstraling gescand op aanwezigheid van 'vreemde' producten. Bij dit systeem worden alle containers gekeurd. Individuele keuring van de producten is niet mogelijk, omdat het ondoenlijk is om alle containers uit te pakken. Bij eerdere keuringen werd steekproefsgewijs een container geïnspecteerd.



Figuur 2. *Het Container Security Initiative (<http://www.cbp.gov>) is bedoeld om veiligheid te garanderen bij invoer van producten. Hiervoor wordt o.a. screenings- technologieën als röntgen gebruikt (www.nuctech.com).*

In de literatuur is al veel bekend op het gebied van detectie van cryptische plaagorganismen, zoals detectie van insecten in zaden m.b.v. nabij-infrarood spectroscopie, vliegende insecten met optische detectie van de vleugel-frequentie, akoestische en thermische detectie van termieten in hout. Deze voorbeelden laten zien dat het in principe mogelijk is om insecten aan te tonen op labschaal. Het toepassen van deze technologieën wordt ook steeds aannemelijker met de ontwikkeling van real-time infraroodapparatuur en de revolutie in de miniaturisering en automatisering met steeds krachtiger en goedkopere computers.

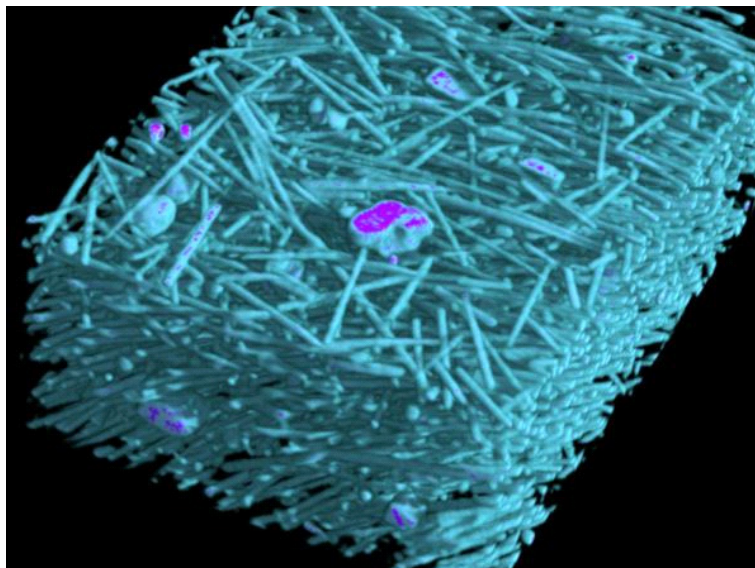
Optische Technieken met doorstralend vermogen

Om cryptische plaagorganismen te kunnen detecteren in gewassen zal een technologie moeten worden gebruikt die de verborgen insecten of ziekten zichtbaar kan maken. Een voor de hand liggende technologie is het doorstralen van het gewas met elektromagnetische straling. Verschillende golflengte gebieden hebben deze eigenschap: röntgen, MRI, terrahertzstraling, microgolven en radar.

Röntgen en MRI

Met röntgen-, gammastraling en MRI is men in staat om met hoge resolutie 3D-opnamen te maken. Met commerciële 3D x-ray tomography kan een resolutie worden bereikt van micrometers. De huidige ontwikkelingen gaan naar het nanometer bereik (www.phoenix-xray.com). In de literatuur is de eerste aanzet gegeven voor de ontwikkeling van

hardware, modellen en software om met gammastraling 3D informatie te verkrijgen van intacte scheepscontainers (Zhu *et al.*, 2006). Pipino (2001) beschrijft een vinding waarmee met röntgenstraling een stereobeeld kan worden gemaakt van voedingsproducten verpakt in een container.



Figuur 3. 3D x-ray tomography opname van glas fibers (<http://www.phoenix-xray.com/en/index.php>).

Terrahertz

Terrahertz straling ligt in het gebied tussen infrarood en microgolfstraling. Het heeft doordringende eigenschappen en kan dus door materialen heen gaan. Op basis van deze eigenschap is een terrahertzcamera ontwikkeld. Met deze camera wordt de terrahertzstraling gemeten die door ieder materiaal wordt uitgezonden. Er wordt zoals bij de andere methoden niet actief straling aangeboden, maar net zoals bij een thermische camera de langgolvlige 'warmtestraling' gemeten. De camera kan door structuren heen kijken. Verborgene voorwerpen onder bijvoorbeeld kleding kunnen worden gedetecteerd. Toepassingen waar aan gedacht wordt is het screenen van vliegtuigpassagiers bij het inchecken voor een vlucht. Nadeel van de camera is de langgolvlige straling die gebruikt wordt en die kleinere structuren niet kan waarnemen. Tot op heden is de ruimtelijke resolutie nog niet voldoende om bijvoorbeeld insecten waar te nemen en lijken de terrahertz beelden op die van thermische camera's met een lage resolutie.



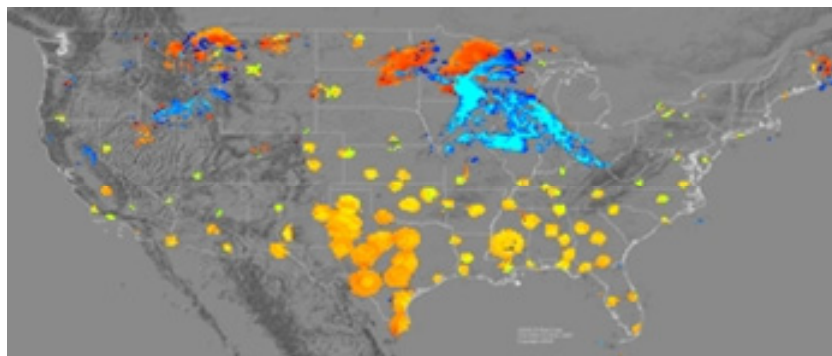
Figuur 4. TerraHertz opname van een man die iets probeert mee te smokkelen onder zijn hemd (<http://www.thruvision.com>, Noorderlicht, 'Verkenning in het duister, TerraHertz technologie opent de ogen').

Microgolven

Microgolfstraling is tegenwoordig goedkoop, omdat deze technologie op grote schaal commercieel wordt toegepast in magnetronovens. Deze straling heeft eveneens goede doordringingseigenschappen. Bij hogere vermogens wordt het voedsel binnenin verwarmd. Doordat de straling nog langgolfiger is dan terrahertzstraling kunnen alleen structuren in de orde van centimeters en groter worden waargenomen. Een mogelijkheid om dit te omzeilen is om alleen beweging van het te detecteren voorwerp te meten (Mankin, 2004). Dit is mogelijk door gebruik te maken van het Doppler effect. Voorwerpen die naar de bron toe bewegen geven een gereflecteerd signaal met een hogere frequentie. Voorwerpen die van de bron af bewegen geven een lagere. Door nu gevoelig deze frequentieverschuivingen te meten, is het mogelijk om bewegende voorwerpen in materialen te detecteren. Een commercieel apparaat dat van deze eigenschap gebruik maakt is de Termatrac (zie beschikbare technische mogelijkheden). Vindingen op het gebied van microgolven en insecten detectie zijn vastgelegd in verschillende patenten (Donskoy *et al.*, 2002 en 2006; Tirkil *et al.*, 1996).

Radar

Radarstraling is nog langgolfiger dan terrahertzstraling, maar heeft wel betere doordringingseigenschappen in materialen en wordt actief door antennes uitgezonden. Verschillende bedrijven in de wereld zijn bezig met de ontwikkeling van de *through-the-wall-radar*. Eén van hen is TNO-FEL in Den Haag. De *through-the-wall-radar* zendt – net als een gewone radar – zelf een signaal uit, waarvan de weerkaatsing vervolgens weer wordt opgevangen. De golflengte van het uitgezonden radarsignaal is veel groter dan de golflengte van terahertzsignalen en dus lukt het niet om een gedetailleerd beeld te krijgen van wat er in een container zit. Maar alles wat beweegt, wordt wel opgemerkt. Zo beeldt de muurradar van TNO mensen weliswaar als stipjes af, maar uit de radarsignalen kan wel worden opgemaakt hoe de hartslag, ademhaling en motoriek van de persoon verloopt. Het bedrijf Detect Inc. ontwikkelt radarapparatuur om vogelactiviteit te kunnen waarnemen. Een belangrijke toepassing is het voorspellen en volgen van vogelkolonies in de buurt van vliegvelden. Een vinding van Miceli (2000) beschrijft een methode waarbij radarstraling wordt gebruikt om houtige materialen te scannen op interne afwijkingen.



Figuur 5. Kaart van vogelactiviteit. Data afkomstig van US NEXRAD radar sensor network (<http://www.detect-inc.com>).

Spectroscopische Technieken met onderscheidend vermogen

Optische technieken die onderscheidend vermogen hebben om mogelijk cryptische plaagorganismen te kunnen detecteren zijn nabij-infrarood (NIR), Ramanspectroscopie, Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) en fluorescentie spectroscopie. Deze technieken danken hun onderscheidend vermogen door enerzijds gebruik te maken van spectraallijnen (NIR, Raman en fluorescentie) van intacte inhoudstoffen zoals olie, suiker, zetmeel, cellulose en water en anderzijds door een zeer kleine hoeveelheid materiaal te verdampen en in een plasma te brengen (LIBS). Hierdoor kan spectroscopie worden bedreven aan de atomaire elementen van de te onderzoeken stof.

Nabij-infrarood

NIR spectroscopie is gebaseerd op absorptie van electromagnetische straling met golflengten in het gebied van 780-2500 nm. Met NIR worden overgangen van inhoudstoffen gemeten zoals van bijvoorbeeld een C=O of C-H verbinding. Hierdoor is de uitslag van de meting niet uniek voor een bepaalde stof of molecuul, want vele stoffen kunnen een C=O of C-H verbinding hebben. Hierdoor is het signaal opgebouwd uit meerdere combinaties van verschillende stoffen. Door nu bij meerdere golflengten te meten kan met deconvolutie software een goede uitslag worden gegeven van de aanwezige stoffen. Een recent overzicht over deze technologie voor het meten van kwaliteit van tuinbouwproducten is te vinden in Nicolai *et al.* (2007). Een NIR systeem van Dowell *et al.* (1999) is in staat om 1000 zaden per seconde te scannen op de aanwezigheid van insecten. Davies (2002) beschrijft een vinding waarmee met een camera en NIR-straling larven in zaden kan worden gedetecteerd. Toepassingen in de praktijk van deze technologie zijn nog niet te vinden. Met NIR kunnen geen lage aantallen van insecten worden gedetecteerd in bulk goederen. Verder is de methode erg gevoelig voor veranderingen in water concentratie. Hierdoor moet de apparatuur frequent worden gekalibreerd met een soortgelijk monster dat niet geïnfesteerd is met insecten. Verder is de indringdiepte van NIR-straling meestal minder dan 1 mm. Cryptische insecten die dieper dan 1 mm in de producten zitten zijn dan ook niet te detecteren. Vandaar dat deze technologie vaak wordt toegepast op zaden die afmetingen hebben in de orde van millimeters. Een mini review op het gebied van detectie technologieën voor insecten in granen is te vinden in Neethirajan *et al.* (2007).

Ramanspectroscopie

Een alternatief voor NIR is Ramanspectroscopie. Beide spectroscopische technieken geven een signaal waarmee de verschillen in energieniveaus van de vibraties en rotaties gemeten worden. Echter, daar waar IR-spectroscopie gebaseerd is op de absorptie van infraroodlicht, is Ramanspectroscopie gebaseerd op inelastische verstrooiing ofwel Raman-verstrooiing van licht. Doordat Raman- en infraroodspectroscopie gebaseerd zijn op verschillende effecten is de informatie complementair: sommige vibratieniveaus waarvoor de infraroodspectroscopie geen informatie kan geven vanwege symmetrie, kunnen in Ramanspectroscopie wel worden gemeten, en andersom. Bij Ramanspectroscopie wordt meestal een laser als lichtbron gebruikt, omdat het Ramansignaal zwak is en afhangt van het vermogen van het ingestraalde licht. De technologie kan worden toegepast in het zichtbare licht, ultraviolet of nabij-infrarood, afhankelijk van het te onderzoeken materiaal. Een nabij-infrarood laser wordt meestal gekozen voor biologische materialen, omdat de indringdiepte voor deze golflengten groter is dan in het UV- of zichtbare gebied. Ramanspectroscopie is een spectroscopische techniek die gebruikt wordt in vele domeinen, waaronder de vastestoffysica en de scheikunde, om vibraties en rotaties in een systeem te bestuderen. Tegenwoordig vindt het ook zijn toepassingen in de biologie. Ramanapparatuur is als een complete opstelling te bestellen bij de meeste producenten van spectroscopische apparatuur zoals Ocean Optics en Avantes en kost circa €20.000.

Laser Induced Breakdown Spectroscopy

Met laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) wordt een te onderzoeken stof met laserlicht zeer plaatselijk net boven het materiaal een plasma gevormd door de laserbundel sterk te focuseren en te pulsen. In dit plasma is het te onderzoeken stof ontleedt in zijn atomaire elementen die in een aangeslagen toestand verkeren. Bij terugval naar de grondtoestand komt er licht vrij in de vorm van fluorescentie. Dit licht wordt geleid naar een spectrometer, die daaruit nauwkeurig bepaalt uit welke elementen de stof bestaat. Elk element is herkenbaar aan specifieke golflengtes in het opgevangen licht. Het emissie spectrum van het plasma is karakteristiek voor de te onderzoeken stof. De methode is niet geheel niet-destructief, want er wordt een kleine hoeveelheid van het oppervlak verdamt. Deze hoeveelheid is dermate gering, dat men voor praktijktoepassingen toch kan spreken van 'niet'-destructief. Review over atomaire emissie, absorptie en fluorescentie technieken is te vinden onder Evans *et al.*, 2002. Onderzoek voor toepassingen richt zich voornamelijk op het detecteren van chemische en biologische dreiging door bijvoorbeeld terroristische aanslagen (Gottfried *et al.*, 2008). Verder zal de technologie worden ingezet voor analyses in de ruimtevaart zoals van het Mars oppervlak. De apparatuur is als een complete opstelling te bestellen bij gerenommeerde producenten van spectroscopische apparatuur zoals Ocean Optics en Avantes en kost circa €50.000.

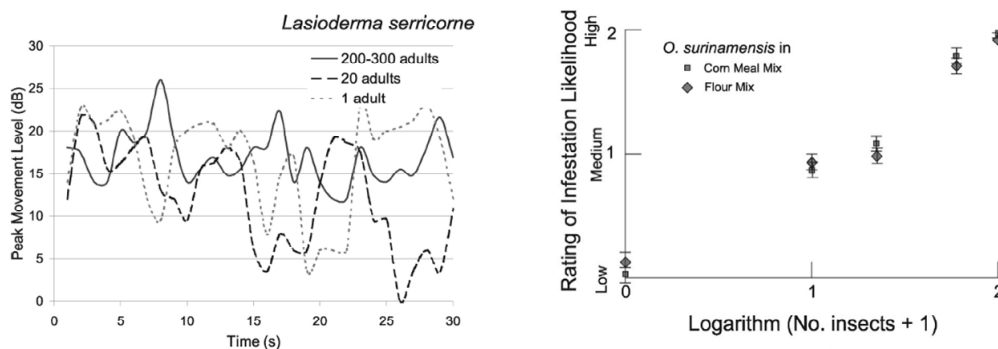
Combinatie van verschillende technologieën in één apparaat biedt de mogelijkheid om de specificiteit, detectie waarschijnlijkheid en inzetbaarheid van het apparaat te vergroten. Een mooi voorbeeld van een dergelijke

ontwikkeling is de combinatie van een Raman spectrometer met laser-induced breakdown spectrometer voor de volgende missie van ESA naar Mars (Bazalgette Courreges-Lacoste *et al.*, 2007).

Perspectievolle mogelijkheden

Detectie van cryptische insecten

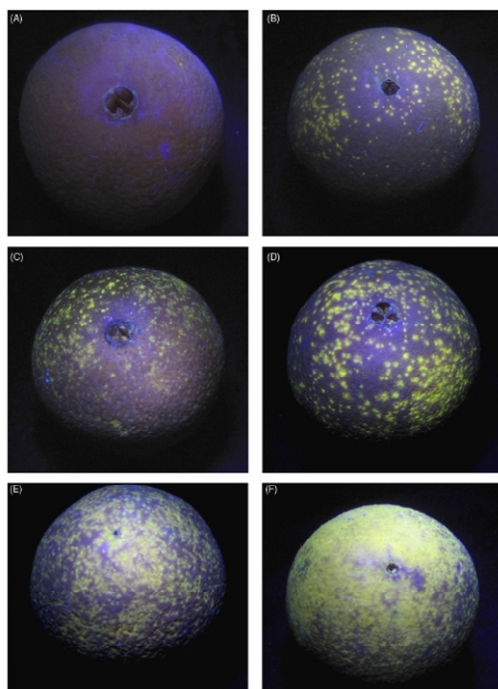
Een recent op de markt gebracht apparaat is de Termatrac (www.termatrac.com). Dit apparaat werkt op basis van het uitzenden van microgolfstraling en het Doppler effect. De Termatrac zendt continue microgolven uit die, wanneer zij getroffen worden door een bewegend voorwerp, microgolfstraling terugreflecteren met een kleine verschuiving van de frequentie, het Doppler effect. De gereflecteerde golven worden door de software geanalyseerd en op een display voor de gebruiker gevisualiseerd in de vorm van een bewegende balk op een LCD-display. Hoe groter de beweging des te meer uitslag op het display. Naast termieten kan Termatrac ook andere insecten in vaste stoffen waarnemen. De Termatrac kan niet gekocht worden, maar wordt geleased in de vorm van een licentie en een maandelijkse huur. De totale kosten bedragen circa €4,- per dag. Mankin (2004) heeft de Termatrac getest op meel die kunstmatig waren geïnfecteerd met insecten van verschillende grootte variërend van 2 tot 6 mm in lengte. Meettijden varieerden van 15 tot 30 s. Conclusie van het onderzoek was dat één á twee insecten te detecteren zijn, maar dat de betrouwbaarheid aanzienlijk toeneemt bij vijf insecten. Voordeel van de Termatrac is dat niet-destructief verborgen insecten kunnen worden gedetecteerd. Weliswaar in stoffen met een niet te hoog watergehalte. Bij uitstek is de Termatrac geschikt voor hout, zaden en meelachtige producten. Nadeel van het apparaat is de voorwaarde dat insecten bewegen, anders kunnen zij niet gedetecteerd worden.



Figuur 6. De Termatrac voor het opsporen van bewegende insecten in stoffen met een laag watergehalte (<http://www.termatrac.com>).

Detectie van cryptische pathogenen op vruchten en groenten

Ziekten die net onder het oppervlak zitten van bijvoorbeeld vruchten, zoals citrus, kunnen met twee verschillende technologieën worden gedetecteerd: UV-fluorescentie en chlorofylfluorescentie. UV-fluorescentie detecteert vrijgekomen stoffen t.g.v. veranderingen in de vrucht. Phenolische verbindingen die vrijkomen bij het dood gaan van de cellen hebben sterk fluorescerende eigenschappen. Bij bijvoorbeeld vorstschade worden cellen beschadigd en kan dit gedetecteerd worden met UV-fluorescentie (Fig. 7, Slaughter *et al.*, 2008). Tevens kan met deze technologie mogelijk de aanwezigheid van pathogenen worden aangetoond en boorgaatjes veroorzaakt door insecten.

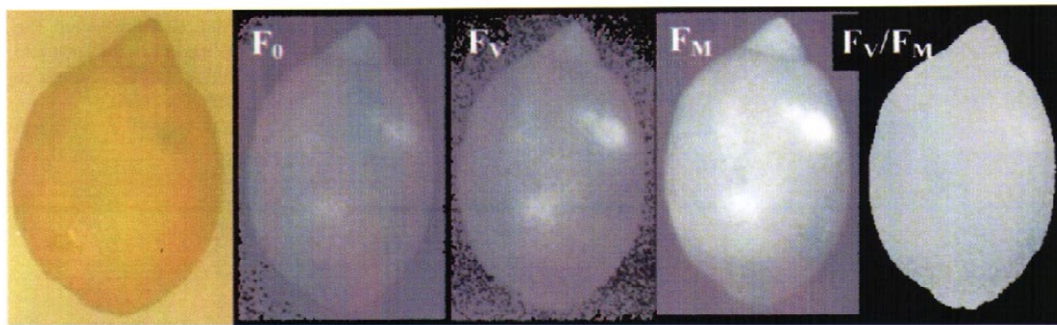


Figuur 7. UV-fluorescentie opnamen van sinaasappelen van verschillende stadia van vorstschade (Slaughter et al., 2008). Toename van groene fluorescentie duidt op meer schade.

Chlorofylfluorescentie meet veranderingen in de werking van de fotosynthese. Bij een normaal en goed functionerend fotosynthese systeem wordt een relatief lage fluorescentie intensiteit gemeten. Bij aantasting door een pathogeen zal de werking van de fotosynthese achteruit gaan. Hierdoor neemt lokaal ter plaatse van de aantasting de fluorescentie toe. Bij appels kon vroegtijdig kneuzingen en bij bananen bruinverkleuring worden aangetoond met laser fluorescentie spectroscopie voor dat dit visueel zichtbaar was (Zude, 2003). Met een commercieel apparaat, de Fluorcam (Photon System Instruments, Brno, Czech Republic), zijn soortgelijke metingen gedaan op citroenen. Er werd aangetoond dat de schimmelinfecties vroegtijdig en met een beter contrast dan op een kleurenopname kon worden gemeten (Nedbal *et al.*, 2000).



Figuur 8. De Fluorcam (Photon System Instruments, Brno, Czech Republic) voor het opnemen van chlorofyl fluorescentie beelden.



Figuur 9. Een citroen met twee groene plekjes (kleurenfoto). Chlorofylfluorescentie opnamen van F_0 , F_v en F_m van de citroen vrucht zijn weergegeven in het midden. Het beeld van F_v/F_m ratio is rechts weergegeven (Nedbal et al., 2000).

Tabel 1. *Overzicht van commerciële apparatuur voor niet-invasieve optische detectie van cryptische plagen in land- en tuinbouwgewassen.*

Techniek	Te detecteren	Firma	Kosten	Detectie gevoeligheid	Toepassing*	Slagingskans
Doppler Microwave	Bewegende insecten	Termatrac	€4,- per dag	1 insect	Breed	++
UV-fluorescentie	Ziekten Beschadigingen	Photon System Instruments	€13.990 + aanpassingen voor €2000	Niet zichtbare aantastingen	Vruchten Groenten	++
Chlorofylfluorescentie	Ziekten Beschadigingen	Photon System Instruments	€13.990	Niet zichtbare beginnende aantastingen	Vruchten Groenten Planten	+/-
Röntgen	Dichtheids- verschillen, holtes	Phoenix- xray	Circa k€200	Holtes met afmetingen van micrometers	Breed	++
MRI	Dichtheids- verschillen, holtes	?	Orde van M€	Holtes met afmetingen van mm	Breed	+
Terrahertz	Verschillen in langgolvlige warmtestraling	Thruvision	?		Niet, alleen grotere structuren zijn te detecteren	-
Radar	Grotere insecten	Detect-inc	?	Grotere insecten	Alleen vrij vliegende insecten	-
NIR	Insecten	Ocean Optics, Avantes	€30.000	1 insect per zaadje	Insecten	+/-
Raman	Sporen detectie	Ocean Optics, Avantes, TNO	€20.000	1 insect	Breed	+
LIBS	Sporen detectie	Ocean Optics, Avantes, TNO	€50.000	1 insect	Breed	++

* *Breed: toepasbaar (te maken) voor meerdere soorten doelorganismen/schadebeelden; smal: slechts toepasbaar (te maken) voor een beperkt aantal doelorganismen/schadebeelden.*

Slotconclusies

Drie technieken die commercieel verkrijgbaar zijn worden aanbevolen om nader te onderzoeken: Doppler Microwave, UV-fluorescentie en chlorofylfluorescentie. Doppler Microwave lijkt zeer geschikt om cryptische insecten niet-invasief aan te tonen. Toepassingen zijn te vinden in hout, houtachtige planten en voedselproducten met een laag watergehalte (circa 10-15%).

UV-fluorescentie en chlorofylfluorescentie zijn goed toepasbaar op producten zoals vruchten, groenten en planten met bladeren. Met UV-fluorescentie kunnen stoffen worden gemeten die aangeven dat de plantencellen dood zijn. Met chlorofylfluorescentie kan worden aangetoond dat een plaagorganisme een interactie heeft met de fotosynthese.

Vanwege de lage temperaturen in de koelcellen zal de fotosynthese niet erg actief zijn, vandaar een +/- voor de slagingskans. Doppler microwave en UV-fluorescentie zijn niet gevoelig voor de temperatuur. Wel moet bij Doppler microwave de insecten bewegen om ze te kunnen detecteren.

Relevante Literatuur

Websites

- Apparaat om termieten te meten in hout, <http://www.termatrac.com>
- Cargo X-ray imaging technology for material discrimination Dr. Chen Zhiqiang & Dr. Wang Xuewu, Nuctech Co. Ltd., P.R. China, <http://www.nutech.com>.
- CSI, Container Security Initiative, <http://www.cbp.gov>.
- Douglas R. Brown, Ph.D. Senior Vice President for Business Development Rapiscan Cargo Group, <http://www.osi-systems.com> en <http://www.rapiscansystems.com>.
- Fluorcam, <http://www.psi.cz/products/fluorcams/closed-fluorcam>
- LIBS-, Raman- en NIR-spectrofotometers, <http://www.oceanoptics.com>
- LIBS-, Raman- en NIR-spectrofotometers, <http://www.avantes.com>
- Noorderlicht, <http://noorderlicht.vpro.nl/artikelen/20009058/>
- New Ornithological Radar Technologies for Bird & Bat Discrimination & Species Identification, Mr. T. Adam Kelly, MS, Chief Scientist, DeTect, Inc., Panama City, Florida, USA; Mr. Scott, McLaughlin, Senior Radar Engineer, DeTect, Inc., Longmont, Colorado, USA; & Mr. Andreas, Smith, Senior Radar Ornithologist, DeTect, Inc., Panama City, Florida, USA, <http://www.detect-inc.com>.
- Terrahertz camera, <http://www.thruvision.com>

Artikelen

Bazalgette Courreges-Lacoste, G., B. Ahlers & F. Rull Pérez, 2007.

Combined Raman spectrometer/laser-induced breakdown spectrometer for the next ESA mission to Mars. *Spectrochimica Acta Part A*, 68, 1023-1028.

Dowell, F.E., J.E. Throne & J.E. Baker, 1999.

Automated nondestructive detection of internal insect infestation of wheat kernels by using near-infrared spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*, 91, 899-904.

Evans, E.H., J.B. Dawson, A.F. Fisher, W.J. Price, C.M.M. Smith & J.F. Tyson, 2002.

Advances in atomic emission, absorption and fluorescence spectrometry and related techniques. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 622-651.

Gottfried, J.L., F.C. de Lucia, Jr., C.A. Munson & A.W. Miziolek, 2008.

Standoff detection of chemical and biological threats using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Spectroscopy Vol. 62*, 4, 353-363.

Mankin, R.W., 1999.

Thermal treatments to increase acoustic detectability of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in stored grain. *J. Econ. Entomol.* 92(2):453-62.

Mankin, R.W., 2004.

Microwave radar detection of stored-product insects. *J. Econ. Entomol.*, 97(3):1168-73.

Nedbal, L., J. Soukupova, J. Whitmarch & M. Trrtilek, 2000.

Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38 (4), 571-579.

Neethirajan, S., C. Karunakan, D.S. Jayas & N.D.G. White, 2007.

Detection techniques for stored-product insects in grain. *Food Control* 18, 157-162.

Nicolai, B.M., K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K.I. Theron & J. Lammertyn, 2007.

Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biology and Technology* 46, 99-118.

Slaughter, D.C., D.M. Obenland, J.F. Tompson, M.L. Arpaia & D.A. Margosan, 2008.

Non-destructive freeze damage detection in oranges using machine vision and ultraviolet fluorescence.

Postharvest Biology and Technology 48, , 341-346.

Zhu, Z., L. Zhao & J. Lei, 2006.

3D measurement in cargo inspection with a gamma-ray linear pushbroom stereo system. SPIE Defense and Security Symposium.

Zude, M., 2003.

Detection of tissue browning using laser-induced fluorescence. Proc. XXVI IHC – Issues and Advances in Postharvest Hort. (Ed. R.K. Prange) Acta Hort. 628. ISHS.

Patenten

- Davies, method and means for detecting internal infestation in granular material. PCT Filed: Jul. 26, 2002, Appl. No.: 10/486,305.
- Donsky *et al.*, Device and method for detecting insects in structures. Filed: Dec. 3, 2002, Appl. No.: 10/309,489.
- Donsky *et al.*, Device for detecting localization, monitoring, and identification of living organisms in structures. Filed: Jun 1, 2006, Appl. No.: 11/444,759.
- Miceli *et al.*, Radar cross-section measurement system for analysis of wooden structures. Filed: Oct. 7, 2000, Appl. No.: 09/680,745.
- Pipino, X-ray inspection device for food products. PCT Filed: Jun. 8, 2001, Appl. No.: 10/297,564.
- Tirkel *et al.*, Termite detection system. PCT Filed: Sep. 4, 1996, Appl. No.: 09/029,960.

Detectie van geur

State-of-the-art

Vrijwel alle commerciële plantaardige gewassen, of het nu vruchten, groenten of sierteeltproducten betreft, verspreiden vluchtige verbindingen. Dat geldt ook voor de pathogenen en plagen die in het geogste product aanwezig kunnen zijn. Vaak is het zo dat de gewas x pathogeen/plaag-interactie bij de waardplant leidt tot de productie van specifieke vluchtige stoffen, die noch door de waardplant of pathogeen/plaag afzonderlijk worden uitgescheiden (Dicke, 2004; Kappers en medewerkers, 2005, 2006). Eén van de meest tot de verbeelding sprekende voorbeelden van het laatste is de zeer doordringende stank, veroorzaakt door secundaire infectie van aardappels met *Clostridium species*, zoals *C. multifementans* en *C. welchii*, na primaire aantasting door *Erwinia species* of *Phytophthora infestans*.

In de afgelopen 50 jaar zijn veel technieken aangewend om vluchtige stoffen van planten en hun pathogenen/plagen te identificeren en kwantitatief te meten. Het gaat hierbij om vluchtige stoffen, met positieve en negatieve geurimpressie en ook niet-geurende vluchtige stoffen. In vrijwel alle gevallen gaat het om de vluchtige stoffen van de afzonderlijke waardplant of pathogeen/plaag voordat interactie heeft plaatsgevonden. De technieken die hierbij gebruikt worden bestaan doorgaans uit de volgende fasen: concentratie van de vluchtige stoffen op een absorberend materiaal om voldoende massa te verkrijgen, dan het losmaken of desorberen van de geaccumuleerde vluchtige stoffen en vervolgens het chemisch analyseren. De laatste stap gebeurde in eerste instantie met gaschromatografie (GC) in combinatie met kwantitatieve meting met een vlamionisatie detector. Identificatie van de vluchtige stoffen geschiedde op basis van vergelijking van retentietijd op de GC met standaardverbindingen. In de jaren 90 van de vorige eeuw werd een GC gekoppeld aan een massa spectrometer (MS) als detector (GCMS) algemeen beschikbaar. Met zulke GCMS apparatuur kon de scheiding, identificatie en kwantitatieve meting in één run geschieden. Sinds ca. 2000 komen naast de GCMS andere technieken in zwang waarvan de elektronische neus ('electronic nose'), de micro-GC (in feite een miniuitvoering van de GC), de Laser-Based Trace Gas Detector (LBTGD) en Ion Mobility Spectrometry (IMS) het meest van belang zijn in het kader van dit project. Vrijwel al deze detectoren hebben een gevoeligheid in de ppb/ppm-range, waardoor in veel gevallen concentratie van vluchtige stoffen op een absorbers nodig is, gegeven de lage atmosferische concentratie van vluchtige stoffen. Ieder van deze technieken

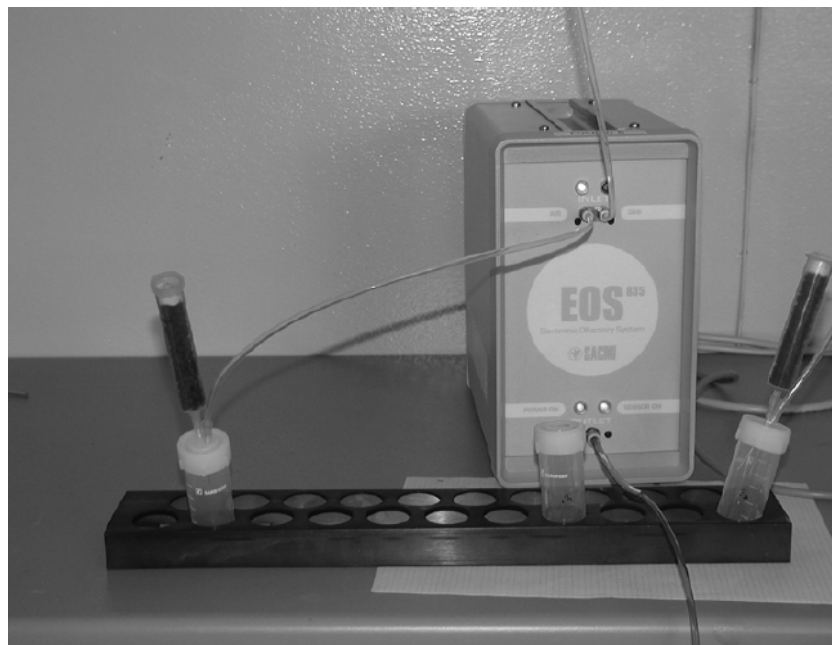
heeft zijn eigen karakteristieken. Tenslotte dient wel vermeld te worden dat deze apparatuur hoofdzakelijk is uitgetest is voor laboratoriumsituaties en dat ze voor toepassing in reguliere testomgeving in commerciële transportkanalen verder uitgewerkt en mogelijk aangepast moet worden.

Naast apparatuur worden ook levende organismen als detector gebruikt. Voorbeelden hiervan zijn getrainde ratten (www.apopo.org) of honden (<http://www.nesdca.com>). De benodigde investeringen voor deze technieken vallen buiten de scope van het huidige project.

Perspectievolle mogelijkheden

Standaard GCMS-apparatuur maakt vrijwel volledige identificatie en kwantificering mogelijk, maar deze apparaten zijn onhandzaam groot. Een microGC is per definitie kleiner en dus handzamer en heeft vrijwel dezelfde mogelijkheden met uitzondering van het feit dat in de huidige microGCs geen massaspectrometer gebruikt wordt, maar een generieke detector, bijvoorbeeld een 'thermal conductivity detector'. Om de identiteit van de vluchtige stoffen te weten moet het apparaat gekalibreerd worden met standaardverbindingen. Vaak is dit echter niet nodig voor onderscheid tussen geïnfecteerd en niet-geïnfecteerd plantaardige producten te onderscheiden op basis van patronen van (chemisch niet-geïdentificeerde) detectoruitslagen. De gevoeligheid ligt in ppm-range (parts per million) en is zodoende minder gevoelig dan LBTGD en electronic noses, die in de ppb (parts per billion) kunnen meten.

De electronic nose, gebaseerd op een 6- tot 12-tal metaal-oxide sensoren, geeft eveneens geen exacte informatie over de identiteit van de vluchtige stoffen maar herkent verhoudingen tussen groepen van chemisch verwante stoffen en kan na een zelfleerproces, wat gebruik maakt van multivariate analyse, onderscheid maken tussen bijv. geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde gewassen of tussen mechanisch beschadigde en niet-beschadigde planten (Costa en medewerkers 2007; Spinelli en medewerkers, 2004, 2006 en Stinson en medewerkers 2006, Tan en medewerkers, 2005, Turner & Magan 2004).



Figuur 10. Elektronische neus, zoals gebruikt door Soinelle en medewerkers (2006).

Laser-Based Trace Gas Detection (LBTGD) meet vooral kleine gasmoleculen met grote gevoeligheid (ppb-bereik). Deze laag-moleculaire gassen, zoals CO₂, ethyleen, methaan, worden afzonderlijk gemeten en bovendien zijn ze niet

erg specifiek voor een plaag/pathogeen-aantasting. Voor grotere moleculen kunnen wel aanpassingen gemaakt worden, maar die zijn nog niet voorhanden. Tevens moet van te voren vaststaan welke moleculen gemeten gaan worden. Om deze redenen lijkt LBTGD minder geschikt om complexe gasmengsels te detecteren in minder goed gedefinieerde situaties, zoals die het gevolg zijn na besmetting van land- en tuinbouwgewassen.

De kosten voor bovengenoemde apparatuur ligt in de range van €25000-65000.

Ion Mobility Spectrometry (IMS) meet eveneens kleine gas- moleculen, zoals CO, HCN met grote gevoeligheid (ppb-bereik). Het wordt vaak gebruikt voor controle op toxische componenten in de lucht. Vast moet staan welke gassen gemeten moeten worden. In principe is deze techniek, evenals LBTGD, geschikt maar voor toepassing op detectie van plagen/pathogenen moeten essentiële stappen verder uitontwikkeld worden. Aanschafkosten zijn onbekend.

In het kader van dit project lijkt een vervolgstudie zinvol als uitgegaan wordt van combinaties die in een laboratorium-situatie als haalbaar zijn vastgesteld. Dit is mede ingegeven door het feit dat de termijn voor de vervolgstudie circa 6 maanden zal zijn. Daarna kan de toepasbaarheid worden getoetst onder de binnen dit project beoogde praktijk-omstandigheden, bijvoorbeeld bij een import-/exportbedrijf of in de havens van Rotterdam. Bij het gebruik van geurdetectoren moet rekening worden gehouden met het feit dat gewassen vaak niet afzonderlijk worden opgeslagen en getest en dat vluchtige stoffen van nabij liggende partijen kunnen interfereren met de te beoordelen lading. Dit is ook de reden, waarom LBTGD minder geschikt wordt geacht daar deze techniek slechts een stof meet en dan vaak ook nog een klein molecuul (ethyleen, CO₂, methaan). Zulke metingen zijn niet specifiek voor aanwezigheid van plaagorganismen en/of besmetting van een bepaald gewas.

Als perspectiefvolle combinaties wordt uitgegaan van de eerder in dit rapport vermelde literatuurgegevens:

1. In de studie van Tan en medewerkers (2004) werd een toegenomen emissie van ethanol en CO₂ waargenomen met een electronic nose, (verder vermeld als 'e-nose') na beschadiging door gedeeltelijke bevroering. Vooral de toename van ethanol was 100% onderscheidend voor de geleden schade, CO₂-emissie voor 68%. In feite berust deze verhoogde emissie op wondschade zoals ook optreedt bij beschadiging door talrijke pathogenen en plagen, bijvoorbeeld door boorvliegen en thrips, maar ook schimmelinfecties. Omdat hier bekend is welke verbinding gemeten moet worden en het hier één enkele verbinding betreft, zou naast microGC en e-nose ook LBTGD toegepast kunnen worden.
2. Costa en medewerkers (2007) onderzochten het gebruik van e-noses voor vroegtijdige detectie om infectie van kiwifruit met *Botrytis cinerea* en *Sclerotinia sclerotiorum* te detecteren. Op 72 uur na moedwillige infectie, als nog geen uitwendige verschijnselen zijn waar te nemen, kon met principale component analyse (PCA) van het verkregen signaal niet alleen onderscheid gemaakt worden tussen geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde vruchten, maar ook tussen infectie met beide schimmelspecies.

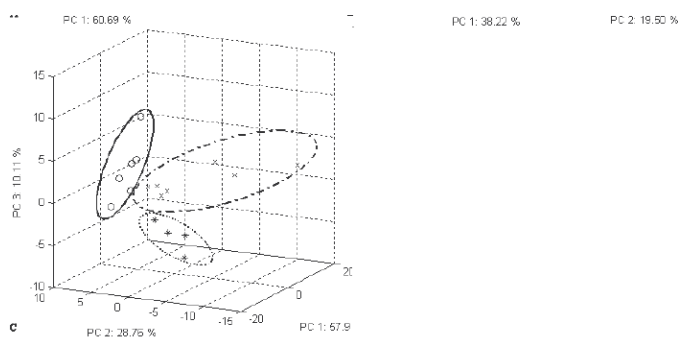
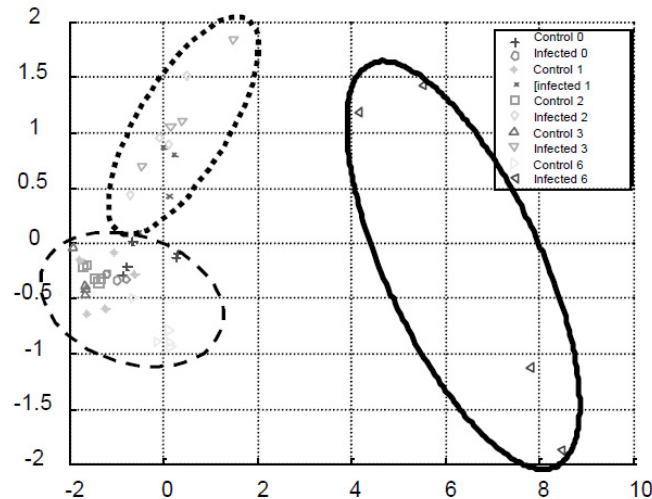


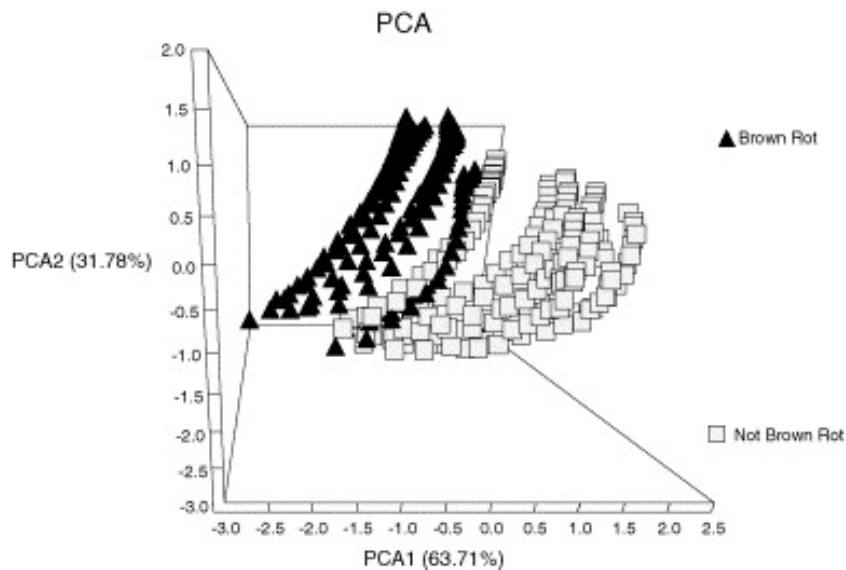
Fig. 6. Olfactory profiles of kiwifruit uninfected (o) or infected by *B. cinerea* (x) and *S. sclerotiorum* (*). The scores were calculated on the basis of the e-nose measurements performed 72 hours after artificial inoculation. A: *Actinidia deliciosa* (Summerkiwi™); B: *Actinidia deliciosa* ('Hayward'); C: *Actinidia chinensis*. The solid cluster contains the control fruits. The dotted cluster contains the *S. sclerotiorum* infected fruits and the dashed one the *B. cinerea* infected fruits.

3. Dezelfde onderzoeksgroep (Spinelli en medewerkers, 2006) onderzocht infecties van peren met *Erwinia amylovora* (bacterievuur). Met e-nose detectie konden, weer voordat uitwendige verschijnselen waarneembaar zijn, via PCA geïnfecteerde van niet-geïnfecteerde vruchten worden onderscheiden. *Erwinia amylovora* is niet slechts een relevant pathogeen voor peren maar ook voor appels, wat commercieel gezien een zeker zo belangrijk, zo niet belangrijker gewas is. Het lijkt de moeite waard om beide vruchtsoorten op dit pathogeen te toetsen met betrekking tot het onderscheidend vermogen van e-nose detectie.



Olfactory fingerprints determined using the e-nose. The dashed cluster contains the control plants and the infected plants just after inoculation. The dotted cluster contains the infected plants 2, 3 and 4 days after inoculation and the solid cluster contains the infected plants 6 days after inoculation.

4. Een ander belangrijke infectie; aardappel met bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) en ringrot (*Clavibacter michiganensis, ssp sepedonicus*), werden onderzocht met GCMS en e-noses (Stinson en medewerkers, 2006). In deze studie werden meerdere aardappelcultivars getest. Ook microGC kan in principe hiervoor worden ingezet. De geproduceerde vluchtige stoffen zijn voor beide interacties bekend: 3-methyl-2-pentanon voor ringrotinfectie en 2-propanon, 2-propanol, 2-butanon, 2-butanol, 2-pentanon en 2-pentanol voor bruinrot. Derhalve zou ook een LBTGD-benadering van toepassing kunnen zijn, maar daarvoor moet dan wel een speciale laser ontwikkeld worden. De vluchtige stoffen werden in deze studie wel eerst geconcentreerd door de aardappel in te sluiten in een glazen container en vervolgens 30 minuten de vrijgegeven vluchtige stoffen te accumuleren op een absorbens. Voor bruinrot kon, onafhankelijk van de aardappelcultivar onderscheid worden gemaakt tussen geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde aardappelknollen. Voor ringrot was er een overlap door het gebruik van meerdere cultivars. Niet duidelijk werd of het gebruik van één aardappelcultivar wel had geleid tot een onderscheid.



Tabel 2. *Overzicht van technische infrastructuur voor niet-invasieve detectie van cryptische plagen in land- en tuinbouwgewassen tijdens commercieel transport.*

Techniek	Te detecteren	Firma(s)	Kosten	Detectie-gevoeligheid	Toepassing*	Slagingskans
Electronic nose	Gasmengsels+ identificatie stoffen	AlphaMos (F) Dijkstra (NL) Scami (It)	30-65k€	ppb (1 enkele vrucht)	Breed	++
Micro GC	Gasmengsels, Geen identificatie stoffen	C2V (NL) Alpha MOS (F)	25-50 k€	ppm (enkele vruchten? niet onderzocht)	Breed	++
Laser-Based Trace Gas Detection	Afzonderlijke gasmoleculen	Trace Gas Facility (NL)	20-45k€	ppb (1 enkele vrucht? niet onderzocht)	Smal	-/+
Ion Mobility Spectrometry	Afzonderlijke kleine gas-moleculen, ook mengsels	Drager (NL) Owlstone Nanotech (UK)	?	ppb (1 enkele vrucht? niet onderzocht)	Breed	-/+
Honden, ratten	Specifieke kleine gasmoleculen en mengsels hiervan	NESDCA (USA) Apopo (B)	?	Een enkel insect (voor honden). Ratten niet onderzocht	Breed, maar smal per hond/rat	-

* *Breed: toepasbaar (te maken) voor meerdere soorten doelorganismen/schadebeelden; smal: slechts toepasbaar (te maken) voor een beperkt aantal doelorganismen/schadebeelden*

Slotconclusies

- 1) Er zijn vier technieken die potentieel ingezet kunnen worden voor niet-invasieve detectie van schade organismen: e(lectronic)-noses, micro-GC, Laser-Based Trace Gas detection (LBTGD) en Ion Mobility Spectrometry (IMS).
- 2) Hiervan lijken de eerste twee het meest in aanmerking te komen, daar deze reeds zijn uitgetest, en geschikt gebleken, in laboratoriumsituaties met diverse plaag x waardplant-interacties. De 3^e en 4^e techniek zijn potentieel zeker bruikbaar en is snel en relatief goedkoop, maar vraagt meer vooronderzoek en aanpassing van bestaande apparatuur. Een combinatie van de 1^e en 2^e techniek is zeker zinvol en zal de slagingskans aanzienlijk vergroten, maar natuurlijk ook de kosten van een dergelijke gecombineerde aanpak.
- 3) In alle gevallen moet de te gebruiken techniek uitgetest en mogelijk aangepast worden voor gebruik in de compleet andere omgeving van meting in commerciële transportkanalen.
- 4) Bij een vervolgtraject met het onder 3) genoemde doel kan in eerste instantie getest worden of de laboratoriumresultaten gereproduceerd kunnen worden om vervolgens over te gaan tot schaalvergroting tot meting in 1 of 2 commerciële transportkanalen.
- 5) Niet-invasieve detectie met vluchtige stoffen heeft als voordeel dat storing door omgevingsruis, zoals afkomstig van nabijliggende partijen, weinig relevant is. Wel moet rekening worden gehouden met het feit dat de lage temperatuur van commerciële opslagcondities leidt tot verminderde emissie van vluchtige stoffen. Het effect hiervan kan getest worden onder laboratoriumcondities.

Relevante Literatuur

<http://www.apopo.org>
<http://alpha-mos.com>
<http://www.c2v.nl/>
http://www.draeger.com/ST/internet/NL/nl/Producten/Detectie/Draagbare/phb_portableinstruments.jsp
<http://www.dijkstra.net/index1.php?div=LAB&page=LAB/faq>
<http://www.nesdca.com>
<http://www.owlstonenanotech.com/PDF/OWL0353.pdf>
<http://www.ru.nl/tracegasfacility/>
http://www.ua.ac.be/main.aspx?c=*STRUCHEM&n=21224

Costa G., M. Noferini, G. Firori & F. Spinelli, 2007.

Innovative application of non-destructive techniques for fruit quality and disease diagnosis. *Acta Horticulturae* 753, 275-281.

Dicke M., 1999.

Specificity of herbivore-induced plant defences. In: Chadwick DJ, Goode J (eds) *Insect-Plant Interactions and induced Plant Defence*. Wiley Chichester (Novartis Foundation Symposium 223) pp. 43-59.

Kappers I.F., A. Aharoni, T.W.J.M. van Herpen, L.L.P. Luckerhoff, M. Dicke & H.J. Bouwmeester, 2005.

Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. *Science* 309, 2070-2072.

Spinelli F., M. Noferini & G. Costa, 2006.

Near Infrared Spectrometry (NIRS): Perspective of fire blight detection in asymptomatic plant material. *Acta Horticulturae* 704, 87-90.

Stinson J.A., J.A. Persaud & G. Bryning, 2006.

Generic system for the detection of statutory potato pathogens. *Sensors and actuators B* 116, 100-106.

Tan E.S., D.C. Slaughter & J.F. Thompson, 2005.

Freeze damage detection in oranges using gas sensors.

Turner A.P.F. & M. Magan, 2004.

Electronic noses and disease diagnostics. *Nature reviews Microbiology* 2, 161-166.

Detectie van geluid

State-of-the-art

Detectie van geluid kan een methode zijn om de aanwezigheid van actief bewegende of etende insecten aan te tonen. Per definitie wordt hier de aanwezigheid van *levende* insecten aangetoond. Dit is van belang bij fytosanitaire inspecties waarbij het er om gaat of *levende* organismen aanwezig zijn. In de literatuur beschreven technieken voor akoestische detectie zijn met name gericht op detectie van:

- larven in plantmateriaal (bomen, verpakkingshout, palmen)
- larven, termieten in wortelstelsels van planten
- insecten in stored products

De door de insecten geproduceerde geluiden zijn vaak karakteristiek voor de soort waardoor soortspecifieke detectie mogelijk wordt. Een overzicht van akoestische detectie van insecten is te vinden in Reynolds & Riley (2002).

Het is van belang een aantal beperkingen van het principe van akoestische detectie te noemen die relevant zijn voor toepassing in routinematige inspecties op inspectielocaties:

- alleen actief bewegende of etende larven worden waargenomen
- activiteit van larven is niet continue: dus een bepaalde periode van meten is vereist
- activiteit insecten is afhankelijk van omgevingsomstandigheden (temp etc.)
- eieren en poppen zijn niet detecteerbaar
- individuele objecten moeten gemeten worden
- sommige insecten houden zich stil na verstoring
- achtergrondruis is een storende factor

Enkele van de in de algemene inleiding genoemde kenmerken van inspectielocaties zijn van specifiek belang: inspectielocaties zijn vaak gekoeld, waardoor insecten niet of verminderd actief zijn; inspectielocaties hebben veel achtergrondlawaai, waardoor specifieke aanpassingen nodig zijn om succesvolle akoestische detectie te doen. Softwarematige ontwikkelingen (vergelijk met spraakherkenning) kunnen helpen bij enerzijds herkenning van geluiden van specifieke insectensoorten en anderzijds bij het uifilteren van achtergrondruis (Mankin *et al.*, 2008; Pinhas *et al.*, 2008).

Er zijn wel onderzoeken gedaan om inactieve insecten te activeren om zo akoestische detectie beter mogelijk te maken door bijv. warmtebehandeling (Mankin *et al.* 1999) of elektrische stimulatie (Mankin 2002). Dus mogelijk kunnen sommige beperkingen opgeheven worden door technische ingrepen. Deze brengen echter wel extra behandelingsduur en dus kosten mee.

Ten slotte is het gegeven dat een bepaalde tijd aan één enkel object gemeten moet worden om de kans op detectie van een mogelijk aanwezig insect te vergroten een aandachtspunt omdat inspecties liefst vlot uitgevoerd dienen te worden.

Perspectievolle mogelijkheden

Piezoelektrische sensoren en accelerometers

Piezoelektrische sensoren, produceren een oppervlaktelading als ze worden gedeformeerd als gevolg van mechanische kracht. De lading is over een groot bereik evenredig met die kracht. Ze meten dus drukverschillen. Deze sensoren kunnen ook gebruikt worden voor zogenaamde accelerometers (versnellingsmeters) (zie bijvoorbeeld Mankin & Lapointe, 2003).

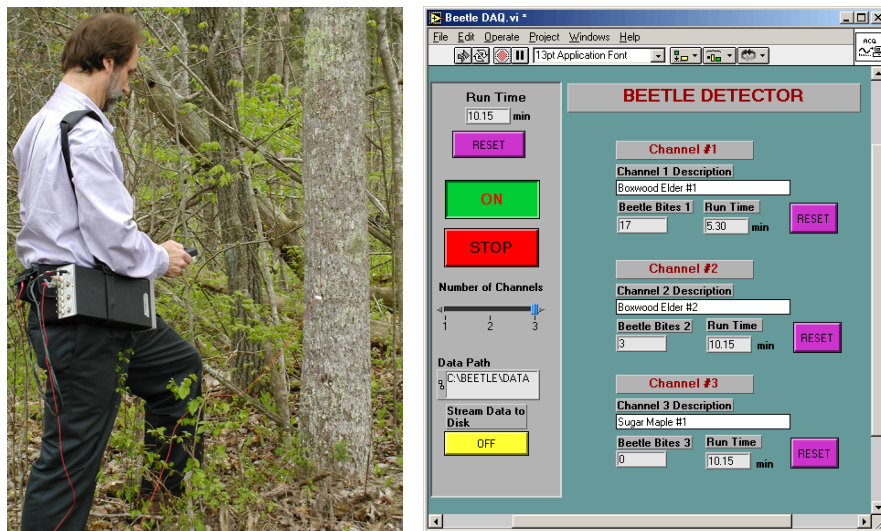
Dergelijke sensoren zijn de meest gebruikte sensoren voor akoestische detectie van insecten. De sensoren moeten in direct contact staan met het plantmateriaal. De sensoren zijn met name geschikt voor hard materiaal (hout, stored products, bodem) en minder geschikt voor zacht en licht materiaal.

Naast de sensor wordt in het algemeen gebruik gemaakt van een versterker, een computer voor opslag van de data en software voor analyse van de data. In dit laatste onderdeel zit de sleutel om de signalen geproduceerd door insecten uit het achtergrondgeluid te filteren.



Figuur 11. Luisteren naar knaaggeluiden van de Red Palm Weevil met een commercieel verkrijgbare detectiekit (<http://www.aeconsulting.com>).

Voorbeelden van de toepassing van piezoelectrische sensoren zijn de toepassing voor de detectie van de Aziatische boktor *Anoplophora glabripennis* in bomen (Mankin et al 2008) en de detectie van de snuitkever *Rhynchophorus ferrugineus*, de 'red palm weevil', in palmen (Pinhas *et al.* 2008).



Figuur 12. Beetle detector in gebruik door USDA (<http://www.ncrs.fs.fed.us>).

Naast toepassingen voor detectie van larven in boomstammen en ander hout materiaal (verpakingshout, bouwwerken) worden dit soort apparaten ook toegepast voor detectie van larven in stored products (Mankin *et al.* 1999, Hickling *et al.* 1997) en fruit (Webb *et al.*, 1988).



Figuur 13. Larven Lauscher van Firma NIR-Service, An den Banggärten 22a, D-61118 Bad Vilbel.

Tabel 3. Overzicht van commerciële apparatuur voor niet-invasieve akoestische detectie van cryptische plaaginsecten.

Techniek	Te detecteren	Firma's oa	Kosten	detectiegevoeligheid	Toepassing	Slagingskans
Diverse commercieel verkrijgbare detectie kids	Levende actieve insectenlarven in hout	NIR-Service (D) AEconsulting (USA)	4000 euro	In principe kan 1 larve gedetecteerd worden	Beperkt tot situaties waarin het mogelijk is individuele objecten te meten	+/- Let op randvoorwaarden

Slotconclusies

Akoestische detectie zal geen standaard oplossing zijn voor routinematige inspecties. De techniek beperkt zich tot actieve levende larven van insecten in houtige gewassen of houten constructies (kratten). Vooralsnog is het noodzakelijk individuele objecten gedurende een bepaalde tijdsspanne te meten waarbij de omstandigheden zodanig moeten zijn dat larven actief zijn (bv hogere temperatuur) en waarbij storende factoren (achtergrondruis) zoveel mogelijk worden uitgesloten.

Mogelijk dat voor specifieke situaties akoestische detectie een uitkomst kan bieden.

Relevante Literatuur

<http://www.aeconsulting.com>

<http://www.ncrs.fs.fed.us>

Hickling *et al.* 1997.

US Patent 5616845 - Acoustic sensor system for insect detection.

Mankin, R.W. 2002.

Increase in acoustic detectability of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae in stored products after electrical stimulation. *Florida Entomologist*. 85 (3): 524-526.

- Mankin, R.W., A. Mizrach, A. Hetzroni, S. Levsky, Y. Nakache & V. Soroker. 2008.
Temporal and spectral features of sounds of wood-boring beetle larvae: Identifiable patterns of activity enable improved discrimination from background noise. *Florida Entomologist* 91 (2): 241-248.
- Mankin R.W., D. Shuman & D.K. Weaver. 1999.
Thermal treatments to increase acoustic detectability of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in stored grain. *Journal of Economic Entomology*. 92 (2); 453-462.
- Mankin, R.W., M.T. Smith, J.M. Tropp, E.B. Atkinson & D.Y. Jong. 2008.
Detection of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae in different host trees and tissues by automated analyses of sound-impulse frequency and temporal patterns. *Journal of Economic Entomology* 101 (3): 838-849.
- Mankin, R.W. & S.L. Lapointe 2003.
Listening to the larvae: acoustic detection of *Diaprepes abbreviatus* (L.). *Proc. Fla. State. Hort. Soc.* 116: 304-308.
- Pinhas, J., V. Soroker, A. Hetzroni, A. Mizrach, M. Teicher & J. Goldberger. 2008.
Automatic acoustic detection of the red palm weevil. *Computers and Electronics in Agriculture* 63: 131-139.
- Reynolds, D.R. & J.R. Riley. 2002.
Remote-sensing, telemetric and computer-based Technologies for investigating insect movement: a survey of existing and potential techniques. *Computers and Electronics in Agriculture* 35: 271-307.
- Webb, J.C., D.C. Slaughter & C.A. Litzkow. 1988.
Florida Entomologist 71 (4): 492-504.

Afsluitende discussie en conclusie uit het literatuuronderzoek

De in dit rapport gepresenteerde informatie is in een workshop met ongeveer 20 deelnemers van keuringsdiensten en Plantenziektenkundige Dienst bediscussieerd. Het blijkt dat er verschillende technieken zijn die commercieel verkrijgbaar zijn die theoretisch toegepast zouden kunnen worden voor routinematige inspecties. Praktisch gezien vallen twee categorieën te onderscheiden: technieken die metingen doen aan individuele objecten (met name akoestische technieken en beeldtechnieken) en technieken die geschikt zijn voor metingen aan grotere volumes producten (met name geurdetectie technieken). Kort samengevat zijn de belangrijkste conclusies voor akoestische, beeld- en geurdetectie technieken:

1. Methoden voor akoestische detectie zijn relatief goedkoop (€ 4000,- per apparaat), maar detecteren alleen bewegende insectenlarven in harde materialen zoals hout en in één object per meting.

2 Met beeldtechnieken zijn bewegende insecten binnen in objecten te detecteren (apparaat alleen te huur, € 4 per dag). Met fluorescentie-technieken zijn ook latente infecties en beschadigingen te detecteren (apparatuurkosten €14000 tot €16000). Infraroodmethodes bleken niet bruikbaar, CT&MR-technieken zijn te traag en kostbaar.

3. Methoden voor detectie van geuren zijn complementair aan de twee bovengenoemde technieken, want geurdetectie lijkt met name goed toepasbaar op grote volumes vochtrijke producten zoals sinaasappels, waarbij herkenning van geurpatronen breder toepasbaar is dan van afzonderlijke geurstoffen. Het is wel nodig om per zending opnieuw de geurstandaard van een gezonde partij te bepalen. Prijzen variëren van €12000 tot €65000 per apparaat.

Voor alle methoden geldt dat de toepasbaarheid snel afneemt bij lagere temperatuur, hoewel bij geur een lange expositieduur (bv tijdens het transport per container) dit kan compenseren. Verhoging van de temperatuur zal in de praktijk meestal niet mogelijk zijn.

Tijdens de workshop werd vastgesteld dat technieken vooral interessant zijn als:

- De tijd per monster en de trefkans samen beter scoren dan visuele inspectie, bij een gegeven vastgesteld of voorgeschreven garantieniveau; het gaat dus niet om gevoeliger detectiemethoden maar wel om goedkopere en snellere methoden bij een 'overeengekomen' gevoeligheid.
- Ze een voorselectie van containers mogelijk maken, zodat alleen nog die containers geïnspecteerd hoeven te worden waarin een aantasting kan worden verwacht.
- Ze verborgen organismen detecteren in materiaal dat zo kostbaar is (bv bonsaïs of boktor in levende bomen in de natuur) dat destructieve bemonstering bezwaarlijk is.

Daarnaast werd vastgesteld dat detectie niet alleen op importlocaties hoeft plaats te vinden, maar dat in sommige gevallen inspecties plaatsvinden bij de teler (bv bruinrot detectie in aardappelen) of tijdens transport mogelijk zijn (hierbij kan met name aan geurdetectie gedacht worden).

Vervolgens werden nog een aantal andere aandachtspunten naar voren gebracht:

- Detectie kan op verschillende niveaus plaatsvinden (van container to individueel object (vrucht of plant).
- Door combineren van technieken in de juiste volgorde kan men van voorselectie van risicopartijen naar specifieke detectie van schadelijke organismen komen.
- Hoe meer soorten quarantaine-organismen een partij kan bevatten, hoe lastiger detectie via deze technieken is.
- Het is bij inspecties ook van belang nog onbekende organismen op te sporen; de kans is groot dat deze categorie niet opgemerkt wordt bij voorselectie.

Op basis van rapport en workshop is geconcludeerd dat een tweetal pilots nadere uitwerking verdient in fase 2:

1. Voorselectie van te inspecteren containers met bulkproducten middels geurdetectie met bv elektronische neus
2. Detectie van larven in houtige materialen met akoestische en/of Doppler microwave scantechnieken (Termatrac). Later aangevuld met detectie van boorgangen in houtige materialen met behulp van röntgen.

Fase 2: experimenteel onderzoek

Niet-invasieve detectie van (Q-)pathogenen op basis van vluchtige stoffen

Doelstelling

De doelstelling van dit deelproject is om op basis van analyse van vluchtige organische verbindingen (afgekort VOCs: volatile organic compounds) te komen tot een niet-invasieve detectiemethode van waardplant x pathogeen-interacties met name van quarantaine pathogenen. Uiteindelijk moet dit uitmonden in een technologie die toepasbaar is in een omgeving waar fytosanitaire controle plaats vindt bij commerciële overslagbedrijven, zoals havens of import-/exportbedrijven. De toepasbaarheid houdt in dat relatief eenvoudig te hanteren technologie moet worden ingezet, bijvoorbeeld een electronic nose of microGC. Als basis voor validering wordt in eerste instantie onderzocht of met GCMS-analyses na accumuleren van VOCs op een absorbens (Tenax) onder laboratoriumcondities kan worden aangetoond dat de samenstelling van VOCS, afgegeven in de atmosfeer door geïnfecteerd plantmateriaal, verschilt van die van niet-geïnfecteerd materiaal. GCMS-analyse na accumuleren van VOCs op een absorbens (Tenax) is de meest robuuste standaard-analysetechniek en wordt daarom als proof-of-principle ingezet. Daarna kan via geleidelijke aanpassing van de meetcondities toegewerkt worden naar een situatie, waar dezelfde waarnemingen gedaan worden onder omstandigheden, waaronder KCB-inspecteurs dergelijke toetsen moeten uitvoeren.

In overleg met de stuurgroep is besloten om uit te gaan van de volgende interacties waarbij sinaasappels (en citroenen indien de tijd dit toe zou laten) als waardplant fungeren met de volgende pathogenen: *Ceratitis capitata* (Mediterrane fruitvlieg), *Penicillium sp.* en tenslotte het Q-pathogeen *Guignardia citricarpa*. De keuze voor het laatste pathogeen werd gemaakt op instigatie van KCB-inspecteurs tijdens de workshop 'Bruikbaarheid van non-destructieve detectietechnologieën voor routinematige inspecties', gehouden op 12 maart 2009.

Gebruikte methoden

Plantmateriaal en pathogenen

Voor infectie met *Penicillium digitatum* en *Ceratitis capitata* werden Valencia perssinaasappels (*Citris sinensis*) verkregen via Albert Heijn.

Infectie met *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum werd verkregen via CBS (codenr CBS 03.0569) en in eerste instantie opgekweekt op PDA (potato dextrose agar) medium. Consultatie van J. Meffert (PD), van de website van het CBS en van Eckert & Ratnayake (1994) leidde tot de keuze van *P. digitatum*. Vanuit de agarcultures werden met een entnaald sporen overgebracht door aanprikken op de schil van sinaasappels. Als controles werden sinaasappels met een steriele entnaald behandeld. De sinaasappels werden geincubeerd bij 25°C, 100% RH en een licht-donkerregime met 16 uur licht. Na 7 dagen waren de sinaasappels duidelijk met *Penicillium* besmet en werd de head-space trapping uitgevoerd (zie onder). De besmette sinaasappels hadden een zoete geur met bittere ondertonen, de controlevruchten hadden nauwelijks geur.

Infectie met *Ceratitis capitata*

Poppen van *C. capitata* werden verkregen uit Spanje via Josep Anton Jacas Miret, Universitat Jaume I (UJI), Unitat Associada d'Entomologia Agrícola UJI-Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA), Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Castelló de la Plana.

De poppen werden overgebracht op natte vermiculiet in een insectenkooi met een schaalpje droog voermengsel: gistextract : suiker (1:4, w/w), een buisje opgelost mengsel van gistextract : suiker (1:4, w/w) en een schaalpje met

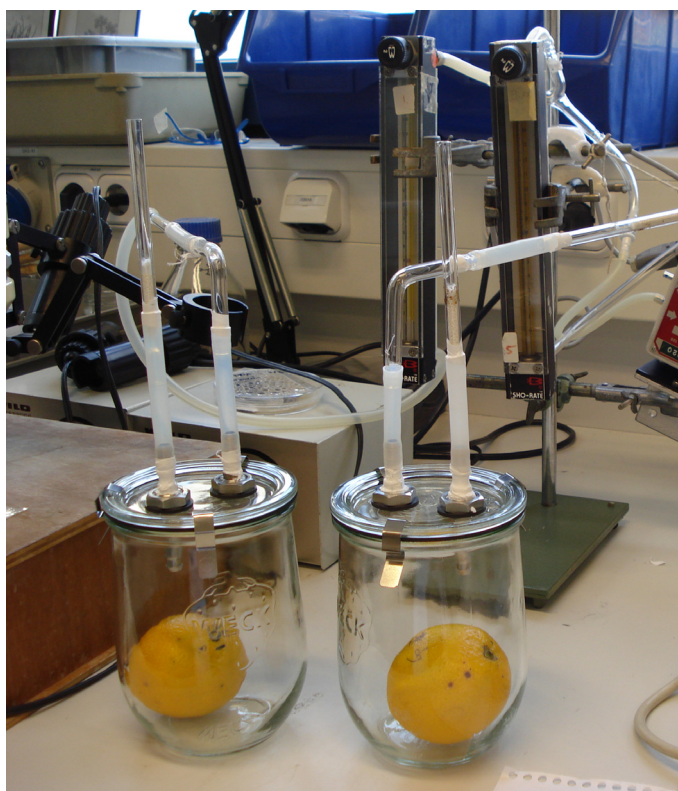
natte oasis in een insectenkooi bij 25°C, 16 uur licht, ±70% RH. Na ca 1 week kwamen de poppen uit en enkele dagen later waren de eerste paringen zichtbaar. Weer een week later werden 3 vruchten in de kooi gelegd. Als controle werden 3 vruchten in kooien zonder insecten gelegd onder dezelfde klimatologische condities. Na 4 dagen werden de sinaasappels uit de kooien gehaald en na 7 dagen werd head-space trapping (zie onder) uitgevoerd. Bij 2 experimenten werden telkens 3 geïnfecteerde en 3 controle sinaasappels gebruikt. Van de 3 geïnfecteerde sinaasappels waren er beide keren 2 met *Penicillium* besmet en daarom niet gebruikt. Elk van de 2 experimenten bestond zodoende uit één controle en één geïnfecteerde sinaasappel.

Infectie met *Guignardia citricarpa*

Sinaasappels, verdacht van besmetting met *Guignardia citricarpa* uit Brazilië (sinaasappelras onbekend) werden vanuit Handelscentrum Barendrecht door het KCB Geldermalsen opgestuurd naar de PD. Na positieve diagnose op *Guignardia citricarpa* werden ze getransporteerd naar Plant Research International. Als controle dienden vruchten uit dezelfde partij die negatief waren beoordeeld op besmetting met *Guignardia citricarpa*. Headspace trapping vond plaats met drie besmette en drie controle sinaasappels. Bij langer bewaren na de headspace trapping bleek de infectie met *Guignardia citricarpa* nauwelijks in omvang toe te nemen. Uiteindelijk werden de geïnfecteerde sinaasappels eerst geautoclaveerd en vervolgens afgevoerd.

Headspace trapping

Voor head space trapping (=het accumuleren van afgegeven vluchtige organische verbindingen, afgekort VOCs) van sinaasappels werd de experimentele opzet gebruikt als geïllustreerd op de volgende pagina. Iedere geïnfecteerde en controlevrucht werd apart geplaatst in een 1liter-wekfles. De wekfles werd afgesloten met een rubberring en een glazen deksel, die doorboord was met 2 gaten waarin roestvrijstalen fittingen waren aangebracht voor aansluiting van aan- en afvoerslangen voor de luchtstroom (100 ml/min). Bij de inlet werd de lucht gezuiverd door een glazen buisje, gevuld met 150 mg Tenax. De door de sinaasappel afgegeven VOCs werden gedurende 24 uur opgevangen in een soortgelijk Tenax buisje geplaatst op de outlet. Luchtdoorvoer werd verkregen via een vacuümpomp en de luchtdoorvoersnelheid gereguleerd via een flowmeter. Tussen in- en outlet Tenax buisjes werden Teflonslangen gebruikt. Na 24 uur trapping werden de in de outlet verzamelde VOCs geëluëerd met 3 ml hexaan. Van de hexaan-oplossing werd 1 µl geïnjecteerd in de GCMS voor analyse.



GCMS analyse

GCMS analyses werden uitgevoerd op een Agilent 7890A gaschromatograaf (GC) met hieraan gekoppeld een Agilent 5975A massaspectrometer (MS). Na injectie van 1 μ l hexaan, met daarin de door sinaasappels afgegeven VOCs, werden deze VOCs gescheiden op een Phenomenex ZB5-kolom (30 m lengte x 0.25 mm ID x 0.25 μ m filmdikte) met de volgende temperatuurgradient: 1 min 45 °C, dan met 10 °C/min tot 280 °C en vervolgens 7 min bij 280 °C. Helium diende als carriergas bij 0.7 ml/min. De gescheiden VOCs werden geïdentificeerd op basis van hun massaspectrum en de verkregen identiteit werd geverifieerd met standaard verbindingen, voor zover voorradig (aangegeven met 'R' in de tabellen).

Resultaten

Infectie met *Penicillium digitatum*



Voor de headspace analyses van sinaasappels na infectie met *Penicillium digitatum* werden 3 geïnfecteerde (links op de foto) vruchten vergeleken met 3 controles (rechts op de foto). Hiervan is er één geïnfecteerde vrucht (de 2^e van links) duidelijk minder zwaar aangetast. Met de (ongetrainde) menselijke neus is duidelijk een andere geur waar te nemen bij de met *Penicillium* geïnfecteerde sinaasappels. Bij de andere 2 interacties met *Guignardia citricarpa* en *Ceratitis capitata*, was dit niet het geval. Bij door *Penicillium* aangetaste sinaasappels was de geur veel sterker qua intensiteit en ook kwalitatief verschillend, in de zin van 'zoeter met een bittere ondertoon'.

In GCMS-analyses kwam het effect van infectie zeer sterk naar voren; de sterkere geur werd weerspiegeld in het grotere totale piekoppervlak. Dit is voor de geïnfecteerde vruchten gemiddeld 10 x groter ($1.045 \times 10^6 \pm 128 \times 10^6$) dan voor controles ($109 \times 10^6 \pm 23 \times 10^6$). Alhoewel het verschil in mate van infectie ogenschijnlijk groot is tussen de middelste en de twee andere geïnfecteerde vruchten, was het verschil in totaal piekoppervlak gering: 924×10^6 voor de 2^e en 1.180×10^6 en 1.030×10^6 voor de 1^e en 3^e.

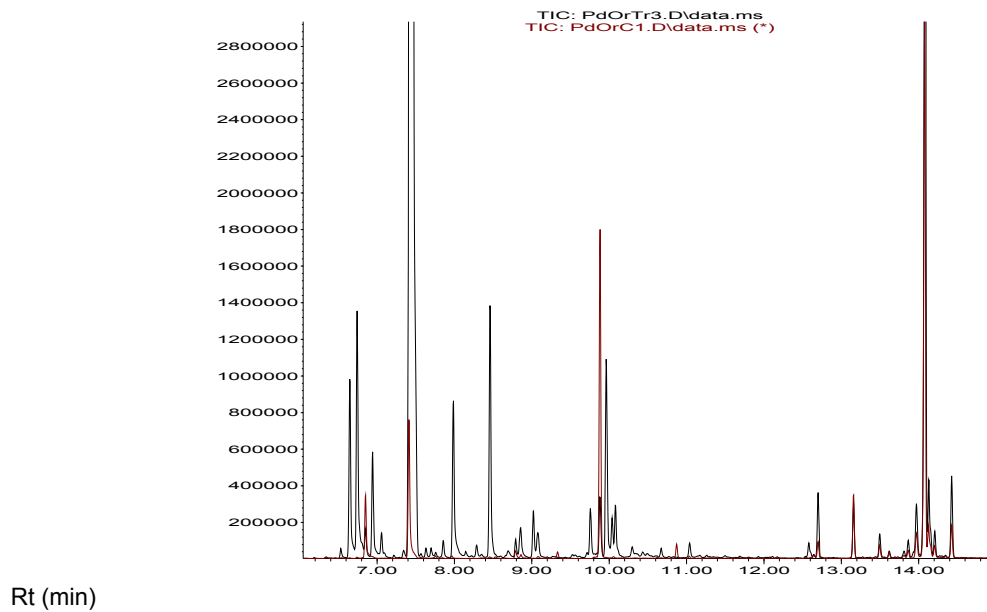
De GCMS-patronen, dat wil zeggen de relatieve samenstelling in procenten, van individuele VOCs verschilden sterk tussen de geïnfecteerde en controle vruchten. Er waren veel unieke VOCs die alléén voorkomen in de geïnfecteerde vruchten. Deze kunnen dienen om de geïnfecteerde vruchten te onderscheiden van de niet-geïnfecteerde. Er zijn ook VOCs die (vrijwel) specifiek afwezig waren in de geïnfecteerde vruchten. Voorbeeld voor de laatsten zijn de pieken bij de volgende Rt (in min): 4.02 (ethyl-butanoaat), 4.05 (octaan), 7.63 (Z-ocimeen, 6 x hoger in controle), 9.9 (ethyl-octanoaat, 12 x hoger); 10.87 (ethyl-4-methyl-octanoaat), 13.16 (caryophyllen, 10 x hoger), 14.08 (valenceen, de karakteristieke geurstof voor sinaasappel, 5 x hoger) en 17.69 (nootkaton, de karakteristieke geurstof voor grapefruit). Wel dient hierbij gerealiseerd te worden dat deze cijfers refereren naar de percentages van totaalpiekoppervlak. De absolute hoeveelheden bij de niet volledig unieke VOCs kleiner zijn omdat geïnfecteerde vruchten een 10 x hogere totaal emissie hebben. Opvallend is de verschuiving van valenceen als hoofdcomponent in de controle naar limoneen in geïnfecteerde vruchten.

Tabel 1. GCMS patronen van de headspace van sinaasappels na infectie met *Penicillium digitatum* en van niet-geïnficeerde vruchten (controle). Minder abundante componenten van de head space die niet bijdragen aan in de tekst behandelde verschillen tussen controle en geïnficeerde vruchten zijn niet in de tabel opgenomen. De identiteit van met R gemarkeerde verbindingen is geverifieerd met een referentie.

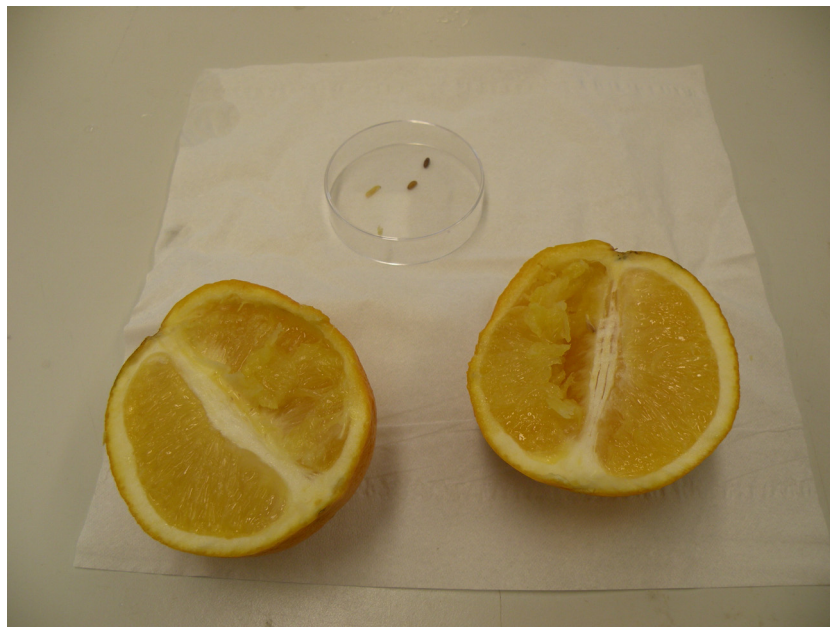
Rt (min)		Ref.	Geïnficeerd		Controle	
			Percentage van totaal piekoppervlak			
			Gemiddeld	Stdev	Average	Stdev
4.02	Ethyl-butanoaat		0.1	± 0.0	1.2	± 1.1
4.05	Octaan		0.1	± 0.0	1.4	± 0.3
5.38			0.1	± 0.0	0.8	± 0.2
6.65	6-Methyl-5-hepteen-2-on		2.0	± 0.5	0.2	± 0.2
6.74	β-Pineen	R	2.0	± 0.5		
6.85	Hexanoic acid ethylester	R	0.5	± 0.5	3.4	± 2.3
6.94	cis-3-Hexenylacetaat		1.1	± 0.3		
7.46	Limoneen	R	65.3	± 8.3	9.4	± 4.0
7.63	Z-Ocimeen	R	0.1	± 0.0	0.6	± 1.0
7.99			2.0	± 0.6	0.2	± 0.2
8.46	β-Linalool	R	4.5	± 2.6		
8.79	Methyl-octanoaat		0.7	± 0.9	0.4	± 0.3
8.86	Ethyl-3-hydroxyhexanoaat		0.4	± 0.1	0.3	± 0.2
9.02			0.3	± 0.2		
9.08			0.3	± 0.1		
9.31					0.4	± 0.4
9.76			0.4	± 0.2		
9.81	Butyl-hexanoaat		0.2	± 0.3		
9.88	Ethyl-octanoaat		1.0	± 0.7	12.4	± 10.5
10.04	cis-Carveol		0.3	± 0.0		
10.08	Octyl actetaat		0.4	± 0.1		
10.87	Ethyl-4-methyl-octanoaat				0.6	± 0.5
11.04			0.2	± 0.0		
12.58	Octyl-butyraat		0.2	± 0.2		
12.65			0.0	± 0.0	0.1	± 0.1
12.70	Elemeen		0.5	± 0.1	0.9	± 0.2
13.16	Caryophylleen	R	0.4	± 0.0	4.2	± 0.1
13.97	Isomeer van α-selineen		0.6	± 0.1	2.4	± 0.3
14.08	Valenceen	R	9.7	± 2.6	48.9	± 9.8
14.13	α-Selineen		0.8	± 0.2	3.6	± 0.6
14.21	Isomeer van valenceen		0.3	± 0.1	1.1	± 0.2
14.43	α-Peninseen		0.7	± 0.2	2.7	± 0.3
17.69	Nootkaton	R	0.0	± 0.0	0.4	± 0.3

Bij de VOCs, die vrijwel specifiek tot uniek zijn voor geïnficeerde vruchten, maakt de grotere totale emissie het contrast met de controles alleen maar groter; een 2x hogere percentage na infectie betekent een 20 x hogere totaal emissie van de betreffende individuele VOC. Dit is in Fig. 1 te zien: de rode lijn toont het GCMS patroon van de headspace van de controle, de zwarte lijn voor de met *Penicillium* besmette sinaasappels. Veel van deze verschillen tussen geïnficeerd en niet-geïnficeerd materiaal zijn kwalitatief, statistisch significant en reproduceerbaar tussen herhalingen. VOCs die uniek zijn voor geïnficeerde sinaasappels hebben retentietijden (Rt) van: 6.7 (β-pineen), 6.9 (cis-3-hexenylacetaat), 8.5 (β-linalool), 9.0; 9.1; 9.8 (butyl-hexanoaat); 10.0 (cis-carveol); 10.0 (octyl-acetaat); 11.0

en 12.6 (octyl-butyraat). Daarnaast zijn er nog talrijke componenten die in percentage van totaal piekoppervlak sterk stijgen t.g.v. infectie en dus een feite een nog 10 maal hogere stijging in absolute hoeveelheid vertonen. Voorbeelden hiervan zijn te vinden bij een Rt van: 6.6 (6-methyleen-5-hepteen-2-on), 7.5 (limoneen), 8.0, 8.8 (methyloctaonaat).



Figuur 1. GCMS patronen van de headspace van sinaasappels na infectie met *Penicillium digitatum* (zwarte lijn) en van niet-geïnfecteerde sinaasappels (rode lijn).



Infectie met *Ceratit* capitata

Uitwendig zijn aan de vruchten na infectie met *Ceratit* capitata nauwelijks verschijnselen waar te nemen. Onder het binoculair zijn echter boorgaatjes en hieromheen uitgedroogde larven te zien. Bij doorsnijden van de vruchten is het

vruchtvlees duidelijk weggevreten door de larven (zie foto). De intensief bewegende larven kunnen na enig speuren waargenomen worden in de ruimte die de larven zich zelf in het vruchtvlees hebben geschapen.

Opengesneden sinaasappels na aantasting door *Ceratitis capitata*. De larven, in verschillende stadia van ontwikkeling, zijn in het schaalpje boven waarneembaar.

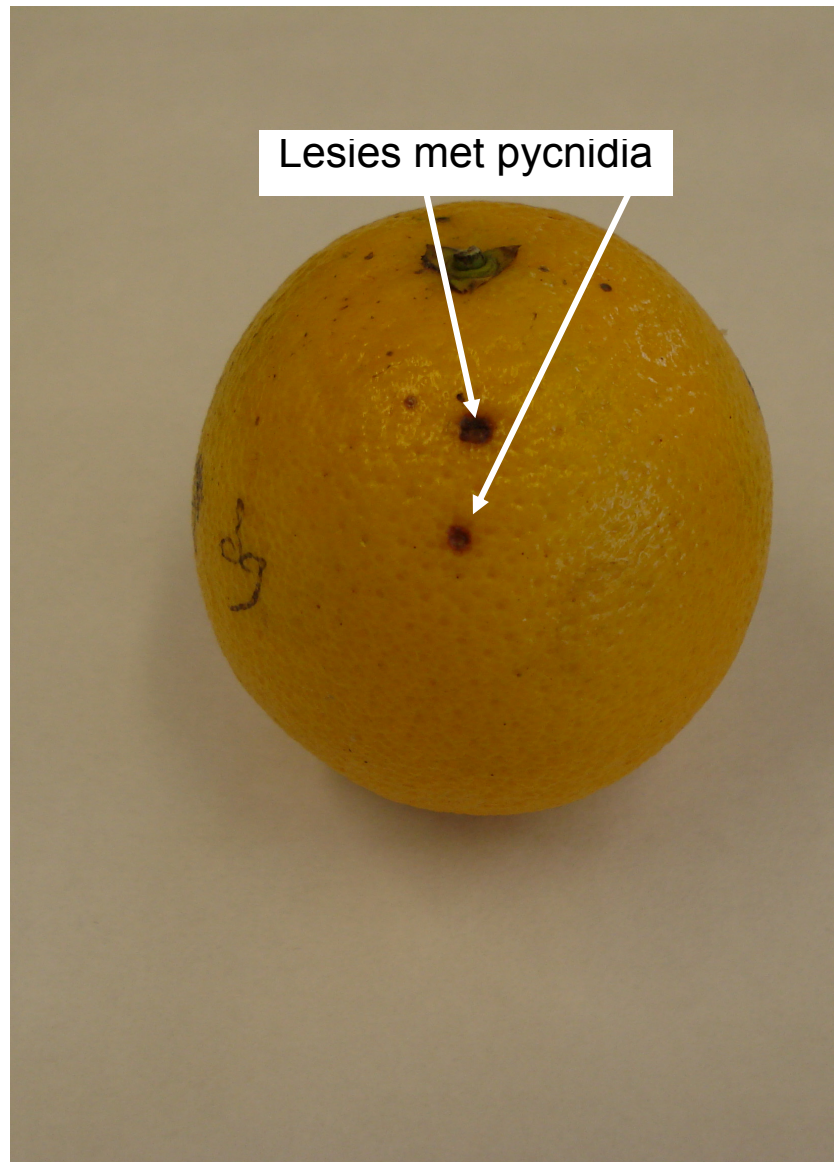
Tabel 2. GCMS patronen van de headspace van sinaasappels na infectie met Ceratitis capitata en van niet-geïnfekteerde vruchten (controle). Minder abundante componenten van de head space die niet bijdragen aan in de tekst behandelde verschillen tussen controle en geïnfekteerde vruchten zijn niet in de tabel opgenomen. De identiteit van met R gemarkeerde verbindingen is geverifieerd met een referentie.

Rt (min)	Ref	Percentage van totaal piekoppervlak			
		geïnfecteerd		Controle	
		Gemiddeld	Afwijking	Gemiddeld	Afwijking
4.01	Ethylbutanoaat	0.8	± 0.8	1.6	± 0.9
4.04	Octaan	0.3	± 0.0	0.8	± 0.0
6.81	Butyl-butanoaat	1.3	± 1.1	0.2	± 0.2
6.86	Ethyl-hexanoaat	R 8.1	± 4.7	4.1	± 0.7
7.41	Limoneen	R 4.9	± 3.2	13.9	± 1.7
7.64	Z-Ocimeen	R 4.9	± 2.3		
8.67	3-Methyleen,1,1-dimethyl 2-ethylene cyclohexaan	5.7	± 0.8		
8.79	Methyl-octanoaat	1.7	± 1.4	0.5	± 0.2
9.82	Butyl hexanoaat	5.5	± 0.6	0.7	± 0.1
9.90	Ethyl-octanoaat	17.2	± 6.5	15.7	± 1.9
12.54	Hexyl-hexanoaat	3.7	± 1.6	0.2	± 0.1
12.70	Elemeen	1.7	± 0.3	0.8	± 0.1
13.16	Caryophylleen	R 0.7	± 0.2	2.1	± 0.5
13.97	Isomeer van α-selineen	1.8	± 0.4	2.4	± 0.0
14.09	Valenceen	R 30.4	± 8.0	45.3	± 1.5
14.14	α-Selineen	2.5	± 0.6	3.5	± 0.1
14.21	Isomeer van valenceen	0.7	± 0.2	1.1	± 0.0
14.43	α-Peninseen	2.0	± 0.5	2.7	± 0.0
14.79	Nerolidol	R 0.4	± 0.1		
14.99	Hexyl-octanoaat	0.4	± 0.1		
17.68	Nootkaton	R 0.1	± 0.1	0.4	± 0.1

De GCMS-patronen van de headspace na infectie met *Ceratitis capitata* zijn duidelijk verschillend van de controlevruchten. Het totale piekoppervlak in de geïnfekteerde vruchten is gemiddeld 2.5 tot 5 x hoger (350×10^6 resp. 750×10^6) dan in de niet-geïnfekteerde vruchten (gemiddeld 151×10^6). Daar slechts twee experimenten zijn uitgevoerd kan een standaarddeviatie niet berekend worden, maar is de afwijking van het gemiddelde gegeven. Belangrijke VOCs in de headspace van zowel geïnfekteerde als niet-geïnfekteerde vruchten zijn valenceen en limoneen, maar ook ethyloctanoaat en ethylhexanoaat komen vrij abundant voor. VOCs, die uniek zijn voor geïnfekteerde vruchten, zijn te vinden bij de volgende retentietijden (Rt): 7.6 (Zocimeen, dit in tegenstelling tot het vorige experiment); 8.7 (3-methyleen 1,1-dimethyl 2-ethyleen-cyclohexaan); 14.8 (nerolidol); 15.0 (hexyl-octanoaat). Butylhexanoaat (Rt=9.8) en hexyl-hexanoaat (Rt=12.5) komen in veel hogere mate in geïnfekteerde vruchten voor, maar zijn ook in zeer lage proporties in controle-vruchten te vinden. Evenals voor de infectie met *Penicillium* geldt dat deze verschillen tussen geïnfecteerd en niet-geïnfecteerd materiaal zijn statistisch significant, reproduceerbaar en vaak

(vrijwel) kwalitatief. Bij *Ceratitis*-infectie geldt dat de proportionele hoeveelheden van geurstoffen in geïnfecteerde vruchten t.o.v. controle in feite een factor 2.5-5 maal hoger voorkomen dan hun procentuele verschil aangeeft.

Infectie met *Guignardia citricarpa*



Bovenstaande foto toont een sinaasappel, geïnfecteerd met *Guignardia citricarpa*, met twee lesies waarop pycnidiosporen zichtbaar zijn onder de binoculair. Deze lesies zijn klein en droog. Vanwege deze verschijningsvorm werd door de afdeling mycologie van PD er reeds op gewezen dat infectie met *Guignardia citricarpa* mogelijk geen of weinig effect zou hebben op het geurpatroon.

Het totaal piekoppervlak in geïnfecteerde vruchten is niet significant groter dan in controle vruchten: $141 \times 10^6 \pm 85 \times 10^6$ versus $107 \times 10^6 \pm 36 \times 10^6$. In beide gevallen zijn valenceen en limoneen de hoofdcomponenten van de headspace.

Bestudering van de GCMS-patronen van geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde sinaasappels gaf echter toch enkele verschillen te zien:

1. In controle sinaasappels werd ethyl butanoaat ($R_t = 4.0$) waargenomen.
2. In alle 3 geïnfecteerde sinaasappels werden pieken waargenomen bij $R_t = 8.7$ min (3-methyleen-1,1-dimethyl-ethylene cyclohexaan). In 2 van de 3 geïnfecteerde vruchten wordt de piek bij $R_t = 12.5$ min (hexyl-hexanoaat) en in één van de geïnfecteerde vruchten $R_t = 9.8$ (butyl-hexanoaat) waargenomen. Deze laatste twee verbindingen komen niet in de controles voor. Ook hier gaat het om kwalitatieve, statistisch significante en reproduceerbare verschillen.

Tabel 3. GCMS patronen van de headspace van sinaasappels na infectie met Guignardia citricarpa en van niet-geïnfecteerde vruchten (controle). Minder abundante componenten van de head space die niet bijdragen aan in de tekst behandelde verschillen tussen controle en geïnfecteerde vruchten zijn niet in de tabel opgenomen. De identiteit van met R gemarkeerde verbindingen is geverifieerd met een referentie

Rt (min) Compound		Percentage van totaal piekoppervlak						
		geïnfecteerd		Controle				
		Gemiddeld	stdev	Gemiddeld	stdev			
4.01	Ethyl-butanoaat			0.5	±	0.5		
4.05	Octaan	1.3	±	0.6	1.5	±	0.6	
6.74	β-Pineen	R	0.4	±	0.5	0.4	±	0.5
6.85	Ethyl-hexanoaat	R	2.2	±	1.0	2.4	±	1.3
6.95	cis-3-Hexenylacetaat		0.1	±	0.1	0.1	±	0.1
7.41	Limoneen	R	34.3	±	29.0	47.4	±	22.6
8.46	β-Linalool	R	0.2	±	0.3	0.4	±	0.1
8.66	3-Methyleen-1,1-dimethyl 2-ethyleen cyclohexaan		0.5	±	0.3			
9.81	Butyl-hexanoaat		0.3	±	0.5			
9.88	Methyl-octanoaat		4.5	±	2.1	5.7	±	3.4
10.06	cis-Carveol		0.2	±	0.1	0.1	±	0.2
12.54	Hexyl-hexanoaat		1.0	±	1.4			
12.70	Elemeen		0.3	±	0.1	0.1	±	0.1
13.16	Caryophylleen	R	3.1	±	0.9	3.3	±	2.0
13.97			1.7	±	0.8	1.2	±	0.5
14.08	Valenceen	R	34.4	±	15.7	25.2	±	10.6
14.13	α-Selineen		2.5	±	1.1	1.9	±	0.8
14.21	Isomeer van Valenceen		0.8	±	0.4	0.6	±	0.3
14.43	α-Peninseen		2.0	±	0.9	1.4	±	0.6
15.01	Hexyl-octanoaat		0.1	±	0.2			
15.12			1.4	±	0.7	1.6	±	0.8
16.20			0.5	±	0.2	0.1	±	0.1
17.69	Nootkaton	R	0.2	±	0.3	0.1	±	0.3

Conclusies en aanbevelingen

1. *Zijn er kwalitatieve verschillen waargenomen in profielen van vluchtige stoffen tussen controle behandelingen en geïnfecteerde behandelingen?*

Ja, voor twee van de drie de interacties zijn unieke verbindingen gedetecteerd. Voor het Q-pathogeen *Guignardia* echter niet. Deze unieke verbindingen vormen een belangrijk aanknopingspunt omdat ze pathogeenspecifieke detectie mogelijk maken, ook voor Q-pathogenen. Ook cryptische pathogenen, die met het oog niet kunnen worden waargenomen, kunnen met behulp van vluchtige stoffen gedetecteerd worden. De sinaasappel x *Ceratitidis* interactie uit dit rapport vormt daarvan een goed voorbeeld. Kanttekening hierbij is dat pas na onderzoek aan meer pathogeen x sinaasappel interacties of interacties met andere waardplanten en analyse van geurprofielen na toediening van abiotische stress (mechanische beschadiging, koude, hitte, droogteschade etc.) een duidelijker uitspraak gedaan kan worden over hoe uniek de gevonden verbindingen zijn voor een specifieke interactie.

2. *Worden voldoende hoeveelheden vluchtige verbindingen geproduceerd om opschaling naar de praktijk mogelijk te maken?*

Ja. Als voorbeeld kan de productie van β -pineen uit de *Penicillium* x sinaasappel worden genomen. De waargenomen piek is zo hoog dat makkelijk een 100-voudige verdunning nog gemeten zou kunnen worden met de gebruikte methode (GCMS-analyse van 1 μ l uit 3 ml eluaat). Wanneer een overstap wordt gemaakt naar een methode waarbij de geurstoffen direct van het absorberend materiaal worden gemeten (bijvoorbeeld SPME) dan kan naar verwachting nog een factor 3000 gevoeliger worden gemeten. Tensamen genomen betekent dit een factor 300.000. Dit maakt het aannemelijk dat een enkele aantasting in een achtergrond van duizenden gezonde sinaasappels detecteerbaar is.

3. *Zal voor alle denkbare Q-organismen x gewas interactie detectie op basis van vluchtige verbindingen mogelijk zijn?*

Neen. Dat komt ook naar voren uit het voorbeeld van de sinaasappel x *Guignardia* interactie. Zo zullen er meer waardplant x pathogeeninteracties zijn waarvoor geen detectie op basis van specifieke vluchtige stoffen mogelijk is. Per geval zal onderzocht moeten worden of er mogelijkheden zijn voor deze detectiestrategie.

4. *Hoe zou een vervolgonderzoek er stapsgewijs uit moeten zien uitmondend in een proof-of-principle op praktijkschaal?*

- a) Voor vervolgonderzoek zal eerst een goede inventarisatie gemaakt worden van de in aanmerking komende Q-pathogenen en de daarbij behorende waardplanten. Criteria hiervoor zijn het commerciële/phytosanitaire belang, het marktvolume van het gewas en de behoefte aan alternatieve detectiemethoden.
- b) De keuze van waardplant x pathogeen-interacties dient tot stand te komen in overleg tussen specialisten van de PD, KCB en de betreffende onderzoekers.
- c) Vaststellen van een verschillende patroon van vluchtige stoffen patroon in laboratoriumopstelling, als omschreven in dit verslag voor de interactie tussen sinaasappel met *Penicillium digitata*, *Ceratitidis capitata* en *Guignardia citricarpa* als pathogeen en trapping op een absorbers (SPME, Tenax) plus GCMS als analysestrategie. Vergelijking zal gemaakt moeten worden met blootstelling aan andere vormen van stress om vals-positieve meldingen uit te sluiten.
- d) Daarna kan vastgesteld worden of de verschillen in samenstelling van vluchtige stoffen ook gemeten kan worden met microGC (of electronic nose).
- e) Als volgende stap kan nagegaan worden wat het effect is van de aanwezigheid van een oplopend aantal niet-geïnfecteerde vruchten.
- f) Tenslotte moet vastgesteld worden of dezelfde bevindingen gedaan kunnen worden in de omstandigheden waarin normalerwijze de controle moet plaatsvinden door KCB-waarnemers (import-/exportbedrijf, havens, plantmateriaal in dozen of containers).

Literatuur

Costa G, M. Noferini, G. Firori & F. Spinelli, 2007.

Innovative application of non-destructive techniques for fruit quality and disease diagnosis. Acta Horticulturae 753, 275-281

- Dicke M., 1999.
Specificity of herbivore-induced plant defences. In: Chadwick DJ, Goode J (eds) Insect-Plant Interactions and induced Plant Defence. Wiley Chichester (Novartis Foundation Symposium 223) pp. 43-59
- Eckert J.W. & Natnayake M., 1994.
Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. *Phytopathology* 84, 746-750
- Kappers I.F., A. Aharoni, T.W.J.M. van Herpen, L.L.P. Luckerhoff, M. Dicke & H.J. Bouwmeester, 2005
Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. *Science* 309, 2070-2072
- Spinelli F, M. Noferini & G. Costa, 2006
Near Infrared Spectrometry (NIRS): Perspective of fire blight detection in asymptomatic plant material. *Acta Horticulturae* 704, 87-90
- Stinson J.A., J.A. Persaud & G. Bryning, 2006
Generic system for the detection of statutory potato pathogens. *Sensors and actuators B* 116, 100-106
- Tan E.S., D.C. Slaughter & J.F. Thompson, 2005.
Freeze damage detection in oranges using gas sensors
- Turner A.P.F. & M. Magan, 2004.
Electronic noses and disease diagnostics. *Nature reviews Microbiology* 2, 161-166

Detectie van larven in houtige materialen met akoestische en/of Doppler microwave scantechnieken (Termatrac).

Doelstelling

Larven van verschillende insecten leven en voeden zich in hout (boomstammen, verpakkingshout). Deze insecten zijn moeilijk te detecteren en vaak worden destructieve technieken gebruikt om hun aanwezigheid vast te stellen. Dit is met name in kostbare producten ongewenst. Wanneer een voorscreening gedaan kan worden met non-destructieve technieken, en uitsluitend in verdachte objecten op destructieve wijze vastgesteld wordt of larven van een Q-organisme aanwezig zijn, kan een efficiëntieslag gemaakt worden.

Doelstelling is om op basis van bestaande apparatuur ervaring op te doen met detectie van larven in hout. Cruciaal hierbij is om hout met en zonder larven te verkrijgen om daar metingen aan te kunnen doen onder verschillende omstandigheden. In eerste instantie is het van ondergeschikt belang met welke insectensoorten gewerkt wordt en of deze al dan niet een quarantaine status hebben.

Oorspronkelijk plan was om twee methoden te beproeven:

1. Detectie van larven op basis van Doppler microwave scantechnieken (Termatrac)
2. Akoestische detectie van larven

Het bleek helaas niet mogelijk om de Termatrac apparatuur in West Europa te gebruiken. Via de leverancier is achterhaald dat de apparatuur in Azië en Noord- en Zuid-Amerika geleverd wordt en dan alleen aan bedrijven die van de firma een licentie krijgen en gespecialiseerd zijn in het bestrijden van insectenplagen. De apparatuur kan niet worden gekocht maar wordt geleased in combinatie met een cursus die door Termatrac wordt gegeven. Ondanks verschillende pogingen is het niet gelukt de beschikking te krijgen over deze apparatuur.

Het onderzoek aan detectie van larven is daarom uitsluitend uitgevoerd met akoestische technieken. Daarnaast is een aanvullend onderwerp opgenomen: detectie van boorgangen met röntgen (zie separaat hoofdstuk).

De vooraf geformuleerde onderzoeksvragen mbt akoestische detectie zijn:

1. Wat is de kans dat met akoestische detectie een aantasting vastgesteld wordt?
2. Hoe lang moet gemeten worden om een reële kans te hebben een aantasting vast te stellen?
3. Onder welke omgevingsomstandigheden (temperatuur) is vaststelling van de aantasting mogelijk?
4. Invloed van de afstand tussen de larve en detector op de vaststelling van de aantasting
5. Economische kant: wat zijn de kosten van een meting.

Gebruikte methoden

Verzamelen van houtig materiaal met larven

De volgende acties zijn genomen om aan materiaal te komen:

- Verzamelen van openhaardhout met boorgangen van boktorren
- Contact leggen met de personen bij de PD die betrokken zijn bij inspecties voor *Anoplophora* spp.
- Volgen van instructie om te mogen werken binnen de quarantainefaciliteiten van de PD
- Contact leggen met insectenverdelgingsbedrijf
- Contact met specialisten waaronder Theodoor Heijerman (WUR) om tips te krijgen waar materiaal te bemachtigen
- Op zoek naar andere modelsystemen om de akoestische apparatuur op uit te testen.

Uiteindelijk is het volgende materiaal verkregen waaraan metingen aan materiaal met en zonder insecten gedaan zijn:

- Rijst met en zonder besmetting van rijstklanders (0.3-0.5 cm grote kevertjes, niet nader gedetermineerd)
- Berkenstammen met en zonder larven van de wilgenhoutrups *Cossus cossus*, een algemeen voorkomende inheemse soort
- Esdoornstammetjes, *Acer palmatum*, geïnfecteerd met *Anoplophora* via de PD
- *Enkianthus perulatus* met een mogelijke *Apriona* besmetting

Detectie apparatuur

Gebruik is gemaakt van de AED-2000L Termite and Insect Detection Kit van Acoustic Emission Consulting (www.aeconsulting.com), zie Figuur 2.



Figuur 2. AED-2000L Termite and Insect Detection Kit.

Het principe van het apparaat is dat een sensor in contact wordt gebracht met het substraat zodat eventuele geluiden kunnen worden waargenomen. De sensor is aangesloten op een versterker. De registratie kan worden opgeslagen en er kan met een koptelefoon realtime meegelisterd worden. De gevoeligheid van het apparaat kan aangepast worden aan de omstandigheden waarbij naar een optimale verhouding tussen gevoeligheid en achtergrondruisreductie gezocht wordt.

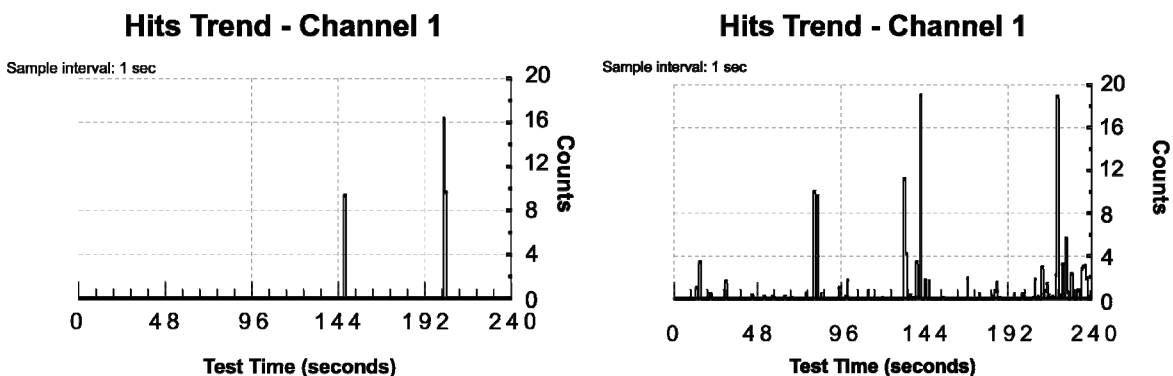
Resultaten worden weergegeven in hits en counts. Een hit is een tijdsinterval (1 msec) waarin het geregistreerde geluid boven een bepaalde drempel komt. Een count is de duur van de periode dat dit geluid aanhoudt. Bijvoorbeeld een geluid dat gedurende 4 msec boven de drempel uitkomt, levert 4 hits en 1 count.

Resultaten

Er zijn in eerste instantie metingen verricht aan een houten sigarenkistje met daarin rondwandelende taxuskevers (*Otiorhynchus sulcatus*) om gevoel voor de apparatuur te krijgen.

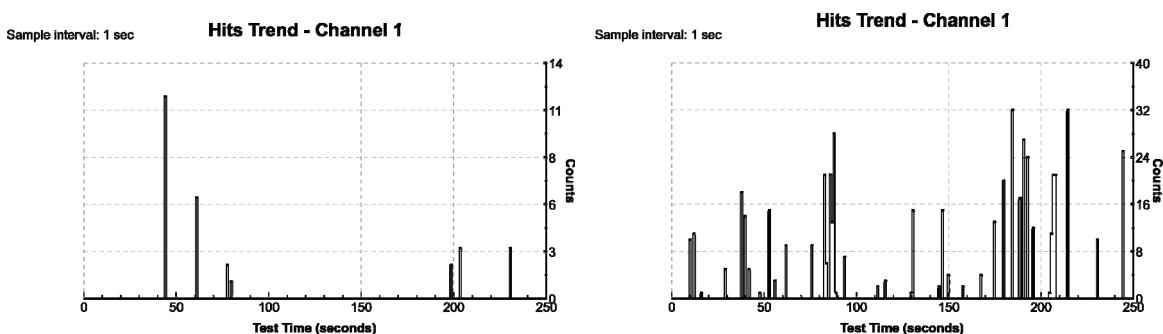
Vervolgens is een grote hoeveelheid openhaardhout, waar boorgaten van boktorren inzaten, doorgemeten. Hierbij werden geen vraatsignalen gehoord. Dit betekent dat er geen actieve larven aanwezig waren of dat de geluiden erven niet waargenomen werden. Er is voor gekozen niet op de aanwezigheid van larven te gaan controleren dmv het opzagen van de houtstukken, maar er is gekozen om eerst een stap terug te zetten en een ander systeem te kiezen waarbij duidelijk een positieve en negatieve controle aanwezig waren.

Dit systeem was een hoeveelheid rijst met en zonder rijstklanders. Rijstklanders zijn kevertjes van enkele millimeters groot die eieren leggen en zich voeden in voorraadproducten zoals rijst. De activiteit van deze insecten in de rijst kon goed worden waargenomen met de detectieapparatuur (Figuur 3).



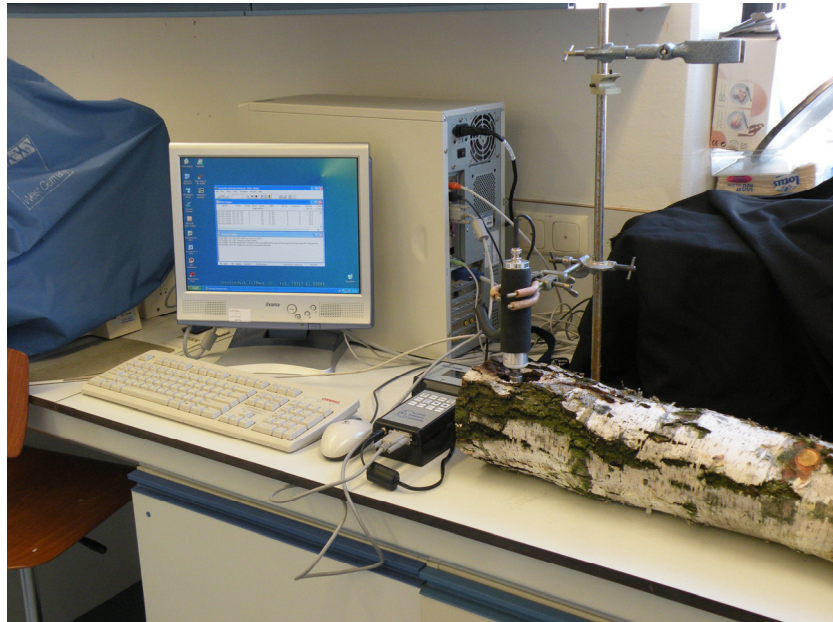
Figuur 3. Akoestische detectie in een hoeveelheid rijst zonder (boven) en met (onder) rijstklanders.

Na lang zoeken is uiteindelijk via de PD een berkenstam bemachtigd met daarin een larve van de inheemse soort *Cossus cossus*, de wilgenhoutrups. Deze rups vreet in de stam van loofbomen. Het exemplaar was ongeveer 2 cm groot en werd gedetermineerd door de PD. Het levende exemplaar kon teruggeplaatst worden in de boorgang waarna het doorging met voeden. Hierdoor was het mogelijk om metingen te doen aan dezelfde stam hout zonder en met larve (Figuur 4, 5).



Figuur 4. Akoestische detectie in berkenstam zonder (boven) en met (onder) larve van de wilgenhoutrups.

De activiteit van de larve kon gedurende enkele dagen goed worden waargenomen. Wel bleek het noodzakelijk de elektrode op korte afstand van de larve op het hout aan te brengen (enkele centimeters). In de praktijk zal het afhankelijk zijn van substraat, soort larve en grootte van de larve op welke afstand deze nog detecteerbaar is.



Figuur 5. Akoestische detectie in het lab van wilgenhoutrups in een berkenstam.

In de tweede helft van november kwam het signaal van de PD dat er twee partijen hout met mogelijke besmettingen binnen waren gekomen:

Enkianthus perulatus met een mogelijke besmetting van *Apriona* sp. En een partij esdoorns met *Anoplophora* besmetting.

Doelstelling was om bij deze partijen akoestische metingen te doen en deze waarnemingen te koppelen aan de resultaten van een destructieve detectie. Deze destructieve detectie werd uitgevoerd door medewerkers van de PD.

De *Enkianthus perulatus* monsters waren zowel in de destructieve als in de akoestische detectie allen negatief. Het ging hier om 6 monsternummers met maximaal 4 stammetjes per monster.

In de esdoorn partij werden wel larven aangetroffen. Hierdoor werd het mogelijk een vergelijking te maken tussen de resultaten van de akoestische en de destructieve detectie.

De resultaten van de akoestische metingen met behulp van de AED 2000 detector en de destructieve bepalingen zijn weergegeven in Tabel 4. Met de akoestische detector werd per monsters steeds gedurende 2 minuten continue gemeten. Het aantal hits en counts van de meting werd geregistreerd en tegelijkertijd werd met een koptelefoon geluisterd. Op basis van de waarnemingen met de koptelefoon is een beoordeling positief (insect-gerelateerde geluiden te horen) of negatief (geen insect-gerelateerde geluiden te horen).

Van de 30 destructieve bepalingen bleken er in totaal 10 positief: er werden levende larven aangetroffen. Met de akoestische detector werden hits en counts bepaald en werd tegelijkertijd met een koptelefoon geluisterd gedurende de metingen. Op basis van de laatste methode werden in totaal 18 monsters als positief beoordeeld. Opvallend is dat het gemiddelde aantal hits en counts in de negatief beoordeelde monsters in de destructieve bepaling hoger is dan in de positief beoordeelde monsters in de destructieve bepaling.

Er vanuit gaande dat de destructieve bepalingen correct zijn betekend dit dat de akoestische methode in totaal heeft opgeleverd:

- 5 juist positief
- 7 juist negatief
- 13 vals positief
- 5 vals negatief

Vals positieve uitslagen kunnen verklaard worden door:

- achtergrondgeluid dat geïnterpreteerd is als insectengeluid
- geluiden geproduceerd door niet-doel organismen in het monster (andere insecten)

Vals negatieve uitslagen kunnen verklaard worden door:

- inactieve larven
- geluiden van actieve larven die buiten de detectiegrens vallen
- misinterpretatie van geluiden van larven

Tabel 4. Resultaat van akoestische en destructieve detectie van Anoplophora larven in esdoorn.

PD Monsternr.	Plantdeel	Akoestisch			Destructief
		Audio	Hits	Counts	
4331431		-	5	77	+
4345137		-	0	0	+
4139640		+	4	10	+
4139431		+	39	271	+
4331042		-	10	110	+
4139624	stam	+	92	970	-
	stronk	+	5	34	+
4063818	stam	+	9	22	-
	stronk	+	13	112	-
4063826	stam	+	7	37	-
	stronk	-	22	372	-
4063834	stam	-	2	8	-
	stronk	-	2	8	-
4063842	stam	+	11	80	+
	stronk	-	1	8	-
4208521	stam	+	7	21	-
	stronk	-	0	0	-
4208538	stam	-	3	10	+
	stronk	-	1	5	-
4208546	stam	+	22	104	-
	stronk	+	15	97	+
4208554	stam	-	9	39	+
	stronk	+	61	711	-
4208441	stam	+	13	22	-
	stronk	-	3	34	-
4346367	boom1	+	43	387	-
	boom2	+	21	159	-
	boom5	+	6	25	-
	boom3	+	35	131	-
	boom4	+	6	36	-

Conclusies en discussie

Op basis van de uitgevoerde metingen kunnen de onderstaande conclusies getrokken worden:

1. De activiteit van larven in hout is in principe detecteerbaar met behulp van akoestische detectieapparatuur.
2. De sensor moet (tenminste in sommige gevallen) op korte afstand van de larve aangebracht worden.
3. In de hier gebruikte cases in de lab-opstellingen was een meting van 1 a 2 minuten voldoende om vast te stellen of actieve insecten aanwezig zijn.
4. Bij de metingen van een 30-tal esdoorn monsters met mogelijke besmetting met *Anoplophora* bleek een fors aantal vals positieve en vals negatieve uitslagen.
5. Er was geen sprake van een positieve correlatie tussen aantal hits/counts en aanwezigheid *Anoplophora* larven.
6. Gebruik van koptelefoon lijkt voor de praktijk de meest geëigende methode om de techniek toe te passen.
7. Vooralsnog lijkt de toegevoegde waarde voor routinematige inspecties beperkt, met name vanwege conclusie 2 en 4.

Bij de vooraf gestelde vragen kan het volgende opgemerkt worden:

1. Wat is de kans dat met akoestische detectie een aantasting vastgesteld wordt? Het experiment met de wilgenhoutrups geeft aan dat als op de juiste plek gemeten wordt de kans groot is dat het insect gedetecteerd wordt. Bij de metingen aan de partij esdoorn met *Anoplophora* was een fors aantal vals positieve en vals negatieve metingen. Op deze manier biedt akoestische detectie onvoldoende houvast.
2. Hoe lang moet gemeten worden om een reële kans te hebben een aantasting vast te stellen? De experimenten in het lab geven aan dat een meettijd van 1 tot enkele minuten voldoende is. Hoe lang in de praktijk gemeten zal moeten worden om een optimale detectiekans te hebben zal per soort en omstandigheid wisselen. Waarschijnlijk kunnen hier geen algemene uitspraken over gedaan worden.
3. Onder welke omgevingsomstandigheden (temperatuur) is vaststelling aantasting mogelijk? Dit is niet onderzocht en zal per soort verschillen. Zinvol om dit te onderzoeken met de doelsoort waarom het gaat in de praktijk (*Anoplophora* spp.)
4. Invloed van de afstand tussen de larve en detector op de vaststelling van de aantasting. In het geval van een kleine wilgenhoutrups (1 a 2 cm lang) in berkenstam ligt dit in de orde van enkele centimeters.
5. Economische kant: wat zijn de kosten van een meting. Op zich kost een meting een tot enkele minuten arbeid. De bepalende factor zal zijn hoeveel objecten op hoeveel plaatsen gemeten moeten worden. Als er om de paar centimeter metingen gedaan moeten worden dan zal inzet van deze techniek voor routinematige inspecties niet haalbaar zijn.

In Europa zijn enkele groepen bezig met onderzoek aan akoestische detectie van larven in hout. Er is contact gelegd met Martin Brandstetter van het Bundesamt für Wald in Wenen, Oostenrijk en met David Chesmore, University of York, Verenigd Koninkrijk. Beide groepen zijn bezig met ontwikkeling van detectie-apparatuur (handheld voor inspecteurs of data-loggers voor langdurige opnamen). Beide onderschrijven dat er nog onbeantwoorde vragen liggen op de gebieden:

- Specificiteit (onderscheid tussen soorten)
- Activiteit van de insecten (niet-continue vraat/beweging, niet bewegende stadia zoals eieren en poppen)
- Effect klimaat (temperatuur) op activiteit insecten

Mede door deze onduidelijkheden/beperkingen zijn ook bij deze onderzoekers geen gevallen bekend waarbij akoestische detectie-apparatuur routinematig wordt ingezet.

Aanbeveling is om aan te sluiten bij, danwel af te wachten van, verdere ontwikkeling en validatie van akoestische detectietechnologieën. Internationaal, ook in Europees verband, staat dit onderzoek de komende jaren op de agenda. Er is nog een slag nodig alvorens besloten kan worden of deze techniek een plaats verdient binnen het arsenaal aan technieken voor routinematige inspecties.

Detectie van boorgangen met Röntgenapparatuur.

Doelstelling

Vanuit de opdrachtgever LNV kwam de additionele vraag of door boktorren veroorzaakte boorgangen in hout 'zichtbaar' gemaakt kunnen worden met röntgen technologie. In eerste instantie zou hiervoor hout materiaal worden getest die ook voor de akoestische metingen met levende insecten gebruikt zouden worden. Dit materiaal was op het moment van de metingen niet beschikbaar dus er is gekozen voor materiaal dat aanwezig is bij de Plantenziektkundige Dienst. Voor het maken van de röntgenopnamen moest naar X-ray apparatuur worden gezocht die geschikt is om detail opnamen te maken van voldoende resolutie om de boorgangen zichtbaar te maken. Deze apparatuur is gevonden en wordt gebruikt in een sorteermachine: Xray apparatuur type 1. Vervolgens is er een tweede commerciële Xray apparatuur gebruikt waarmee een opname is gemaakt van meerdere stukken hout in één opname: Xray apparatuur type 2.

Binnen dit onderzoek zijn twee onderzoeksvragen opgesteld: 1) zijn boorgangen detecteerbaar met röntgen en zo ja, 2) onder welke voorwaarden zijn boorgangen detecteerbaar?

Röntgen & beeldverwerking

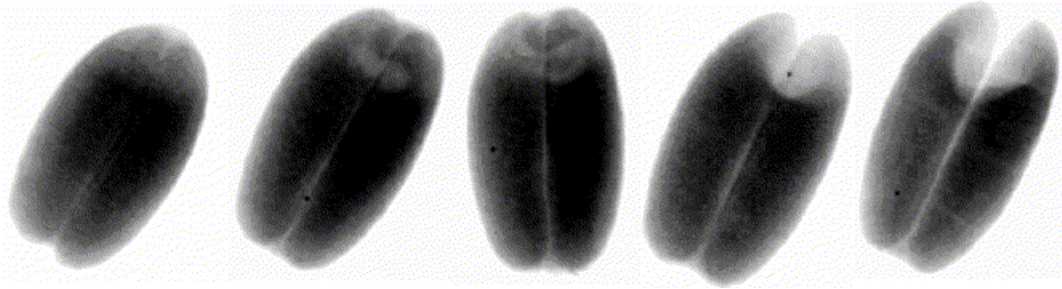
Röntgen

De Duitse natuurkundige Wilhelm Conrad Röntgen is de ontdekker van de naar hem genoemde röntgenstralen. Röntgenstraling ontstaat door botsing van snelle elektronen, d.w.z. elektronen met grote kinetische energie, op materie. De elektronen worden vrijgemaakt door verhitting van een gloeidraad. Er komen meer elektronen vrij naarmate de temperatuur van de gloeidraad hoger is. De temperatuur is afhankelijk van de sterkte van de gloeistroom die wordt geregeld met behulp van een gloeitransformator.

In het hoogspanningscircuit bevindt zich aan de ene zijde de negatieve pool: de kathode. Aan de, aan de andere zijde bevindt zich de positieve pool: de anode. De kathode bestaat uit een gloeidraad. De uit de gloeidraad vrijgemaakte elektronen worden aangetrokken door de anode. De elektronenstroom tussen gloeidraad en anode heet buisstroom, die wordt uitgedrukt in milliampère (mA). De buisstroom kan variëren van enkele tienden tot meer dan 1000 mA. Voor het ontstaan van röntgenstraling is het nodig dat de elektronen met voldoende snelheid op de materie botsen. De elektronen krijgen hun snelheid door een spanningsverschil (buisspanning) aan te brengen tussen de kathode en de anode. Naarmate het spanningsverschil tussen kathode en anode groter is, zullen de elektronen met grotere snelheid op de anode slaan en zullen meer röntgenstralen van hogere energie worden opgewerkt. Hogere energie of kwaliteit betekent: kortere golflengte, hardere straling, groter doordringend vermogen. De kwaliteit van de röntgenstralen is dus voornamelijk afhankelijk van de spanning tussen anode en kathode. De kwantiteit is zowel afhankelijk van de spanning als van de buisstroom.

De elektronen worden door een elektrisch veld gericht zodat zij op een bepaald deel van de anode terechtkomen. Dit deel van de anode, waar de röntgenstralen van uitgaan, noemen we de focus. De focusgrootte wordt dus bepaald door de grootte van de gloeidraad en door het elektrisch veld om de gloeidraad.

Omstreeks de jaren 20 werd voor het eerst gerapporteerd over het gebruik van röntgen voor detectie van insectschade in hout (Fischer and Tasker, 1945). Karunakaran *et al.* (2004) beschrijft het gebruik van röntgen voor opsporen van graankorrel beschadiging door de kastanjebruine rijstmeelkever (Figuur 6). Ook voor het inspecteren van fruit beschadiging door insecten is gebruik gemaakt van röntgen (Jiang *et al.*, 2008).

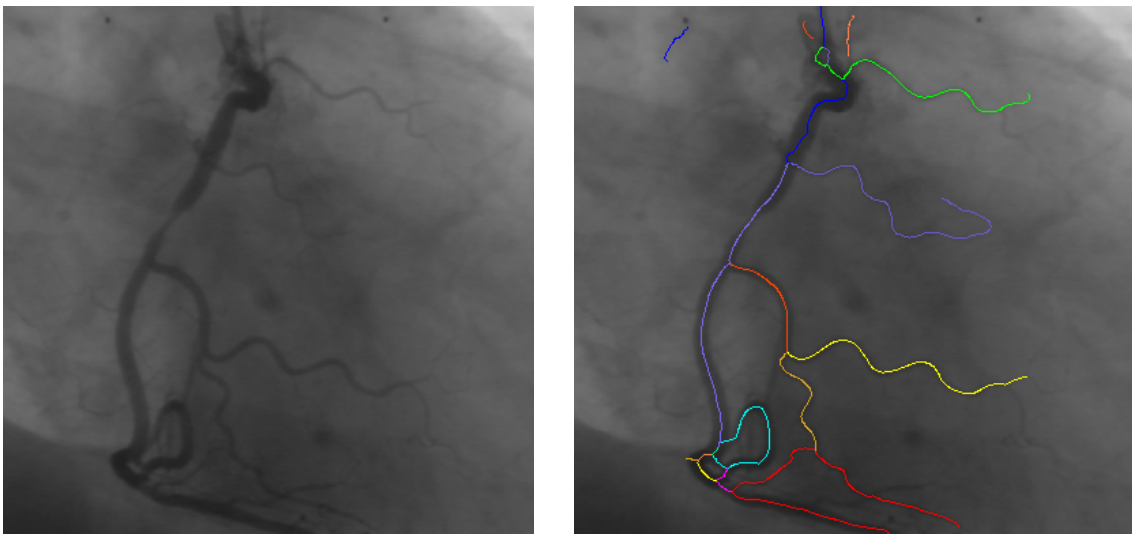


*Figuur 6. Röntgen opnamen van graankorrel beschadigd door de kastanjebruine rijstmeelkever (*Tribolium castaneum*). Bron: Karunakaran et al. (2004).*

Beeldverwerking

Röntgen is een beeldvormende techniek. Met behulp van beeldverwerking kunnen de beelden zodanig worden bewerkt dat deze door de gebruiker visueel beter kunnen worden beoordeeld. Het is hierbij mogelijk om uit de beelden kwantitatieve gegevens te verkrijgen door middel van specifieke algoritmen. Dat vergt een geïntegreerde informatietechnologische benadering. Een aantal voorbeelden geven de breedte van het veld van de beeldverwerking aan:

- Visualisatie - het snel en efficiënt genereren van nauwkeurige, betrouwbare en overzichtelijke afbeeldingen uit beeldvormende instrumenten. Dit is bijvoorbeeld van groot belang bij het toenemend aantal behandelingen in de zorg waarbij beelden worden gegenereerd (Figuur 7).
- Computer ondersteunde diagnosesystemen zijn systemen die de beelden zelfstandig kunnen interpreteren op basis van grote databases met relevante voorbeelden.



Figuur 7. Lijn detectie bij medische beeldverwerking. Zowel de positie als de relatieve diameter van de gedetecteerde lijnen wordt ingeschat. Bron: Halcon Machine Vision Technologies.

Materiaal en methoden

Houtjes

In totaal zijn 20 stukjes hout doorgemeten. Per houtje is één röntgenbeeld opgenomen. De houtjes zijn afkomstig uit de bewaring bij de plantenziektkundige dienst te Wageningen (PD). Om rotting van de houtjes te voorkomen zijn deze gedroogd. De lengtes van de houtjes variëren tussen de 3 cm en 10 cm. Een aantal boorgangen was gevuld met uitwerpselen van de boktor (Figuur 8). Naast de houtjes afkomstig van de PD, zijn twee hardhouten plankjes (85 × 20 × 12 mm) voorzien van gaten met vooraf gedefinieerde diameters. In houtje nr. 1 zijn zes gaten geboord met een diameter van 2 mm, vijf gaten met een diameter van 3 mm, twee gaten met een diameter van 4 mm en twee gaten met een diameter van 5 mm. In houtje nr. 2 zijn vijf gaten geboord met een diameter van 2 mm en vier gaten met een diameter van 3 mm. De gaten zijn dusdanig gepositioneerd dat de afstand van de gaten tot de buitenkant van de houtjes toeneemt.

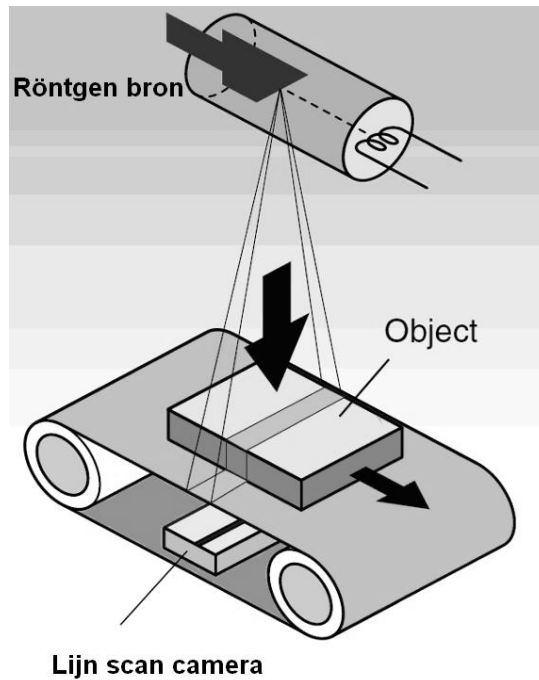


Figuur 8. Boorgang gevuld met uitwerpselen.

Röntgen opstelling

Xray apparatuur type 1

De opstelling bestaat uit een röntgen bron en een lijn scan camera. Tussen de bron en de camera wordt het object geplaatst (Figuur 9).



Figuur 9. Röntgen opstelling. Bron: Hamamatsu.

De technische specificaties van de röntgen opstelling zoals gebruikt in dit onderzoek staan vermeld in Tabel 5.

Tabel 5. Technische specificaties van de röntgen opstelling gebruikt binnen dit onderzoek.

Specificatie	Waarde
Type camera	Hamamatsu C9750-07EC
Kleurendiepte	256 kleuren (8 bits per kleur)
Pixel pitch	0.8 mm (96 dots per inch)
Maximale scan breedte*	7372.8 mm
Buisspanning	50 kV
Buisstroom	6,5 – 8,5 mA
Max snelheid	100 m min ⁻¹ bij een pixel pitch van 0.4 mm
Tijd per opname	40 sec

* Bij een pixel pitch van 0.8 mm.

Xray apparatuur type 2

Van deze röntgen apparatuur zijn geen gegevens beschikbaar. Het gaat hier om vertrouwelijke informatie. Wel is bekend dat het commerciële apparatuur betreft die van groter voorwerpen röntgen opnamen kan maken.

Beeldverwerking

De röntgenbeelden geven grijswaarden weer. Visuele weergaven van deze beelden geven een eerste indruk van eventuele verschillen in grijswaarden –contrasten– op plaatsen van de boorgangen. De grijswaarden zijn gekwantificeerd op een doorsnede van een afbeelding om een indruk te krijgen van de absolute verschillen op plaatsen van boorgangen. Vervolgens is een meer geavanceerde beeldverwerking toegepast. Voor deze

beeldverwerking is gebruik gemaakt van het software pakket Halcon versie 9.0.1 (MVTec Software GmbH, Munich, Germany). Een standaard routine is gebruikt om te zoeken naar boorgangen in de röntgen afbeelding. Met behulp van 'trial and error' is deze routine vooraf geparameteriseerd (Tabel 6). De lijn extractie is uitgevoerd middels het fitten van een kwadratische polynoom en gebruikmaking van afgeleiden.

Tabel 6. Gebruikte parameter waarden bij het zoeken naar lijnen in de röntgen afbeeldingen.

Parameter	Waarde
Sigma	1.6
Low	0
High	0.8
Correctpositions	True
Completejunctions	True

Resultaten

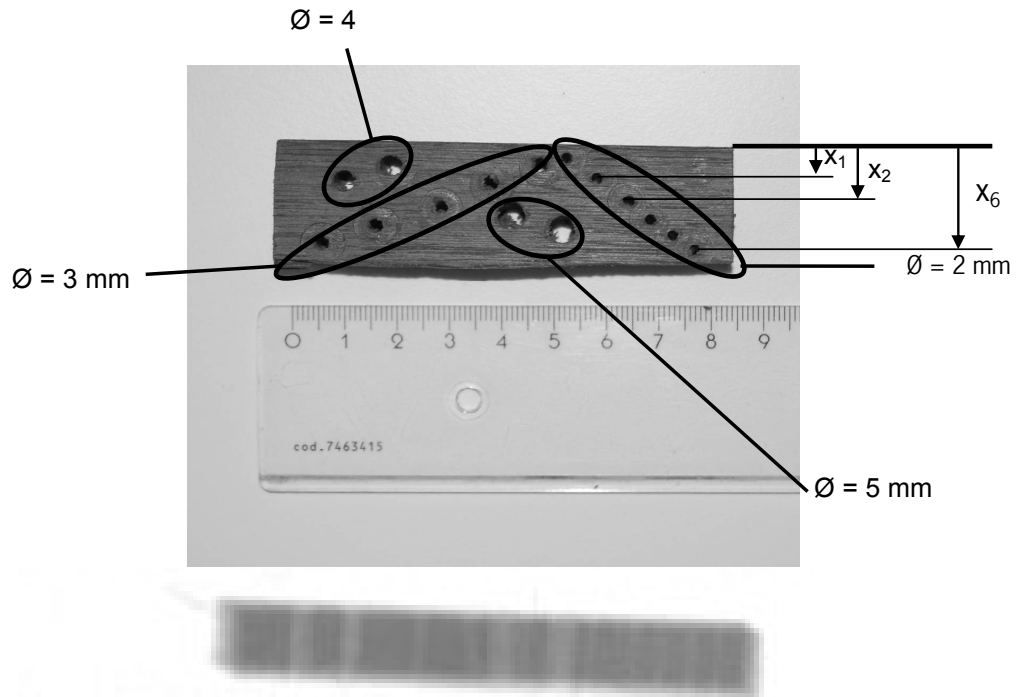
Röntgen opnamen van individuele stukken hout

In het overgrote deel van de röntgen opnamen zijn op de plek van de boorgang, scherpe overgangen in grijswaarden zichtbaar (Figuur 10).



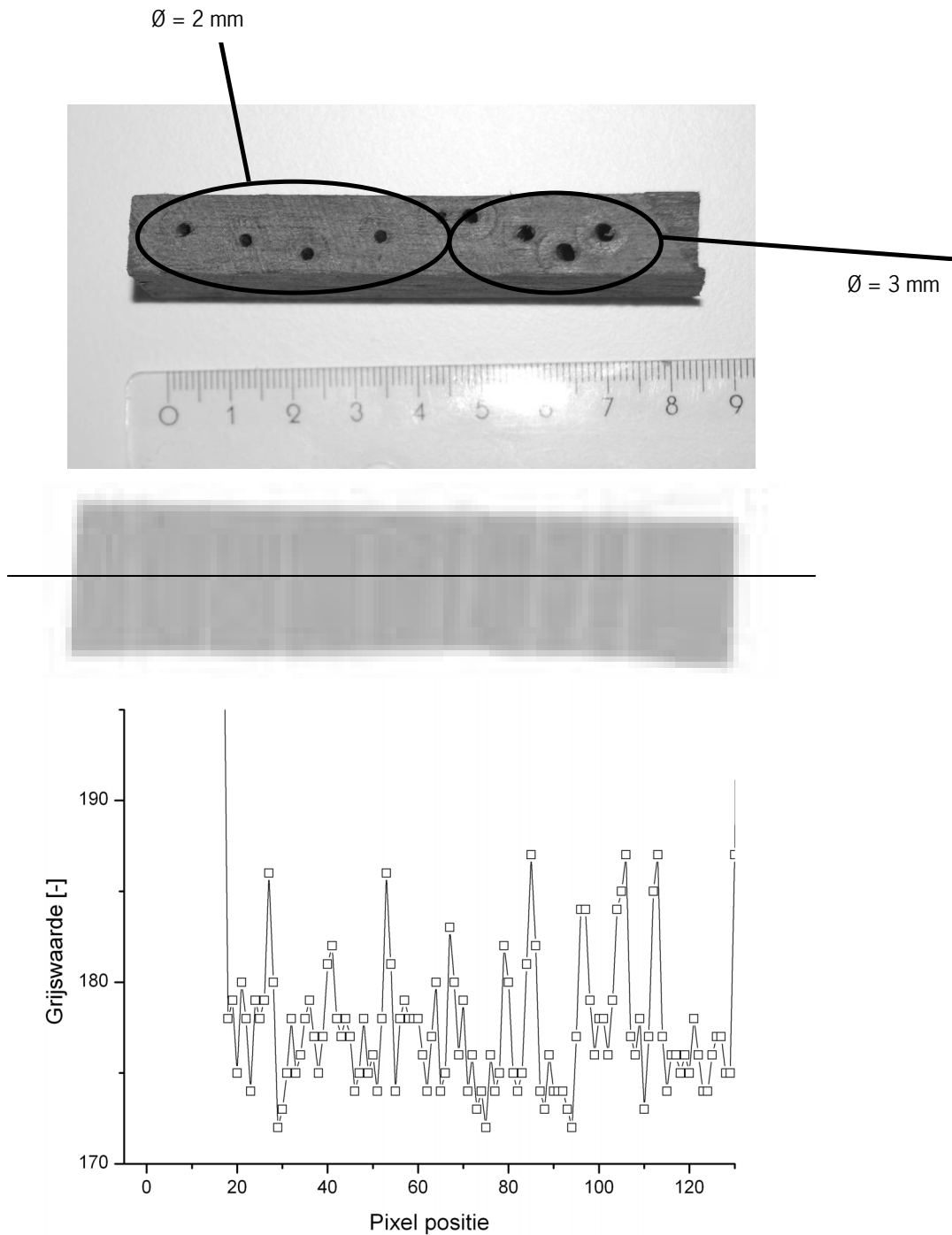
Figuur 10. Links: röntgen opname met duidelijk zichtbaar de scherpe overgangen in grijswaarden op de plaats van de boorgang. Rechts: foto's van het voor- en bovenaanzicht van het bijbehorend houtstuk met duidelijk zichtbaar de boorgang (Xray apparatuur type 1).

Ook bij de twee houtjes met voorgeboorde gaten zijn contrasten zichtbaar. Gaten met een diameter van 2, 3, 4 en 5 mm zijn zichtbaar in de röntgen opnamen (Figuur 11 en Figuur 12). De contrastverschillen zijn nauwelijks afhankelijk van de afstand tussen de buitenzijde van het houtje en het centrum van het gat (X_1 , $X_2 \dots X_6$).



Figuur 11. Boven: houtje nr. 1 met voorgeboorde gaten van 2, 3, 4, en 5 mm diameter; Onder: bijbehorende röntgen opname (Xray apparatuur type 1).

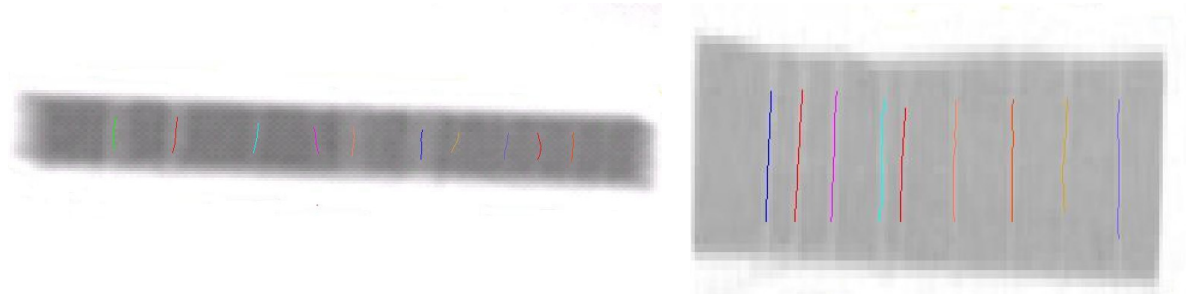
De grijswaarden zijn gekwantificeerd op een doorsnede van een afbeelding om een indruk te krijgen van de absolute verschillen op plaatsen van gaten (Figuur 12).



Figuur 12. Boven: houtje nr. 2 met voorgeboorde gaten van 2 en 3 mm diameter; midden: bijbehorende röntgen opname met doorsnede lijn; onder: grijswaarden op doorsnede lijn (Xray apparatuur type 1).

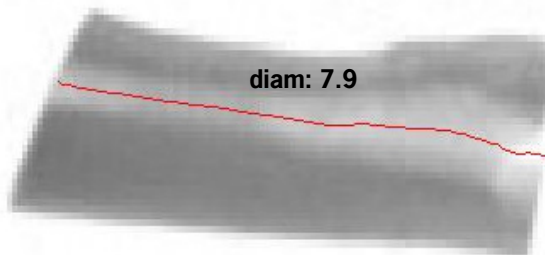
Beeldverwerking

In houtje nr. 1 worden tien van de vijftien gaten automatisch gedetecteerd. Met name gaten met een diameter van 2 mm blijken moeilijk detecteerbaar. In houtje nr. 2 worden alle negen vooraf gedefinieerde gaten gevonden (Figuur 13). Tevens kan de relatieve diameter van de gaten worden geschat.



Figuur 13. Automatische detectie en kwantificatie van zelf gedefinieerde gaten met behulp van Halcons' lijn detectie. Links: houtje nr. 1; rechts: houtje nr. 2.

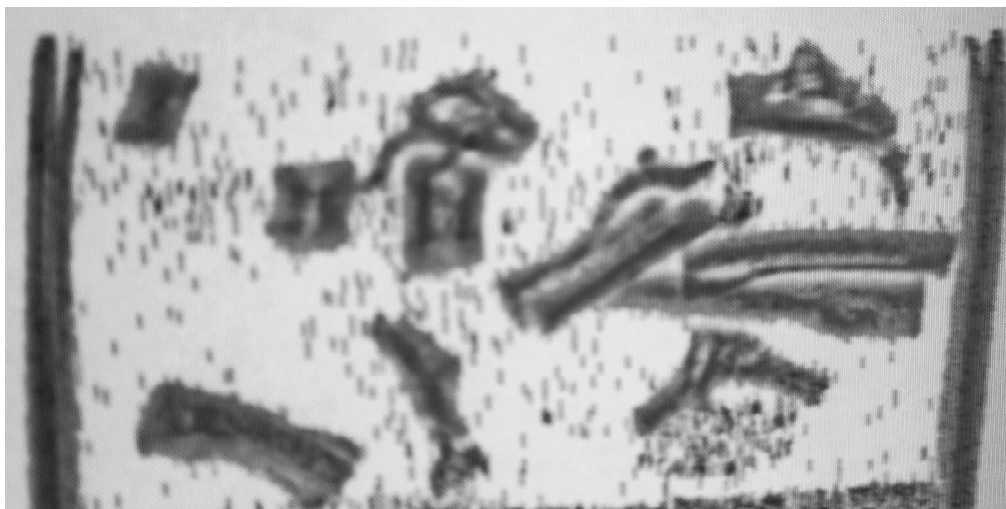
In een aantal houtjes wordt met behulp van beeldverwerking de boorgang automatisch gedetecteerd en gekwantificeerd (Figuur 14).



Figuur 14. Voorbeeld van automatische detectie en kwantificatie van boorgang met behulp van Halcons' lijn detectie (Xray apparatuur type 1).

Röntgen opnamen van meerdere stukken hout

Met Xray apparatuur type 2 is een opname gemaakt van meerdere stukken hout. De opname is gemaakt met meerdere stukken hout in het beeld. In de röntgen opname zijn op de plekken van de boorgangen, scherpe overgangen in grijswaarden zichtbaar. Ook met deze röntgen apparatuur zijn de boorgangen zichtbaar te maken (Figuur 15).



Figuur 15. Röntgen opname van meerdere stukken hout in één opname (Foto van beeldscherm en vervolgens beeldverwerking toegepast voor optimalisatie van het contrast). Op de plaats van de boorgangen zijn overgangen in grijswaarden zichtbaar.

Discussie & conclusie

Uit de resultaten van het hier beschreven onderzoek blijkt dat boorgangen detecteerbaar zijn met röntgen. De röntgen opnamen zijn gemaakt met één vaste buisspanning en buisstroom. Beide parameters hebben een effect op het te bereiken contrast. Het is daarom aan te bevelen om het effect van beiden parameters op contrast in kaart te brengen. Naast een hoog contrast, heeft een hoge resolutie van het beeld vermoedelijk een positief effect op de detecteerbaarheid van boorgaten. Experimenten met een hogere resolutie camera zijn dan ook aan te raden. Vermoedelijk zal het uiteindelijk gaan om relatieve contrastverschillen omdat ook de dikte van het voorwerp invloed heeft op het contrast.

Het is aan te bevelen om bij eventuele toekomstige experimenten röntgen opnamen te maken van vooraf gedefinieerde meetobjecten. Hierbij kan gedacht worden aan vooraf gedefinieerde houtsoorten, variaties in het vochtgehalte van het hout, variaties in de lengte en dikte van de meetobjecten en variaties in de lengte, vorm en diameter van de gaten. Bij de in dit rapport beschreven experimenten waren geen boktor larven aanwezig in het hout. In de praktijk kunnen dergelijke larven wel aanwezig zijn. Het is aan te raden om opnamen te maken van houtjes met daarin aanwezig de boktor larven. In verder onderzoek is het aan te raden om meerdere beelden per houtje te maken waarbij het houtje in verschillende posities is geplaatst.

Het is aan te raden om röntgen opnamen te maken van houtjes waarin andere type van aantasting aanwezig zijn. Hierbij kan gedacht worden aan rotte plekken door schimmels. Ook houtborende insecten zoals de populierenboktor en horzelminder bij populier en de wilgenhoutrups bij vele boomsoorten kunnen verwarring geven doordat ze boorgangen veroorzaken van gelijke grootte.

Een belangrijk punt van onderzoek is de beeldverwerking. Voorwaarden voor detectie en kwantificatie van de boorgang bij de hier onderzochte houtjes lijken: voldoende contrast van de gang en een voldoende lengte van de gang.

Het toevoegen van een extra sensor aan het systeem zal extra informatie over het hout opleveren. Gedacht kan worden aan het toevoegen van een digitale camera om hiermee te zoeken naar uitvliegopeningen. Met behulp van een 3-D camera is het mogelijk om de dikte van het houtje te bepalen. Deze informatie kan vervolgens gebruikt worden om te corrigeren voor contrast wijzigingen ten gevolgen van veranderingen in dikte.

Met het hier gebruikte röntgenapparaat mogen de hout stukken maximaal 720 × 96 mm zijn. Grotere röntgenapparaten zijn wel beschikbaar zoals bijvoorbeeld in gebruik op luchthavens. Ook wordt draagbare röntgenapparaten ontwikkeld. Deze worden gebruikt op boerderijen voor het vaststellen van dracht. Dergelijk apparatuur kan eventueel in het veld worden ingezet voor detectie van boorgaten in levende bomen en struiken.

Door de toenemende handel met handel met Aziatische landen waaronder China is de kans op een ontsnapping van kevers uit houten verpakkingsmateriaal en daarmee de kans op vestiging in Nederland aanzienlijk toegenomen. Een oorzaak van deze verspreiding is het toenemende reis- en handelsverkeer waarmee organismen, zoals de boktor, 'meeliften'. De kans op verspreiding van ongewenste organismen wordt hierdoor steeds groter. Met behulp van röntgen lijkt het mogelijk om vooraf risicovolle objecten te scannen. Door gebruik van beeldverwerking lijkt het tevens mogelijk om de boorgangen automatisch te detecteren en te kwantificeren. Andere houtsoorten en andere type aantasting dienen te worden onderzocht om de haalbaarheid verder in kaart te brengen.

Literatuur

Cruvinel, P.E., J.d.M. Naime, M. Borges & A. Macedo, 2008.

Application of X-Ray technique in nondestructive evaluation of euralypt wood. *Ciencia y tecnologia* 10, 139-149.

Fischer, R.C. & H.S. Tasker, 1945.

The detection of wood-boring insects by means of X-rays. *Annals of applied biology* 27, 92-100.

Jiang, J.-A., H.-Y. Chang, K.-H. Wu, C.-S. Ouyang, M.-M. Yang, E.-C. Yang, T.-W. Chen & T.-T. Lin, 2008.

An adaptive image segmentation algorithm for X-ray quarantine inspection of selected fruits. *Computers and Electronics in Agriculture* 60, 190-200.

Karunakaran, C., D.S. Jayas & N.D.G. White, 2004.

Identification of Wheat Kernels damaged by the Red Flour Beetle using X-ray Images. *Biosystems Engineering* 87, 267-274.

Aanbevelingen naar aanleiding van fase 2

Fase twee heeft het doel gehad de potentie, haalbaarheid en beperkingen van een drietal detectietechnieken voor routinematige inspecties in beeld te brengen, ondersteund door experimentele gegevens en *hands-on* ervaringen. De verschillende hoofdstukken zijn afgesloten met conclusies en aanbevelingen. Deze kunnen als volgt samengevat worden.

Geurdetectie aangetast materiaal:

Potentie

Potentie om aangetaste/verdachte partijen te identificeren. In de onderzochte cases bleek aangetast materiaal een afwijkend geurpatroon te hebben (zowel kwalitatief als kwantitatief).

Beperking

Soortspecifieke detectie zal afhankelijk van de gekozen pathogeen-plantinteractie wel of niet mogelijk zijn. Dit zal per geval bepaald moeten worden. In het geval van sinaasappel en *Guinardia* is soortspecifieke detectie onwaarschijnlijk. De bredere wetenschappelijke literatuur toont voorbeelden bij andere waardplant x pathogeeninteracties waarbij wel specifieke detectie mogelijk is.

Toepassingsgebied

Toepassingsmogelijkheden met name bij bulkproducten (containers/dozen met fruit) zowel na aankomst op locaties als tijdens transport.

Vervolgonderzoek

Vervolgonderzoek zou zich moeten richten op inventarisatie van pathogeen-plant interacties waarbij specifieke detectie gewenst en mogelijk is. Vervolgens opschaling richting praktijksituaties, robuustheid, specificiteit en bepalen van de meest geëigende meetapparatuur voor de praktijk (micro-GC).

Akoestische detectie insectenlarven

Potentie

Wanneer larven actief zijn en op de juiste plaats gemeten wordt is in korte tijd, non-destructief vast te stellen of larven aanwezig zijn

Beperking

De voornaamste beperkingen zijn: 1) vals-negatieve metingen door inactiviteit larven of ontwikkelingsstadia (eieren, poppen), 2) vooralsnog niet soortspecifiek, 3) meting per individueel object nodig, 4) achtergrondruis en signalen van niet-doel organismen leiden tot vals-positieve metingen.

Toepassingsgebied

Op dit moment lijkt het belangrijkste toepassingsgebied metingen aan zeer waardevolle bomen waarbij het ongewenst/onacceptabel is een destructieve meting te doen. Routinematig gebruik voor inspecties lijkt nog niet aan de orde.

Vervolgonderzoek

Zowel binnen als buiten Europa wordt gewerkt aan het in kaart brengen en oplossen van de beperkingen. Aanbeveling is bij dit onderzoek aan te haken of de resultaten af te wachten, om op basis daarvan te besluiten of de techniek ingepast dient te worden binnen routinematige inspecties.

Röntgen detectie boorgangen

Potentie

Goede mogelijkheden om individuele objecten te screenen op aanwezigheid boorgangen veroorzaakt door keverlarven.

Beperking

Voornaamste beperking is dat vooralsnog de techniek niet soortspecifiek is.

Toepassingsgebied

Inspecties van individuele objecten. Automatisering lijkt goed mogelijk.

Vervolgonderzoek

Vervolgonderzoek dient zich te richten op robuustheid (verschillende materialen, houtsoorten, diktes, en onderscheid van andere soorten aantasting (schimmels)). Goede mogelijkheden voor onderzoek aan vergaande automatisering m.b.t. detecteren en kwantificeren.

De resultaten en aanbevelingen van het fase 2 onderzoek zijn in een workshop op 14 januari 2010 bij de Plantenziektenkundige Dienst aan een panel van deskundigen en betrokkenen gepresenteerd.

