

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mia LIČEN

**TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA IN
KARAKTERIZACIJA GLIV, KI OKUŽUJEJO
SUŠENE MESNINE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mia LIČEN

**TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA GLIV,
KI OKUŽUJEJO SUŠENE MESNINE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**TAXONOMIC IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
FUNGI THAT CONTAMINATE FERMENTED MEAT**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani in s pomočjo prof. dr. Jensa Christiana Frisvada z Danske na Technical University of Denmark, Department of Systems Biology, Lyngby, ki je omogočil izvedbo analize profila sekundarnih metabolitov (Poglavje 4.3).

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je na seji dne, 5.9.2006 za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico asist. dr. Silvo Sonjak in za recenzenta prof. dr. Petra Rasporja.

Mentorica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN

Somentorica: asist. dr. Silva SONJAK

Recenzent: prof. dr. Peter RASPOR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: asist. dr. Silva SONJAK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela, razen analize profila sekundarnih metabolitov z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (str. 70), ki so ga opravili na Danskem na Technical University of Denmark, Department of Systems Biology, Lyngby.

Mia Ličen

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 637.524/.525: 579.24: 615.917 (043) = 163.6
- KG mesni izdelki/sušeni mesni izdelki/kontaminacija mesnih izdelkov/glive/mikotoksini/*Aspergillus/Cladosporium/Eurotium/Penicillium*/sol-izvor kontaminacije
- AV LIČEN, Mia
- SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/SONJAK, Silva (somentorica)/RASPOR, Peter (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2008
- IN TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA GLIV, KI OKUŽUJEJO SUŠENE MESNINE
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XV, 110 str., 11 pregl., 14 sl., 5 pril., 104 vir.
- IJ sl
- JI sl
- AI Različne vrste suhega mesa, kot so pršut, suha vratina, pleče, suha mesnata slanina in druge, predstavljajo pomembno skupino izdelkov mesne industrije. Fermentacija mesa poteka s pomočjo aktivnosti mikroorganizmov, mesnine pa se pogosto okužijo tudi z nezaželenimi mikroorganizmi, zlasti z različnimi nitastimi glivami. Običajno prisotna mikrobiota fermentiranih mesnih izdelkov so predvsem različne vrste iz rodu *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium* in *Scopulariopsis* ter druge psihrotolerantne in kserofilne vrste. Mnoge vrste teh rodov so znane tudi po tem, da lahko proizvajajo različne mikotoksine. Pravilna klasifikacija in identifikacija gliv na nivoju vrste je zato zelo pomembna. V okviru diplomskega dela smo vzorčili tri različne mesne izdelke na dveh proizvodnih lokacijah. Vzorčili smo tudi sol in zrak. S površine mesnin smo izolirali nitaste glive iz rodov *Aspergillus*, *Eurotium*, *Cladosporium* in *Penicillium*, ki smo jih identificirali na podlagi makromorfologije, mikromorfologije, profila sekundarnih metabolitov in nukleotidnega zaporedja dela ITS1-5,8S rDNA-ITS2 regije DNA in dela zaporedja gena za β -tubulin. Kot dominantno nitasto glivo smo izolirali seve vrste *Penicillium nordicum*, ki je znana po tem, da proizvaja mikotoksin ohratoksin A. Proizvodnjo ohratoksina A smo potrdili s HPLC analizo pri treh sevih. Za določitev populacijske strukture izolatov in za identifikacijo njihovega izvora smo seve vrste *P. nordicum* analizirali z metodo polimorfizma dolžin pomnoženih delov (AFLP). Rezultati so pokazali, da je med izolati zelo majna genetska variabilnost in da je vir kontaminacije s sevi vrste *P. nordicum* sol, ki se uporablja v proizvodnji sušenih mesnin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 637.524/.525: 579.24: 615.917 (043) = 163.6
- CX meat products/dried meat products/contamination of meat products/fungi/ mycotoxins/
Aspergillus/Cladosporium/Eurotium/Penicillium/salt-contamination source
- AU LIČEN, Mia
- AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/SONJAK, Silva (co-advisor)/RASPOR, Peter (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2008
- TI TAXONOMIC IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FUNGI THAT CONTAMINATE FERMENTED MEAT
- DT Graduation thesis (University Studies)
- NO XV, 110 p., 11 tab., 14 fig., 5 ann., 104 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB A vast range of fermented meat products like prosciutto, smoked neck, dried ham, pork belly and other are of great importance to the food industry worldwide. Fermented meats are those meats produced by the modification of raw material of animal origin by the activities of microorganisms. In the manufacture of fermented meats growth of undesired microorganisms like moulds is common. The associated fungi in naturally fermented meats are species of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* and others. Most mould species involved in meat fermentation are psychrotolerant and xerophilic species. Many fungi in the associated mycobiota of fermented meats are known to produce mycotoxins. Correct classification and identification at the species level is important, in order to be able to prevent mycotoxin formation. In this research three batches of different fermented meat products from two different production plants were sampled. Air and salt samples were also taken. Isolates identified as species from the genera *Aspergillus*, *Eurotium*, *Cladosporium* and *Penicillium* were isolated from the surface of the examined meats. Isolates were identified at the species level after macro- and micromorphological characterization, analyses of the profile of secondary metabolites and after sequencing of the partial ITS1-5,8S-ITS2 rDNA and partial β -tubulin gene. The dominant species was the ochratoxin A producing species *Penicillium nordicum*. Ochratoxin production was determined by HPLC method in three strains. To reveal the population structure and the origin of the dominant species of *P. nordicum*, amplified length polymorphism AFLP was used. The results showed a low degree of genetic polymorphism. The origin of the dominant species resulted to be the salt used in the production of the fermented meats.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 UVOD	1
1.2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROIZVODNJA SUŠENIH MESNIN	3
2.1.1 Sušene klobase - salame kot primer postopka proizvodnje sušenih mesnin.	4
2.1.2 Vloga soli in razsoljevanja v proizvodnji sušenih mesnin	4
2.1.2.1 Začimbe	5
2.1.3 Temperaturni režim v proizvodnji sušenih mesnin	6
2.2 NITASTE GLIVE V PROIZVODNJI SUŠENIH MESNIN	7
2.2.1 Vpliv nitastih gliv na fermentacijo	7
2.2.1.1 Pozitiven učinek nitastih gliv na proizvodnjo sušenih mesnin.....	8
2.2.1.2 Negativen učinek nitastih gliv na proizvodnjo sušenih mesnin	9
2.2.2 Dejavniki rasti nitastih gliv	9
2.2.2.1 Kserofilne glive	10
2.2.2.2 Psihofilne in psihrotolerantne glive.....	11
2.2.3 Mikotoksini	11
2.2.3.1 Ohratoksin A	12
2.2.4 Najpogostejši rodovi nitastih gliv v proizvodnji sušenih mesnin	13
2.2.4.1 Rod <i>Penicillium</i>	13
2.2.4.2 Rod <i>Aspergillus</i>	14

2.2.4.3 Rod <i>Eurotium</i>	15
2.2.4.4 Rod <i>Cladosporium</i>	16
2.3 METODE ZA IDENTIFIKACIJO NITASTIH GLIV	17
2.3.1 Morfologija.....	17
2.3.2 Kemotaksonomija.....	17
2.3.3 Fiziologija	18
2.3.4 Molekularno genetske metode.....	18
2.3.4.1 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP)	19
3 MATERIALI IN METODE DELA.....	21
3.1 KEMIKALIJE, REAGENTI IN DRUGI PRIPOMOČKI	22
3.1.1 Kemikalije in reagenti.....	22
3.1.2 Laboratorijski pribor	23
3.1.3 Naprave in drugi pripomočki.....	24
3.2 UPORABLJENA GOJIŠČA, RAZTOPINE, MEŠANICE, PUFRI IN GELI	25
3.2.1 Gojišča	25
3.2.1.1 Izolacijska gojišča	25
3.2.1.2 Identifikacijska gojišča.....	26
3.2.1.3 Tekoče gojišče za izolacijo DNA	29
3.2.2 Raztopina za suspenzijo spor	29
3.2.3 Mešanica silikagela	29
3.2.4 Pufri	30
3.2.5 Geli za analizo DNA	31
3.3 UPORABLJENI VZORCI IN VZORČENJE	32
3.3.1 Vzorčenje sušenih mesnin	32
3.3.1.1 Izdelek št. 1	33
3.3.1.2 Izdelek št. 2.....	33
3.3.1.3 Izdelek št. 3.....	34
3.3.2 Vzorčenje zraka	35
3.3.3 Vzorčenje soli.....	35
3.4 TAKSONOMSKE ANALIZE	36

3.4.1 Morfološke analize	36
3.4.1.1 Makromorfološki opis	36
3.4.1.2 Mikromorfološki opis	37
3.4.1.3 Identifikacija.....	37
3.4.2 Molekularno genetske taksonomske analize	37
3.4.2.1 Izolacija genomske DNA	38
3.4.2.2 Pomnoževanje dela zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 in dela zaporedja gena za β -tubulin z verižno reakcijo s polimerazo.....	39
3.4.2.3 Gelska elektroforeza.....	41
3.4.2.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja.....	42
3.4.3 Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP)	42
3.4.3.1 Restrikcija genomske DNA	42
3.4.3.2 Priprava adapterjev	43
3.4.3.3 Ligacija	44
3.4.3.4 Predhodno pomnoževanje	44
3.4.3.5 Pomnoževanje.....	45
3.4.3.6 Priprava vzorcev in poliakrilamidna gelska elektroforeza	46
3.4.3.7 Analiza gela	47
3.4.4 Analiza profila sekundarnih metabolitov z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC)	47
4 REZULTATI	48
4.1 OPIS STANJA ODVZETIH VZORCEV IN PREVERJANJE PRISOTNOSTI KVASOVK TER RAZLIČNIH RODOV NITASTIH GLIV	48
4.1.1 Opis stanja vzorcev izbranih sušenih mesnin pred izolacijo	48
4.1.1.1 Izdelek št. 1 - opis stanja po pregledu petih paralelk vzorcev	49
4.1.1.2 Izdelek št. 2 - opis stanja po pregledu petih paralelk vzorcev	49
4.1.1.3 Izdelek št. 3 - opis stanja po pregledu petih paralelk vzorcev.....	50
4.1.2 Kvasovke in različni rodovi nitastih gliv izolirani s površin sušenih mesnin	51
4.1.3 Različni rodovi nitastih gliv prisotni v vzorcih soli	52
4.1.4 Različni rodovi nitastih gliv prisotni v vzorcih iz zraka	53

4.2 IDENTIFIKACIJA IZOLATOV DO VRSTE	53
4.2.1 Morfološka analiza izolatov	54
4.2.1.1 Morfološka analiza izolatov iz rodu <i>Aspergillus</i>	54
4.2.1.2 Morfološka analiza izolatov iz rodu <i>Eurotium</i>	55
4.2.1.3 Morfološka analiza izolatov iz rodu <i>Penicillium</i>	57
4.2.3 Analiza nukleotidnega zaporedja	66
4.2.4 Rezultati identifikacije izolatov izoliranih s površine sušenih mesnin	67
4.2.5 Pojavnost posameznih vrst iz rodu <i>Penicillium</i> v soli in zraku	69
4.3 ANALIZA PROFILA SEKUNDARNIH METABOLITOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO (HPLC)	70
4.4 ANALIZA POPULACIJE IZOLIRANIH SEVOV <i>PENICILLIUM NORDICUM</i> Z METODO POLIMORFIZMA DOLŽIN POMNOŽENIH DELOV	70
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	73
5.1 RAZPRAVA	73
5.1.1 Mikrobiota sušenih mesnin	73
5.1.2 Dominantna vrsta <i>Penicillium nordicum</i>	76
5.1.3 Genotipizacija izolatov vrste <i>Penicillium nordicum</i>	78
5.1.4 Analiza tveganja in hipotetični ukrepi	80
5.2 SKLEPI	83
6 POVZETEK	84
7 VIRI	85
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti, ki vplivajo na sprejemljivost prisotnosti nitastih gliv pri mesni fermentaciji (Campbell Platt, 1995).	8
Preglednica 2: Uporabljene kemikalije in reagenti.....	22
Preglednica 3: Časovni potek vzorčenja izbranih sušenih mesnin.....	33
Preglednica 4: Ključ za identifikacijo vrst iz rodu <i>Eurotium</i> (Frisvad, 2006)	38
Preglednica 5: Lastnosti rasti različnih morfoloških tipov izolatov iz rodu <i>Eurotium</i> po štirinajstih dneh inkubacije.....	56
Preglednica 6: Širine in dolžine taksonomsko pomembnih mikromorfoloških struktur izmerjenih pod fazno kontrastnim mikroskopom.....	65
Preglednica 7: Seznam izolatov vključenih v analizo nukleotidnega zaporedja in rezultati primerjave določenih zaporedij z zaporedji v bazi podatkov GeneBank.....	67
Preglednica 8: Število identificiranih izolatov določene vrste / rodu z izdelka št. 1 glede na čas vzorčenja.	68
Preglednica 9: Število identificiranih izolatov določene vrste / rodu z izdelka št. 2 glede na čas vzorčenja.	68
Preglednica 10: Število identificiranih izolatov določene vrste / rodu z izdelka št. 3 glede na čas vzorčenja.....	69
Preglednica 11: Profili sekundarnih metabolitov izbranih izolatov določenih s HPLC metodo.	70

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna zgradba ohratoksina A (Richard, 2007).	13
Slika 2: Hodogram poteka dela.	21
Slika 3: Odvzem vzorcev pri izdelku št. 1 (sušena mesnina v ovoju in izdelku št. 3 (sušena klobasa v ovoju).	34
Slika 4: Odvzem vzorcev pri izdelku št. 2 (dimljena sušena mesnina brez ovoja)	35
Slika 5: Lokacija naleganja oligonukleotidnih začetnikov (Glass in Donaldson, 1995).....	40
Slika 6: Lestvica ocene preraščenosti površin sušenih mesnin z glivami	48
Slika 7: Delež nitastih gliv in kvasovk izoliranih s površin izdelka št. 1 (sušena mesnina v ovoju), izdelka št. 2 (dimljena sušena mesnina brez ovoja) in izdelka št. 3 (sušena klobasa v ovoju).	51
Slika 8: Izgled vzorcev soli po filtraciji in sedmih dneh inkubacije na gojišču MEA + 5 % NaCl + CH pri 15 °C v temi.	52
Slika 9: <i>Penicillium nordicum</i> (sev EX-F 2792) na identifikacijskih gojiščih.....	59
Slika 10: <i>Penicillium</i> sp. 1 (sev EX-F 2793) na identifikacijskih gojiščih.	62
Slika 11: <i>Penicillium</i> sp. 2 (sev EX-F 2794) na identifikacijskih gojiščih	63
Slika 12: <i>Penicillium</i> sp. 3 (sev EX-F 2791) na identifikacijskih gojiščih	64
Slika 13: Mikromorfološke strukture vrst iz rodu <i>Penicillium</i>	66
Slika 14: Kladogram narejen na podlagi matrike podobnosti profilov AFLP.....	71

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije	95
Priloga B: Rezultati meritev premerov kolonij izbranih izolatov uvrščenih v rodova <i>Penicillium</i> in <i>Aspergillus</i>	104
Priloga C: Rezultatii meritev premerov kolonij izbranih izolatov uvrščenih v rod <i>Eurotium</i>	106
Priloga D: Nukleotidna zaporedja dela gena za β -tubulin za izbrane seve	107
Priloga E: Nukleotidna zaporedja odseka ITS1-5,8S rDNA-ITS2 za izbrane seve	108

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
<i>A. versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih delov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
a_w	vodna aktivnost
BEN	Balkanska endemična nefropatija (ang. Balcan Endemic Nephropathy)
BLAST	osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
C	citozin
CH	kloramfenikol (ang. chloramfenicol)
CREA	agar s kreatinom in saharozo (ang. Creatine sucrose agar)
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
$\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	bakrov sulfat (IV) heptahidrat
CY20S	Czapkov agar s kvasnim ekstraktom in z 20 % saharoze (ang. Czapek yeast extract with 20 % sucrose)
CY40S	Czapkov agar s kvasnim ekstraktom in s 40 % saharoze (ang. Czapek yeast extract with 40 % sucrose)
CYA	Czapkov agar s kvasnim ekstraktom (ang. Czapek yeast autolysate agar)
dH_2O	destilirana voda
ddH_2O	bidestilirana voda
DG-18	dikloran 18 % glicerol agar (ang. Dichloran 18 % glycerol agar)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
E (E-vrednost)	pričakovana vrednost (ang. Expectation value)
EDTA	etildiaminotetrocetna kislina
<i>E. amstelodami</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>
<i>E. echinulatum</i>	<i>Eurotium echinulatum</i>
<i>E. herbariorum</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>
<i>E. repens</i>	<i>Eurotium repens</i>

<i>E. rubrum</i>	<i>Eurotium rubrum</i>
EX-F	oznaka sevov zbirke ekstremofilnih gliv (Katedra za biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija)
FeSO ₄ ×7H ₂ O	železov (II) sulfat (VI) heptahidrat
g	gvanin
G	gvanin
HACCP	analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (ang. Hazard Analysis and Critical Control Point)
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
ITS	distančniki; zaporedja, ki ločujejo rDNA različnih ribosomskih podenot (ang. Internal Transcribed Spacer)
ITS4	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na ' koncu
ITS5	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na ' koncu
K ₂ HPO ₄	dikalijev hidrogenfosfat (V)
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat (V)
l	liter
M	molarno (mol/l)
mA	miliamper (10 ⁻³ A)
MgCl ₂	magnezijev (II) klorid
MgSO ₄ ×7H ₂ O	magnezijev sulfat (IV) heptahidrat
min.	minut
ml	mililiter
MEA	agar s sladnim ekstraktom (ang. Malt extract agar)
mm	milimeter (10 ⁻³ m)
n.št.	našega štetja
NaNO ₃	natrijev nitrat (V)
ng	nanogram (10 ⁻⁹ g)
obr/min	obrati na minuto
OTα	α-ohratoksin

OTA	ohratoksin A
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>P. nalgiovense</i>	<i>Penicillium nalgiovense</i>
<i>P. nordicum</i>	<i>Penicillium nordicum</i>
<i>P. olsonii</i>	<i>Penicillium olsonii</i>
<i>P. polonicum</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
pH	negativni logaritem koncentracije protonov
pmol	pikomol (10^{-12} mol)
RAPD	naključno pomnoževanje polimorfne DNA (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	zaporedje DNA, ki kodira ribosomsko RNA
RFLP	polimorfizem delov rezanih z endonukleazami (ang. Restriction Fragment Length polymorphism)
RNA	ribonukleinska kislina
s	sekunda
spp.	več vrst rodu
SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem (ang. Single-Strand Conformation Polymorphism)
SSS	raztopina za suspenzijo spor (ang. Spore suspension solute)
T	timin
T1	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na ' koncu
T22	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na ' koncu
TBE	TRIS-borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
U	enota (ang. unit); definicija enote v encimatiki se razlikuje od encima do encima
UPGMA	netehtana metoda parnih skupin z aritmetično sredino (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)
UV	ultravioleten

V	volt
W	vat
YES	agar s kvasnim ekstraktom in saharozo (ang. Yeast extract sucrose agar)
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	cinkov sulfat (VI) heptahidrat
ZDA	Združene države Amerike
x	krat(en)
μl	mikroliter (10 ⁻⁶ L)
μm	mikrometer (10 ⁻⁶ m)
∞	neskončno
®	registrirano (ang. registerd sign)

1 UVOD

1.1 UVOD

V mesni industriji se fermentacija mesa uporablja kot eden izmed načinov shranjevanja, pri katerem dobimo končne izdelke, ki so visoko hranljivi, bogati z beljakovinami in imajo daljšo obstojnost. Pravilno pripravljene končni proizvodi fermentacij so varni (patogene bakterije niso prisotne) ter imajo edinstven okus in teksturo. Ker fermentacija poteka s pomočjo aktivnosti mikroorganizmov, se na določenih sušenih mesninah pogosto pojavljajo tudi nitaste glive.

Glive so lahko škodljive ali koristne. Določene koristne glive so namensko dodane živilu ali pa so naravno prisotne, medtem ko se škodljive oblike pojavljajo kot nezaželene naravne kontaminante. Tudi kontaminante vplivajo na senzorične lastnosti končnega izdelka, poleg tega pa je večina gliv potencialno sposobna proizvodnje toksičnih metabolitov. Glive, ki proizvajajo toksične metabolite so povsod prisotne in pripadajo naravni kontaminacijski združbi mikroorganizmov. Surovine in produkti so lahko kontaminirani s sporami, konidiji ali micelarnimi fragmenti iz okolja. Ko opisujemo mikrobo združbo nekega izdelka je pomembno, da razlikujemo med vrstami, ki naseljujejo živila naključno, zaradi razširjanja preko zračnih spor ter med vrstami, ki so sposobne aktivne rasti na izdelku in s tem vpliva na kakovost končnega izdelka. Kontaminacija se lahko pojavi v različnih stopnjah proizvodnje, vendar se rast gliv pojavi le ob ugodnih pogojih, ki določajo prevladujočo vrsto.

Zaradi zavedanja, da so glive lahko zdravju škodljive, je potrebna analiza varnosti izdelkov tudi s tega vidika. Običajno prisotna združba nitastih gliv fermentiranih mesnih izdelkov vključuje predvsem različne vrste rodu *Penicillium*, poleg tega pa so zasledili še vrste rodu *Aspergillus* in *Scopulariopsis* ter druge. Vrste teh rodov so znane tudi po tem, da lahko proizvajajo različne mikotoksine. Prisotnost gliv kot tudi proizvodnja metabolitov sta odvisni od različnih dejavnikov kot so lokacija, način proizvodnje, uporaba surovin in drugo, zato je potrebna individualna analiza izdelkov, ko želimo določiti mikrobo združbo določene sušene mesnine.

1.2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V zadnjih desetletjih se vse več pozornosti posveča tudi glivnim kontaminantom, predvsem zaradi zavedanja, da lahko proizvajajo toksične metabolite. Namen dela je bil izolirati in določiti različne vrste nitastih gliv, ki so prisotne na različnih izbranih sušenih mesninah. Želeli smo primerjati vrstno sestavo glede na različne stopnje proizvodnje in proizvodne lokacije in določiti dominantne vrste. Pri najpogostejši kontaminantni vrsti smo želeli preveriti izvor, gensko diverzitetu in sposobnost proizvodnje toksičnih metabolitov.

V delu smo postavili naslednje hipoteze:

Večina gliv se razširja s sporami, ki so po izvoru bodisi spolne ali nespolne. Spore so večinoma hidrofobne, majhne in zelo lahke, zato se lahko prenašajo z zračnimi in vodnimi tokovi ter tudi z direktnim kontaktom preko prenašalcev. Prostore proizvodnje sušenih mesnin prezračujejo preko oken (pršut) ali preko prezračevalnih sistemov (ostale mesnine), zato smo predpostavili, da pride do kontaminacije izdelkov s sporami gliv iz zraka. Ker različni proizvodi vsebujejo tudi različne dodatke, smo predpostavili, da so lahko vir okužb tudi kontaminirane osnovne surovine (kolagenska vlakna za ovijanje mesnin, sol). Vir okužb pa so lahko tudi naprave za obdelavo mesnin ali nitaste glive, ki naseljujejo stene in okenske police proizvodnih prostorov.

Večina gliv za kalitev potrebuje vlago, ustrezna hranila in primerno temperaturo. Izmed vseh v zraku prisotnih spor bodo na sušenih mesninah vzkalile in aktivno rastle le tiste, ki lahko uspevajo pri fizikalno-kemijskih pogojih, ki prevladujejo v proizvodnji fermentiranih mesnin. To so nizka vodna aktivnost zaradi soljenja in sušenja mesnin, nizke temperature v hladilnicah, gojišče bogato s proteini in lipidi. Ti pogoji določajo prevladujoče vrste gliv na izdelkih. Po navedbah iz literature vemo, da so najpogostejše glive v zraku zunanjih in notranjih prostorov predvsem različne vrste nitastih gliv iz rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis* in *Penicillium*.

Predvidevamo, da bomo z uporabo primernih osamitvenih metod, selektivnih gojišč in ustreznih pogojev inkubacije izolirali različne vrste nitastih gliv zgoraj omenjenih rodov in med njimi določili dominantne vrste.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROIZVODNJA SUŠENIH MESNIN

Sušene mesnine so proizvedene iz manjših ali večjih integralnih kosov mesa ali iz razkosanega mesa. Užitne postanejo po suhem soljenju ali razsoljevanju, lahko pa tudi po hladnem dimljenju ter hkrati sušenju in zorenju (Žlender, 2004). Proizvodnja fermentiranih in sušenih proizvodov je zasnovana na tradiciji in izkušnjah proizvajalcev (Raspor, 2003). Različne vrste suhega mesa, kot so pršut, špek, suha vratina, pleče, roža - del stegna, suha mesnata slanina in druge, predstavljajo pomembno skupino izdelkov mesne industrije (Scolari in sod., 2003).

Fermentacija je metabolni proces pri katerem pride do delne oksidacije ogljikovih hidratov zaradi odsotnosti zunanjega prejemnika elektronov. Pri tem procesu se ne sprosti veliko energije. Poznanih je sicer več različnih definicij za omenjen proces fermentacije, vendar je v nadaljevanju uporabljen pojem fermentacije v širšem pomenu. Pojem fermentacija, ki je splošno uporabljen pomeni proces, pri katerem zaradi delovanja mikroorganizmov oz. njihovih encimov pride do kemijskih sprememb organskega substrata (Jay, 1992).

Soljenje in razsoljevanje sta nedvomno najbolj splošno uporabljena tehnološka procesa pridobivanja kakovostnih mesnih proizvodov. Takšen postopek konzerviranja mesa so poznali že pred časom starega Rima (753 p.n.št. - 476 n.št.) in ga poznamo kot proces fermentacije. Fermentacija je stara tehnologija namenjena konzerviranju mesa, ki pa daje končnemu proizvodu karakterističen okus. V začetku je proces potekal naravno, brez zavedanja o tem kaj povzroča spremembe na živilih, šele po letu 1859 pa so odkrili, da so za spremembe tako pozitivne kot negativne odgovorni mikroorganizmi. Tradicionalni tehnološki postopek fermentacije pa se je izboljšal predvsem z napredkom v uporabi starterskih kultur in s tem vodene fermentacije (Shimokomaki in Youssef Youssef, 2003; Pérez-Margariño in González-Sanjosé, 2003).

Fermentacija mesnih proizvodov je lahko voden ali naraven proces proizvodnje končnih mesnih proizvodov, ki so bolj stabilni, okusni in hranljivi kot izhodna surovina s pomočjo aktivnosti mikroorganizmov (Fung, 1992).

2.1.1 Sušene klobase - salame kot primer postopka proizvodnje sušenih mesnin

V paleti mesnih proizvodov zavzemajo sušene fermentirane klobase vidno mesto. To dokazuje podatek, da so leta 1989 v deželah Evropske skupnosti proizvedli več kot 800.000 ton proizvodov te vrste (Raspor, 2003).

Proizvodnja fermentiranih klobas se začne z razkosavanjem, sekljanjem in mletjem surovega mesa, nato dodamo maščobe ter začimbe, sol, fermentabilne ogljikove hidrate in druge aditive ter glede na vrsto procesa po potrebi tudi startersko kulturo (Shay in Egan, 1992).

Glavne stopnje proizvodnje sušenih klobas - salam po Shayu in Eganu (1992) so:

1. Izbira mesa brez kosti (sveže ali zamrznjeno)
2. Predpriprava mesa (po potrebi)
3. Sekljanje maščobe
4. Rezanje in mešanje izbranega mesa (svinjsko, goveje, lahko mešano)
5. Mešanje mesa in maščob
6. Dodatek ostalih nemesnih komponent (sol, nitrati, začimbe,..)
7. Polnjenje mešanice v ovitke
8. Klimatizacija
9. Dimljenje (po izbiri)
10. Fermentacija (primarna)
11. Zorenje in sušenje (sekundarna fermentacija)

2.1.2 Vloga soli in razsoljevanja v proizvodnji sušenih mesnin

Natrijev klorid je najpomembnejša in dolgo znana sestavina, ki se uporablja v proizvodnji sušenih mesnin iz prašičjega mesa in je po mnenju italijanskih strokovnjakov tista

komponenta, ki tem izdelkom daje najbolj značilne lastnosti. Razen oblikovanja posebne arome, dodatek soli pomembno učinkuje kot konzervans (Scolari in sod., 2003).

Sol nima direktnega baktericidnega učinka, čeprav lahko zniža vrednost a_w izdelka do meje, pri kateri se v izdelki ustavi rast mikroorganizmov (Baldini in Raczynski, 1979). V primeru, da izdelke premalo solimo, se lahko pojavi prekomerna rast nezaželenih po Gramu negativnih bakterij (ICMSF, 1998).

Proces soljenja se opravi po sprejemu in sortiranju surovega mesa po kakovosti in teži. V primeru proizvodnje suhega mesa iz večjih celih kosov se kristalna sol nanaša na površino mesa. Penetracija soli v meso je počasna in odvisna od temperature. Kose mesa potresejo s soljo ročno ali strojno (Scolari in sod., 2003).

Za nekatere proizvode se uporablja razsoljevanje, to je postopek dodajanja mešanice soli in drugih sestavin, kateremu podobno kot pri postopku soljenja površin sledi počivanje pri nizki temperaturi in visoki relativni vlažnosti. Razsoljevanje pomeni suho soljenje z nanašanjem mešanice soli, nitratov in mešanice začimb ter dišavnic (Scolari in sod., 2003).

Količina uporabljene soli v proizvodnji sušenega mesa se zmanjšuje. Izboljšanje higienskih razmer v proizvodnji, uporaba hladne verige, sterilizacijskih toplotnih procesov in drugih ukrepov so v živilih postopoma nadomešča sol kot konzervans (Scolari in sod., 2003).

2.1.2.1 Začimbe

Začimbe dodajajo skoraj vsem mesnim izdelkom. Naravne začimbe pa so pogosto kontaminirane z velikim številom mikroorganizmov, kar lahko predstavlja težavo v proizvodnji sušenih mesnin. Že leta 1967 so Christensen in sod. opazili, da se na začimbah pojavljajo nitaste glive v večjem številu (2×10^2 do 3×10^3) in so posledično raziskovali prisotnost mikotoksinov, ki so jo potrdili.

Začimbe vsebujejo aerobne mezofilne bakterije, spore aerobnih bakterij, spore nitastih gliv in sulfitreduktirajoče klostridije (Bem in Adamič, 1991). Prevladujoči rodovi nitastih gliv v

začimbah so *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* in *Trichoderma* (Mandeeel, 2005). Zaradi zavedanja, da so nitaste glive potencialni proizvajalci mikotoksinov, predvsem rodova *Aspergillus* in *Penicillium*, so še vedno aktualne raziskave tega področja. Prisotnost mikotoksinov, predvsem aflatoksinov raziskujejo različni avtorji, npr. Romagnoli in sod. (2007) v Italiji in Sung-Hye in sod. (2008) v Koreji.

Uporaba naravnih začimb v izdelavi mesnih izdelkov kljub prisotnosti velikega števila mikroorganizmov ne ogroža njihove higienske kakovosti in obstojnosti izdelkov, vendar pod pogojem, da le-te ne vsebujejo zdravju škodljivih vrst in da je tehnološki proces izdelave strokovno izpeljan (Bem in Adamič, 1991).

2.1.3 Temperaturni režim v proizvodnji sušenih mesnin

Za tradicionalne sušene mesnine iz svinjine so značilne nizke proizvodne temperature (Comi in Cantoni, 1983).

Za primerno mikrobiološko stabilnost morajo biti trupi zaklanih živali dobro izkrvljavljeni in izrezano meso hitro ohlajeno na temperaturo okrog 0 °C v 24 do 30 urah *post mortem* (po smrti). Meso sortirano po kakovosti in teži se skladišči pri nizki temperaturi 0 °C do 5 °C od 12 do 15 ur (Scolari in sod., 2003).

Proces izenačevanja soli oz. počivanja pri razsoljevanju traja več dni, odvisno od izdelka, pri temperaturi od 0 °C do 5 °C in visoki relativni vlažnosti. Pri nekaterih proizvodih je faza počivanja lahko daljša in poteka najprej pri temperaturi 20 °C in nižji relativni vlažnosti, nato pa se temperatura zniža na 15 °C, vlažnost pa zviša (Scolari in sod., 2003).

Trajanje in temperaturni režim sušenja in zorenja se razlikujejo glede na vrsto proizvoda. Faza sušenja/zorenja mora potekati v hladnih, dobro ventiliranih sušilnicah več mesecev. Začetna temperatura je od 18 °C do 25 °C in se postopno znižuje do temperature od 10 °C do 15 °C (Scolari in sod., 2003).

Proizvodi, katerih pH doseže vrednost 5,2 ali manj in imajo hkrati vrednost a_w pod 0,95 so stabilni in jih ni potrebno shranjevati v hladilnikih (Garbutt, 1997).

2.2 NITASTE GLIVE V PROIZVODNJI SUŠENIH MESNIN

V zadnjih letih vedno bolj ugotavljajo kompleksne povezave med surovino, tehnologijo in izdelkom in odločilno vlogo 'koristnih' mikroorganizmov, ki so sposobni premagati in uničiti 'škodljive' in 'nevarne' mikroorganizme in narediti izdelek stabilen, varen, aromatičen in visoke gastronomske vrednosti (Scolari in sod., 2003)

Večina tradicionalnih fermentacijskih postopkov, ki vključujejo zorenje z nitastimi glivami, temelji na pasivni inokulaciji s t.i. hišno mikofloro, ki izhaja bodisi iz stavb ali pa tehnološke opreme. Nekatere proizvodnje temeljijo na zagotovitvi inokuluma, predvsem za salame, medtem ko postajajo čedalje bolj razširjene starterske kulture za proizvodnjo pršutov (Raspor, 2003).

2.2.1 Vpliv nitastih gliv na fermentacijo

Nitaste glive najbolj vplivajo na senzorične lastnosti mesnih izdelkov, zlasti pri špeku, manj so pa pomembne za suho mesnato slanino - panceto. Glavni razlog je lipolitično in proteolitično delovanje, ki prispevata k tvorbi razgradnih aromatičnih produktov oz. k sintezi aromatičnih metabolitov (Scolari in sod., 2003).

Proces sušenja je prav tako povezan z rastjo nitastih gliv, ki lahko prispevajo k povečanju privlačnosti izdelka. Po drugi strani pa rast nitastih gliv, ki je povezana z veliko hidrolitično aktivnostjo, lahko povzroči poslabšanje vonja in okusa oziroma kakovosti sušenih mesnin (Scolari in sod., 2003).

V Preglednici 1 so povzeti učinki, ki jih imajo določene lastnosti nitastih gliv na mesne izdelke.

Preglednica 1: Lastnosti, ki vplivajo na sprejemljivost prisotnosti nitastih gliv pri mesni fermentaciji (Campbell Platt, 1995, cit. po Raspor, 2003: 199).

Lastnosti nitastih gliv	Učinek
Encimska aktivnost: proteaze lipaze nitrat reduktaza peroksidaza katalaza celulaza	vrednost pH naraste prispeva k aromi, povečuje žarkost izboljša barvo zmanjšuje oksidacijo maščob razgrajuje peroksid lahko razgradi celulozni ovoji
Asimilacija substratnih komponent: organske kisline proteini	vrednost pH naraste vrednost pH naraste
Sinteza metabolitov: antibiotiki mikotoksini hlapne snovi	inhibira patogene in/ali fermentativne bakterije zdravstvena neustreznost prijeten ali neprijeten vonj
Rast in sporulacija: micelij spore	regulira izgubo vlage, zaščiti pred svetlobo in zunanji vplivi barva, aroma
Stabilnost vrst: dobra kompetitivnost mutacije občutljivost na antimikrobne substance	zatre toksinogene nitaste glive vpliv na vse zaželene lastnosti tolerira fenolne komponente v dimu ter začimbe zatiranje rasti in sporulacije

2.2.1.1 Pozitiven učinek nitastih gliv na proizvodnjo sušenih mesnin

V proizvodnji nekaterih sušenih mesnin rast nitastih gliv na površini izdelka vpliva na okus končnega izdelka (Garbutt, 1997).

Kvasovke in nitaste glive sodelujejo v razgradnji peroksidov, maščob in beljakovin in v navzočnosti kisika oksidirajo mlečno kislino. Ker rastejo na površini zmanjšujejo vpliv svetlobe in pretirano oddajanje vode ter tako preprečujejo žarkost mastnine, stabilizirajo barvo, preprečujejo razvoj "suhega roba" in sluzavosti na površini ter prispevajo k oblikovanju značilne arome in vonja. Občutljive so na pomanjkanje kisika in dimljenje (Bem in Adamič, 1991).

Zelo pomembna lastnost nitastih gliv je proizvodnja antimikrobnih substanc, ki imajo lahko bakteristatičen ali baktericiden učinek na nekatere nezaželene po Gramu pozitivne bakterije, kot je npr. *Staphylococcus aureus*. Primer antimikrobne substance je penicilin

(Raspor, 2003). Po raziskavah, ki sta jih opravila Andersen in Frisvad (1994) so vsi izolati vrste *Penicillium nalgiovense* proizvajalci penicilina, Laich in sod. (1999) pa so ugotovili, da lahko kolonizacija salam s to vrsto nitastih gliv v zgodnjih fazah sušenja zavre rast nezaželenih bakterij na površini.

2.2.1.2 Negativen učinek nitastih gliv na proizvodnjo sušenih mesnin

Mesni izdelki, pri katerih je relativno velika površina v naprej izpostavljena učinku soli in nato relativno intenzivno dimljena, so manj podvrženi bakterijski kontaminaciji. Edini mikroorganizmi, ki v takšnih pogojih lahko uspevajo, so nitaste glive, najpogosteje rodova *Penicillium* in *Aspergillus*. Če je rast nitastih gliv zelo zgodna in obsežna, lahko povzroči pojav nenormalne arome in nesprejemljiv videz, kar znižuje kakovost izdelka (Scolari in sod., 2003).

Rast nitastih gliv na površini izdelkov lahko poleg izgleda vpliva tudi na okus. Posledica rasti nitastih gliv je lahko tudi proizvodnja proteinaz, ki povzročijo razpad ovitkov sušenih mesnin (Garbutt, 1997).

Glive lahko povzročijo infekcije (mikoze), alergije in zastrupitve (mikotoksikoze). Nitaste glive, na primer iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in tudi drugih, ki se razmnožujejo v živilih, lahko pri tem sintetizirajo toksine, ki povzročajo obolenja ljudi. Obolenja, ki so posledica vnosa toksinov z živili, imenujemo alimentarna intoksikacija, obolenja, ki jih povzročajo presnovni proizvodi nitastih gliv pa mikotoksikoze (Bem in Adamič, 1991).

Rast nitastih gliv zniža koncentracijo mlečne kisline v izdelku, kar vpliva na povišanje vrednosti pH-ja na od 6,0 do 6,2 (Garbutt, 1997). Povišan pH izdelka pa lahko omogoči povečano rast vrste *Staphylococcus aureus* in s tem zastrupitve z živili (ICMSF, 1998).

2.2.2 Dejavniki rasti nitastih gliv

Surovine in produkti proizvodnje sušenih mesnin so lahko kontaminirani s sporami, konidiji ali fragmenti glivnega micelija iz okolja. Kontaminacija se lahko pojavi v različnih

stopnjah proizvodnje. Med postopkom obdelave so glive lahko neaktivne. Rast gliv se pojavi le ob ugodnih okoljskih pogojih, ti pa so za različne vrste različni. Okoljski dejavniki poleg lastnosti produkta in ekološke niše določajo tudi dominantne vrste in njihove lastnosti (Samson in sod., 1995).

Poleg prisotnosti hranil so najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na rast gliv temperatura, vodna aktivnost (a_w) in kisik. Na rast pH substrata vidno ne vpliva, vpliva pa na proizvodnjo mikotoksinov (Samson in sod., 1995).

Vrste iz rodu *Penicillium* imajo nižje minimalno temperaturno območje rasti kot vrste iz rodu *Aspergillus*. Optimalna temperatura za rast vrst iz rodu *Penicillium* je od 25 °C do 30 °C, za vrste iz rodu *Aspergillus* pa od 28 °C do 35 °C. Glive so v splošnem sposobne rasti pri nižji vodni aktivnosti substrata kot bakterije, vendar ne rastejo pod $a_w = 0,65$. Kisik je potreben za rast in vpliva tudi na proizvodnjo mikotoksinov (Samson in sod., 1995).

Na rast gliv in proizvodnjo mikotoksinov vpliva tudi prisotnost drugih mikroorganizmov. Hitra rast bakterij lahko vpliva na odsotnost gliv na svežem mesu. Poleg tega nekatere vrste gliv zavirajo rast drugih vrst (Samson in sod., 1995).

Kot zadnji dejavnik je potrebno omeniti čas. Sporulacija lahko ob slabih okoljskih razmerah poteka do deset dni, če so pogoji ugodni pa lahko poteče že v enem dnevu (Samson in sod., 1995).

2.2.2.1 Kserofilne glive

Kserofilne glive so pomemben dejavnik kvarljivosti živil. Te glive se razlikujejo po tem, da so sposobne rasti pri pogojih znižane vodne aktivnosti, naprimer na izsušenih ali koncentriranih substratih, v prisotnosti visokih koncentracij soli ali sladkorjev (Pitt in Hocking, 1997).

Pitt (1975) je definiral kot kserofilne tiste glive, ki so sposobne rasti pri vrednosti a_w pod 0,85.

Kot kserofile označujemo tako vrste, ki lahko rastejo tudi na gojiščih z visoko vodno aktivnostjo ($a_w \sim 1$), npr. vrste iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, kot tudi vrste, ki na teh gojiščih ne rastejo, npr. vrsta *Xeromyces bisporus* (Pitt in Hocking, 1997). Med kserofilne glive uvrščamo tako vrste iz rodov *Eurotium*, *Aspergillus*, *Wallemia*, *Chrysosporium*, *Betisia*, *Polypaecilum*, *Eremascus*, *Xeromyces* in *Basipetospora* (Pitt in Hocking, 1997).

2.2.2.2 Psihrofilne in psihrotolerantne glive

Madigan in Martinko (2006) definirata psihrofile kot organizme, ki optimalno rastejo pri temperaturi ≤ 15 °C, njihova maksimalna temperatura rasti je ≤ 20 °C in minimalna temperatura rasti pri ≤ 0 °C. Psihrotolerantni ali psihrotrofni organizmi pa so definirani kot organizmi, ki sicer rastejo pri 0 °C, vendar imajo temperaturni optimum med 20 °C in 40 °C.

Psihrotolerantni mikroorganizmi so veliko širše zastopani in jih lahko izoliramo tudi iz vode in tal zmernega podnebja. Ravno tako so prisotni na mesu, v mleku, sadju in zelenjavi, ki jih hranimo v hladilniku (4 °C). Psihrotolerantne predstavnike najdemo pri številnih rodovih bakterij, gliv, alg in praživali (Madigan in Martinko, 2006).

Med psihrofilne glive izolirane iz živil spadajo nekatere vrste iz rodov *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* in *Cladosporium*. Poleg psihrotolerantnih vrst je v rodu *Penicillium* tudi nekaj striktnih psihrofilov (Samson in sod., 1995).

2.2.3 Mikotoksini

Nitaste glive so v splošnem sposobne proizvodnje širokega spektra različnih sekundarnih metabolitov. Del teh metabolitov so mikotoksini (Samson in sod., 1995). Mikotoksine tvorijo glive tudi med rastjo na živilih. Nekateri mikotoksini so prisotni le v nitastih glivah, večina pa se jih izloča v živila (Filtenborg in sod., 1996).

Mikotoksini so sekundarni metaboliti, ki so ob zaužitju po naravni poti toksični za vretenčarje že v majhnih koncentracijah (Filtenborg in sod., 1996). Do leta 2003 je bilo opisanih že preko tristo različnih mikotoksinov (Raspor, 2003). Človek se lahko z mikotoksini okuži v različnih stopnjah prehranjevalne verige. Najpomembnejši rodovi mikotoksinogenih gliv pa so *Aspergillus*, *Fusarium* in *Penicillium* (Bryden, 2007).

Pomembnost posameznega mikotoksina lahko opredelimo glede na to kako je pogost oziroma glede na to, kakšna bolezenska stanja povzroča. Mikotoksikoze, ki jih povzročajo mikotoksini so različne in lahko prizadenejo veliko vrst živali in tudi človeka. Mikotoksini, ki najbolj vplivajo na ljudi in živali so aflatoksini, deoksinivalenol, fumonizini, zealarenon, T-2 toksin, ohratoksin in nekateri ergot alkaloidi. Pomembni povzročitelji bolezni so še penitrem, patulin, ciklopiazonska kislina in citrinin (Richard, 2007).

Mikotoksini so selektivno stabilne snovi, ki jih toplota ne uniči (Samson in sod., 1995). Pogoji za proizvodnjo mikotoksinov so bolj specifični kot pogoji za rast gliv (Samson in sod., 1995; Kokkonen in sod., 2005). Profil in količina mikotoksinov proizvedenih v živilih je odvisna predvsem od ekoloških in procesnih parametrov proizvoda (Filtenborg in sod., 1996).

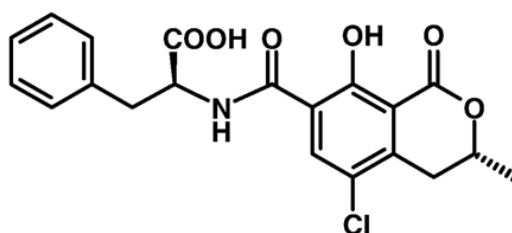
2.2.3.1 Ohratoksin A

Ohratoksin A (OTA) je hepatotoksičen, imunosupresiven, teratogen, nefrotoksičen in nefrokarcinogen mikotoksin, ki je uvrščen tudi med potencialne karcinogene za ljudi (IARC, 1993). Primarno je ledvični toksin, vendar v dovolj visoki koncentraciji lahko poškoduje tudi jetra (Richard, 2007).

Ohratoksin A proizvajajo predvsem vrste iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Krogh in sod., 1977) in je zato prisoten v različnih vrstah živil povsod po svetu, tako v žitih, stročnicah, vinu, pivu in kavi, kar pomeni, da je človek kronično izpostavljen njegovim učinkom (Toscani in sod., 2007). Zasledili so ga v živilih in krmi ter tudi v mesnih izdelkih (Gareis in Scheuer, 2000). Prisotnost ohratoksina v mesu lahko razložimo kot posredno kontaminacijo preko svinj, ki so bile hranjene s kontaminirano krmo, ali neposredno zaradi

rasti nitastih gliv na površini mesnih proizvodov (Madsen in sod., 1982; Lusky in sod., 1995).

Ohratoksin A povezujejo z nastankom bolezni Balkanska endemična nefropatija (BEN) (Krogh in sod., 1977). To je progresivna bolezen ledvičnih tubulov povezana s povečanim tveganjem za nastanek raka na sečilih (Mally in sod., 2007). Endemična je na podeželskih področjih Bosne in Hercegovine, Bolgarije, Hrvaške, Romunije, Srbije, Makedonije in Slovenije (Mally in sod., 2007; Abouzied in sod., 2002).



Slika 1: Strukturna zgradba ohratoksina A (Richard, 2007: 8).

2.2.4 Najpogostejši rodovi nitastih gliv v proizvodnji sušenih mesnin

V različni literaturi lahko zasledimo zelo različne podatke o tem katere so najpogostejše nitaste glive na sušenih mesninah (Samson in sod., 1995). Po podatkih Bema in Adamiča (1991) se po skladiščenju na površini svinjskega pršuta razvijejo vrste iz rodov *Penicillium* in *Aspergillus*, na drugih izdelkih pa še vrste iz rodov *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Alternaria*, *Cladosporium* in drugi. Tudi vrste iz rodu *Eurotium* se pogosto pojavljajo na mesnih proizvodih (Samson in sod., 1995) in pršutu (Raspor, 2003).

2.2.4.1 Rod *Penicillium* Link: Fr.

Uvrstitev v sistem: *Eukaryota*; *Fungi*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Eurotiomycetes*; *Eurotiales*; *Trichocomaceae*; *Penicillium*;

Teleomorfi: *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Hamigera*.

Rod *Penicillium* je kozmopolitski. Mnoge vrste iz tega rodu so pogosti kontaminanti živil, ki proizvajajo sekundarne metabolite (Frisvad in Filtenborg, 1989). Znanih je 225 vrst (Samson in Pitt, 2000). Veliko vrst izjemno dobro raste tudi pri nizkih temperaturah in so zato pomembni kontaminanti živil shranjenih v hladilnikih. Poznane so psihrofilne in psihrotolerantne vrste, kot tudi vrste sposobne rasti na živilih z močno in zmerno znižano vodno aktivnostjo, zato jih uvrščamo med kserofilne organizme (Samson in sod., 1995).

Dominantno mikofloro sušenih mesnin predstavljajo vrste iz rodu *Penicillium* (Pitt in Hocking, 1997). V mesni industriji se kot starterski kulturi uporabljata vrsti *Penicillium nalgiovense* in *P. chrysogenum* (Bem in Adamič, 1991). Fink-Gremmels in Leistner (1990) sta v čistih kulturah gliv izoliranih iz sušenih mesnin zasledila naslednje mikotoksine: citreoviridin, citrinin, ciklopiazonična kislina, izofumigaklavin A, ohratoksin A, patulin, rokvefortin C in rugulovazin A. Andersen in Frisvad (1994) pa sta zasledila še viomelein in ksantomegnin ter ugotovila, da vsi testirani izolati vrste *Penicillium nalgiovense* proizvajajo penicilin.

Za identifikacijo in klasifikacijo vrst iz rodu *Penicillium* lahko poučujemo njihove morfološke značilnosti in sposobnosti rasti na gojiščih z različno vrednostjo a_w in pri različnih temperaturah (Pitt, 1979), pomembno vlogo pa ima tudi profil sekundarnih metabolitov (Frisvad in Filtenborg, 1983).

Samson in Pitt (1985) sta za identifikacijo vrst iz rodu *Penicillium* predlagala uporabo gojišč Czapkov agar s kvasnim ekstraktom (CYA) in agar s sladnim ekstraktom (MEA) (2%) in tritočkovno inokulacijo. Agar s kreatinom in saharozo (CREA) je zelo uporabno gojišče za ločevanje zelo sorodnih vrst iz tega rodu (Samson in sod., 1995). Agar s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) je visoko hranljivo gojišče in priporočljivo za analize sekundarnih metabolitov (Singh in sod., 1991).

2.2.4.2 Rod *Aspergillus* Fr.: Fr.

Uvrstitev v sistem: *Eukaryota*; *Fungi*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Eurotiomycetes*; *Eurotiales*; *Trichocomaceae*; *Aspergillus*.

Teleomorfi: *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya* in drugi rodovi

Vrste iz rodu *Aspergillus* so pogosti kontaminanti različnih substratov. Nekatere so patogene za ljudi in živali in/ali pa proizvajajo toksične metabolite, druge pa so pomembne v industrijskih aplikacijah v proizvodnji organskih kislin, encimov ali v fermentaciji predvsem orientalskih živil (Samson in sod., 1995).

Vrste iz rodu *Aspergillus* dobro rastejo pri visokih koncentracijah sladkorja ali soli ter v/na živilih z nizko vsebnostjo vode. Prisotne so na mesnih izdelkih kot so presne klobase, kuhana šunka, pakirano meso in pakirane presne, kuhane in barjene klobase ter povzročajo kvar teh izdelkov. Določene vrste tvorijo mikotoksine in so zato povzročitelji obolenj (Bem in Adamič, 1991). Pomembni mikotoksini so aflatoksini, sterigmatocistin, ohratoksin A in nidulotoksin (Samson in sod., 1995).

Identifikacija in klasifikacija vrst iz rodu *Aspergillus* temelji predvsem na njihovih morfoloških značilnostih (Samson in sod., 1995). Raper in Fennell (1965) sta rod razdelila v 18 skupin, ki so jih kasneje Gams in sod. (1985) zamenjali z imeni podrodov in sekcij. Za veliko število vrst poznamo tudi teleomorfno obliko.

2.2.4.3 Rod *Eurotium* Link: Fr.

Uvrstitev v sistem: *Eukaryota*; *Fungi*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Eurotiomycetes*; *Eurotiales*; *Trichocomaceae*; *Eurotium*.

Anamorf: *Aspergillus*

Rod *Eurotium* vsebuje vrste, ki optimalno rastejo na gojiščih z nizko vodno aktivnostjo (Samson in sod., 1995). Pogoste so v krmi in živilih, ki so konzervirani z visokimi koncentracijami soli ali sladkorjev (Pitt in Hocking, 1997). Glive iz rodu *Eurotium* so kserofilne in so pomembni producenti mikotoksinov, kot sta fiscion in ehinulin (Samson in sod., 1995).

Comi in sod. (2004) so opazili, da se tekom zorenja istrskih sušenih mesnin število vrst iz rodu *Eurotium* povečuje. Spore teh vrst so namreč zelo odporne proti izsuševanju. Ugotovili so tudi, da burja (hladen severno-vzhodni veter) vzpodbuja rast kserofilnih nitastih gliv rodu *Eurotium*.

Za identifikacijo vrst iz rodu *Eurotium* je primerno gojišče Czapek agar s kvasnim ekstraktom z 20 % saharoze (CY20S), medtem ko za izolacijo zadošča gojišče Dikloran 18 % glicerolni agar (DG18), ki je primeren za izolacijo kserofilnih gliv iz sušenih živil (Pitt in Hocking, 1997).

2.2.4.4 Rod *Cladosporium* Link

Uvrstitev v sistem: *Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Capnodiales; Davidiellaceae; Cladosporium*.

Teleomorf: *Mycosphaerella*

Vrste iz rodu *Cladosporium* so ubikvitarne. Določene vrste so rastlinski patogeni ali saprofiti in se pojavljajo na starem ali odmrlem rastlinskem materialu specifičnega gostitelja (Samson in sod., 1995).

Cladosporium herbarum je najbolj znana vrsta, ki se pojavlja na svežem mesu in na mesnih izdelkih v obliki "črnih madežev". Podobne spremembe povzročajo tudi na zidovih hladilnic. Lahko povzročijo kvar presnih klobas, kuhanih šunk in pakiranih izdelkov (Bem in Adamič, 1991).

Vrste izolirane iz živil so največkrat psihrotolerantne in rastejo izjemno dobro pri nizkih temperaturah, tudi na živilih shranjenih v hladilnikih. Za identifikacijo vrst iz tega rodu se lahko uporablja gojišče MEA in inkubacija pri temperaturi od 15 °C do 20 °C (Samson in sod., 1995).

2.3 METODE ZA IDENTIFIKACIJO NITASTIH GLIV

Nitaste glive so razširjene vsepovsod. So torej ubikvitarni mikroorganizmi, ki jih lahko zaradi specifične rasti in tvorbe relativno obsežnega micelija, z velikim številom celic, tudi makroskopsko opazimo (Raspor, 2003).

Posamezne metode v taksonomiji niso vedno splošno uporabne, ampak so specifične za določeno taksonomsko skupino ter se razlikujejo tudi na ravneh posameznih taksonov (razred, red, družina, rod, vrsta, podvrsta) (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.3.1 Morfologija

Taksonomijo gliv si je nemogoče predstavljati brez uporabe binokularne lupe ter mikroskopa, s pomočjo katerih opazujemo morfološke znake. Morfološke znake delimo na morfološke makroskopske znake (oblika, barva micelija ter razmnoževalnih struktur) in morfološke mikroskopske znake (oblika, barva, dimenzije spor ter drugih mikroskopskih struktur). Določamo tudi kriterije mikroskopske dinamike (razvoj spor - sporogeneza, konidiogeneza) (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.3.2 Kemotaksonomija

Kemotaksonomija proučuje razlike v kemijski sestavi pri različnih organizmih in uporablja znake za klasifikacijo in identifikacijo osebkov. Uveljavljena je predvsem pri tistih taksonomskih skupinah, kjer morfološke in fiziološke značilnosti za ločevanje ne zadoščajo, včasih pa tudi pri izolatih s prisotnimi, vendar netipičnimi strukturami (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Pri glivah kemotaksonomija pomaga pri prepoznavanju in ločevanju vrst in podvrst in jo velikokrat uporabljamo tudi kot dopolnilno metodo h klasičnim. Glive lahko razlikujemo na osnovi celičnih sestavin, kot so celokupni proteini, izoencimi, sekundarni metaboliti, lipidi, ubikinoni in ogljikovi hidrati (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

V identifikaciji in klasifikaciji nitastih gliv je zelo pomembna tudi uporaba profila sekundarnih metabolitov (Filtenborg in sod., 1983; Frisvad, 1987; Smedsgaard, 1997). Frisvad in Filtenborg (1983) sta poudarila pomen uporabe celotnega profila sekundarnih metabolitov in ne le posameznih metabolitov v taksonomiji vrst rodu *Penicillium*.

Najbolj smotrna je uporaba biokemijskih tehnik tedaj, kadar obravnavamo morfološko zelo podobne organizme (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.3.3 Fiziologija

Zlasti v taksonomiji kvasovk so se uveljavili komercialni avtomatski in polavtomatski sistemi, ki večinoma temeljijo na asimilacijskih sposobnostih vrst. Rezultate interpretiramo s primerjavo rasti, vrsto pa določimo s pomočjo identifikacijskih preglednic (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.3.4 Molekularno genetske metode

Identifikacija samo na ravni fenotipa je mnogokrat zavajajoča in nezanesljiva, saj na proučevane lastnosti vplivajo pogoji gojenja. Fenotipske lastnosti so lahko genetsko nestabilne ali pa jih kodirajo izvenkromosomski elementi, ki so prenosljivi med sevi (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Ko govorimo o molekularnih metodah, govorimo o analizi DNA in RNA. Poznamo dva pristopa analize nukleinskih kislin, in sicer analizo celotnega genoma in preučevanje specifičnih genov ali genskih sklopov (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Pri analizi celotnega genoma so najpogosteje uporabljene metode analiza vsebnosti gvanina in citozina, DNA-DNA hibridizacija, polimorfizem fragmentov rezanih z endonukleazami (RFLP), naključno pomnoževanje polimorfne DNA s polimerazno verižno reakcijo in uporaba oligonukleotidnih začetnikov z naključnim zaporedjem (RAPD PCR) ter polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP) (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Pri proučevanju specifičnih genov ali genskih sklopov (clusters) so v uporabi tehnike analize zaporedij (sekvenc) 18S rDNA, analize zaporedij 28S rDNA in analize DNA z nizko molekularno maso. Za identifikacijo najpogosteje analiziramo zaporedji 18S (pri prokariotskih organizmih 16S) ali pa 28S rDNA, ki sta uporabni za širok spekter taksonomskih enot. Za identifikacijo na nivoju vrste pa največkrat zadostuje analiza zaporedja medgenskih distančnikov, ki se nahajajo med 28S in 5,8S rDNA (ITS1) in 5,8S in 18S rDNA (ITS2), ali pa analiza celotnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2 (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.3.4.1 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP)

Odkritje verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Mullis, 1990; Saiki in sod., 1985, 1988) je omogočilo razvoj novih strategij preučevanja nukleinskih kislin. AFLP je molekularna tehnika, ki združuje elemente metod RFLP in PCR, opisala pa sta jo Zabeau in Vos (1993). Tehniko so poimenovali Vos in sod. (1995) kot namerno namigovanje na akronim "RFLP" (Scott in Straus, 2000).

AFLP je molekularna tehnika s široko uporabno vrednostjo, saj nam posamezna analiza omogoča detekcijo velikega števila polimorfizmov genomske DNA z uporabo le nanogramskih koncentracij DNA, ima visoko ponovljivost in je primerna za rutinske analize (Radišek in sod., 2001).

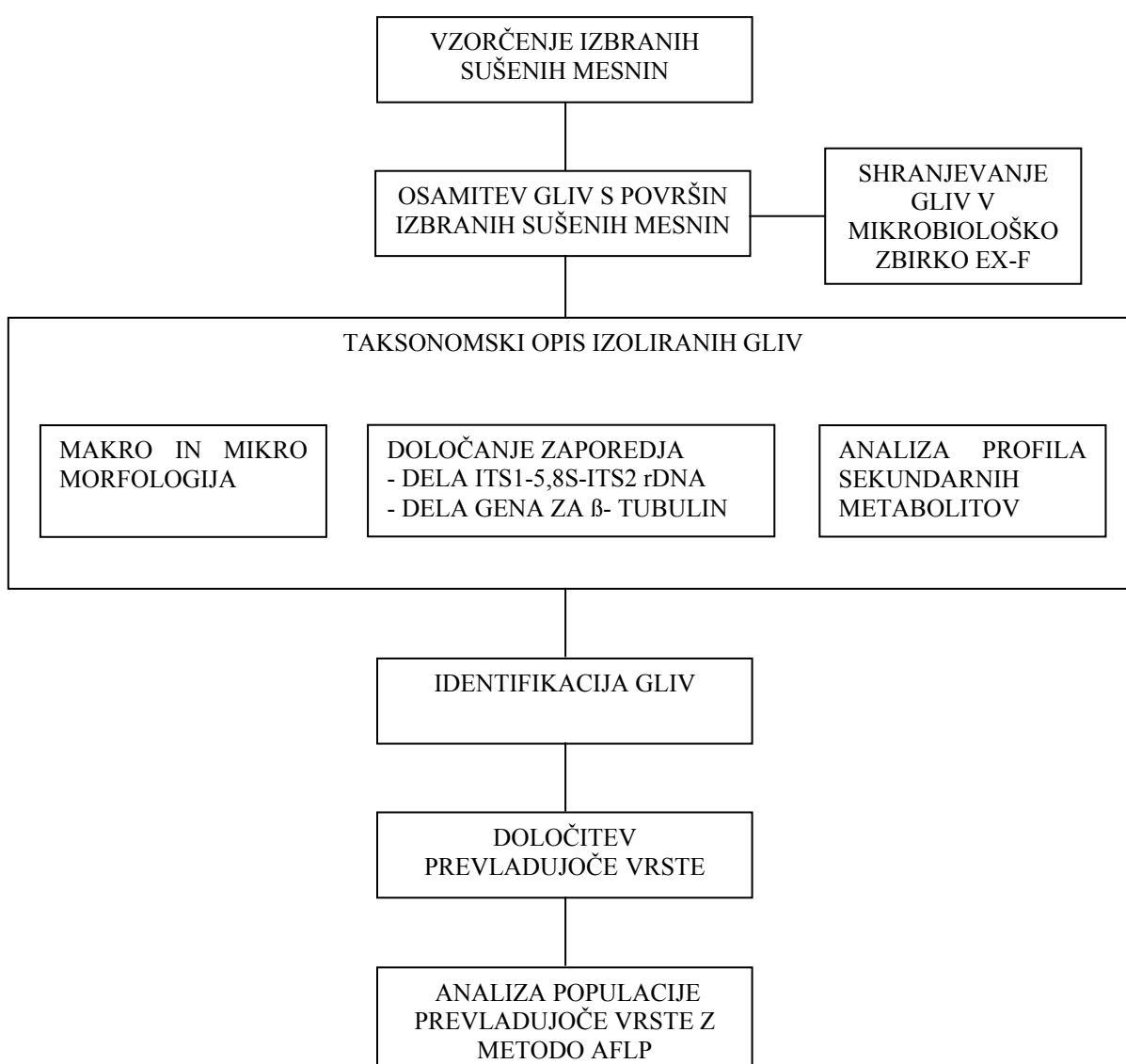
Metoda AFLP temelji na selektivni pomnožitvi restrikcijskih delov genomske DNA s polimerazno verižno reakcijo. Tehnika vključuje 3 korake: i) restrikcija DNA in ligacija dvoverižnih oligonukleotidnih adapterjev, ii) selektivno pomnoževanje restrikcijskih delov z uporabo oligonukleotidnih začetnikov, ki imajo na 3'-koncu dodane 0-3 bazne pare in iii) analiza elektroforeznega gela s pomnoženimi fragmenti (Vos in sod., 1995).

S pomočjo te metode lahko odkrivamo razlike med organizmi brez predhodnega znanja o nukleotidnem zaporedju genoma proučevanega organizma, na osnovi sprememb v prepoznavnih mestih restrikcijskih encimov, ki nastanejo zaradi mutacij. Metoda zajame

celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov znotraj vrste (Vos in sod., 1995).

3 MATERIALI IN METODE DELA

Delo je potekalo skladno s postavitvijo poskusa vrednotenja pristnosti in rasti nitastih gliv in njihove določitve, ki je bil postavljen na osnovi delovne hipoteze, ki trdi, da bomo z uporabo ustreznih metod uspeli izolirati kontaminante sušenih mesnin, ki lahko uspevajo pri fizikalno-kemijskih pogojih, ki prevladujejo v proizvodnji fermentiranih mesnin in so lahko različnega izvora (Slika 2). Delo je potekalo skladno z hodogramom in je obsegalo pet vzorčenj za vsak izdelek v petih odvisnih ponovitvah.



Slika 2: Hodogram poteka dela.

3.1 KEMIKALIJE, REAGENTI IN DRUGI PRIPOMOČKI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

Uporabljene kemikalije in reagenti so prikazani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Uporabljene kemikalije in reagenti.

Kemikalija	Vir
10x ligacijski pufer	Fermentas, Life Sciences, Litva
10x PCR pufer brez MgCl ₂	Fermentas, Life Sciences, Litva
10x PCR pufer (-SO ₄)	Fermentas, Life Sciences, Litva
Agar agar	Biolife, Italija
Agaroz	BMA, ZDA
ALF express™ lestvica 50-500	Amersham Bioscience, ZDA
Bacto pepton	Difco Lab., ZDA
Barvilo anilin modro	Sigma Chemical C., ZDA
Borova kislina	Sigma Aldrich C., ZDA
Bromfenol modro	Sigma Aldrich C., ZDA
Bromkrezol vijolično	Sigma Aldrich C., ZDA
Celit	Merck, Darmstadt, Nemčija
CTAB	Sigma Chemical C., ZDA
Cy5- <i>Eco</i> RI oligonukleotidni začetnik (5'(Cy5)gACTgCgTACCAATTC-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Merck, Nemčija
D+ glukoza	Kemika, Hrvaška
DG-18	Oxoid, VB
dNTP	Amersham Bioscience, ZDA
<i>Eco</i> RI endonukleaza (10U/μl)	Fermentas, Life Sciences, Litva
<i>Eco</i> RI linker1 (5'-CTCgTAgACTgCgTACC-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
<i>Eco</i> RI linker2 (5'-AATTggTACgCAGTCTAC-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
<i>Eco</i> RI oligonukleotidni začetnik (5'-gACTgCgTACCAATTC-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
EDTA	Kemika, Hrvaška
Etanol 70%	Chemo d.d., Slovenija
Etanol 96%	Chemo d.d., Slovenija
Etidijev bromid	Sigma Chemical C., ZDA
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma Chemical C., ZDA
Formamid	Amersham Bioscience, ZDA
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA lestvica	Fermentas, Life Sciences, Litva
Glicerol	Kemika, Hrvaška
HCl	Kemika, Hrvaška
ITS4 oligonukleotidni začetnik (5'TCCTCCgCTTATTgATATgC-3')	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
ITS5 oligonukleotidni začetnik (5'ggAAgTAAAAGTCgTAACAAgg-3')	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
K ₂ HPO ₄	Kemika, Hrvaška
KCl	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Kemika, Hrvaška
Kloramfenikol	Sigma Chemical C., ZDA
Kloroform	Kemika, Hrvaška
	Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Preglednica 2	
Kemikalija	Vir
Kreatin monohidrat	Fluka Chemie AG, Švica
Ksilencianol	Serva, Nemčija
Kvasni ekstrakt	Lab. M. Merieux, Francija
Ligacijski pufer 10x	Fermentas, Life Sciences, Litva
Ligaza (1U Weiss)	Fermentas, Life Sciences, Litva
MgCl ₂	Fermentas, Life Sciences, Litva
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck, Nemčija
MspI linker1 (5'-gACgATgAgTCCTgAg-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
MspI linker2 (5'-CgCTCaggACTCAT-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
MspI oligonukleotidni začetnik (5'-gATgAgTCCTgAgCgg-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
MspI-TA oligonukleotidni začetnik (5'-gATgAgTCCTgAgCggTA-3')	Proligo, Sigma Aldrich C., ZDA
Multi core 10x pufer	Promega corporation, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
Nanašalno barvilo za AFLP reakcijo	Amersham Bioscience, ZDA
NaNO ₃	Kemika, Hrvaška
ReproGel™ poliakrilamidni gel	Amersham Bioscience, ZDA
Saharoza	Torlak, Beograd, Srbija in Črna gora
Saharoza	Biorad, ZDA
Silikagel	Merck, Nemčija
T1 oligonukleotidni začetnik (5'-AACATgCgTgAgATTgTAAgT-3')	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
T22 oligonukleotidni začetnik (5'-TCTggATgTTgTTgggAATCC-3')	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
Taq DNA polimeraza (5U/μl)	Fermentas, Life Sciences, Litva
Tris baza	Sigma Chemical C., ZDA
Tween 80	Biolife, Italija
Želatina	Torlak, Beograd, Srbija in Črna gora
Železov citrat	Sigma Chemical C., ZDA

3.1.2 Laboratorijski pribor

- Laboratorijska steklovnina (erlenmajerice, čaše, menzure, pipete, epruvete, infuzijske stekleničke, petrijevke,...)
- Laboratorijske rokavice
- Membranski filtri Millipore (0.45 μm), Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts
- Nastavki za pipete, Eppendorf, Habmurg, Nemčija
- Mikrocentrifugirke, Eppendorf, Habmurg, Nemčija
- Mikropestile Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Objektna in krovna stekelca, Tlos, Zagreb, Hrvaška
- Pasteurjeve pipete

- Pincete, skalpeli, laboratorijske zanke (eze)
- Plastične petrijevke
- Plutovrt
- Polavtomatska pipeta Proline Pipete, Helsinki, Finska (0.5 - 10 μ l)
- Polavtomatske pipete Eppendorf, Hamburg, Nemčija (2 - 20 μ l, 10 - 100 μ l, 100 - 1000 μ l)

3.1.3 Naprave in drugi pripomočki

- Avtoklav Kambič, Slovenija
- Bunsenov gorilnik TLOS, Zagreb, Hrvaška
- Centrifuga Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Digestorij, Variolab Mobilien W90
- Digitalna kamera DP12, Olympus, Tokio, Japonska
- Digitalni fotoaparati Camedia C-5050 200M, Olympus, Tokio, Japonska
- Fragment Analyser, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
- Inkubator - termostat, Kambič, Slovenija
- Laminarij, Iskra IBK 1V2, Slovenija
- Lupa, Eschenbach
- Magnetno mešalo, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- Mikroskop Olympus BX51, Olympus, Tokio, Japonska
- Mikrovalovna pečica, Gorenje, Slovenija
- PCR sistem Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pH meter, Metrohm, Švica
- Sekvenator ALFexpress®, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
- Tehtnica, Santer SD 1000 T, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- UVI software
- Vodna kopel, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
- Vorteks mešalo, Železniki, Slovenija

3.2 UPORABLJENA GOJIŠČA, RAZTOPINE, MEŠANICE, PUFRI IN GELI

3.2.1 Gojišča

Za izolacijo in identifikacijo gliv ter izolacijo DNA smo uporabili gojišča, ki so navedena v nadaljevanju.

Gojišča smo pripravljali tako, da smo večino topila dali v čašo z magnetnim mešalom in dodali suhe sestavine. Ko so se vse sestavine raztopile, smo raztopino prelili v merilni valj in dodali preostali del topila. Če je bilo potrebno umeriti pH, smo to storili pred dodatkom agarja. Gojišča smo avtoklavirali v Erlenmeyerjevih bučkah, prekritih z aluminijasto folijo 15 minut pri 121 °C. Po končanem avtoklaviranju smo gojišča ohladili na 55 °C in jih aseptično nalili v plastične petrijevke z različnimi premeri. Gojiščem pripravljenim za izolacijo gliv smo pred razlitjem dodali sterilno raztopino antibiotika kloramfenikol (50 mg/l), da smo preprečili bakterijsko rast. Ko so se gojišča strdila, smo jih zložili v plastično embalažo in jih do uporabe hranili v hladni komori pri 4 °C.

Kjer je navedeno smo pred avtoklaviranjem uravnali pH gojišč z uporabo 1,0 M NaOH oz. 1,0 M HCl.

3.2.1.1 Izolacijska gojišča

MEA (Agar s sladnim ekstraktom - Malt Extract Agar) (Blakeslee, 1915; Raper in Thom, 1949)

Sladni ekstrakt	20,0 g
Pepton	1,0 g
Glukoza	20,0 g
Agar	20,0 g
<u>Destilirana voda (dH₂O)</u>	<u>do 1000 ml</u>

pH 5,3 ± 0,3

MEA + X % NaCl (Agar s sladnim ekstraktom z dodatkom X % soli - Malt Extract Agar + X % NaCl)

Osnova gojišča je standardno gojišče iz sladnega ekstrakta (MEA), kateremu smo dodali ustrezne količine NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2003):

MEA + 5 % NaCl	50 g NaCl /l
MEA + 15 % NaCl	150 g NaCl /l
MEA + 17 % NaCl	170 g NaCl /l

3.2.1.2 Identifikacijska gojišča

Vsem gojiščem smo dodali bakrov-sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in cinkov-sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), da bi zagotovili pravilni razvoj zelene obarvanosti spor pri izolatih iz rodu *Penicillium* (Smith, 1949; Filtenborg in sod., 1990).

MEA (Agar s sladnim ekstraktom - Malt Extract Agar) (Blakeslee, 1915; Raper in Thom, 1949)

Sladni ekstrakt	20,0 g
Pepton	1,0 g
Glukoza	20,0 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Agar	20,0 g
<u>dH₂O</u>	<u>do 1000 ml</u>

pH 5,3 ± 0,3

CREA (Agar s kreatinom in saharozo - Creatine sucrose agar) (Frisvad, 1981, 1985, 1993)

Kreatin monohidrat	3,0 g
Saharaza	30,0 g

K ₃ HPO ₄ ·7H ₂ O	1,6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Bromkrezol vijolično	0,05 g
Agar	15,0 g
dH ₂ O	do 1000 ml

pH = 8,0 ± 0,2

CYA (Czapkov agar s kvasnim ekstraktom - Czapek yeast autolysate agar) (Pitt, 1979)

NaNO ₃	3,0 g
Kvasni ekstrakt	5,0 g
Saharoza	30,0 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Agar	15,0 g
dH ₂ O	do 1000 ml

pH = 6,3 ± 0,2

CY20S (Czapkov agar s kvasnim ekstraktom z 20 % saharoze - Czapek yeast extract agar with 20 % sucrose) (Pitt in Hocking, 1985)

NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g

KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Kvasni ekstrakt	5,0 g
Saharoza	200,0 g
Agar	15,0 g
<u>dH₂O</u>	<u>do 1000 ml</u>

pH = 5,2 ± 0,1

CY40S (Czapkov agar s kvasnim ekstraktom s 40 % saharoze - Czapek yeast extract agar with 40 % sucrose) (Pitt in Hocking, 1985, delno spremenjen)

NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Kvasni ekstrakt	5,0 g
Saharoza	400,0 g
Agar	15,0 g
<u>dH₂O</u>	<u>do 1000 ml</u>

pH = 5,2 ± 0,1

YES (Agar s kvasnim ekstraktom in saharozo - Yeast extract sucrose agar) (Frivvad, 1981; Filtenborg in sod., 1990)

Kvasni ekstrakt	20,0 g
Saharoza	150,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Agar	20,0 g
<u>dH₂O</u>	<u>do 1000 ml</u>

pH = $6,5 \pm 0,1$

DG-18 (Dikloran 18 % glicerolni agar - Dichloran 18 % glycerol agar) (Hocking in Pitt, 1980)

DG-18 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, VB) 31,5 g

Glicerol 220 g

dH₂O do 1000 ml

pH = $5,6 \pm 0,2$

3.2.1.3 Tekoče gojišče za izolacijo DNA (Raper in sod., 1972)

Glukoza 10,0 g

Pepton 2,0 g

Kvasni ekstrakt 2,0 g

MgSO₄ · 7H₂O 1,02 g

KH₂PO₄ 0,46 g

K₂HPO₄ 1,0 g

dH₂O do 1000,0 ml

3.2.2 Raztopina za suspenzijo spor (Spore suspension solute – SSS) (Pitt, 1979)

Tween 80 0,5 g

Agar 2,0 g

dH₂O do 1000,0 ml

3.2.3 Mešanica silikagela (Gerrits van den Ende in de Hoog, 1999)

Silikagel 30,0 g

Celit 545 15,0 g

Z mešanico (80 - 100 mg) napolnimo dno 2 ml mikrocentrifugirk z oglatim dnom. Mikrocentrifugirke avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C. Hranimo na sobni temperaturi.

3.2.4 Pufri

Pufer CTAB (Sambrook in sod., 1989)

Tris baza	2,42 g
NaCl	8,2 g
EDTA	0,74 g
CTAB	2,0 g
<u>Bidestilirana voda (ddH₂O)</u>	<u>do 100 ml</u>

pH=7,5 ± 0,1

Pufer TE (Sambrook in sod., 1989)

Tris baza	0,12 g
EDTA	0,04 g
<u>dH₂O</u>	<u>do 100 ml</u>

pH = 8,0 ± 0,1 uravnamo s HCl.

5x nanašalni pufer (Sambrook in sod., 1989)

Bromfenol modro	0,25 g
Ksilencianol	0,25 g
Glicerol	30 ml
<u>dH₂O</u>	<u>do 100 ml</u>

Pufra nismo avtoklavirali.

0,5 M EDTA (Sambrook in sod., 1989)

EDTA	186,12 g
------	----------

dH₂O do 1000 ml

pH=8, pH uravnamo z NaOH.

Pufra nismo avtoklavirali.

5x Puffer TBE (Sambrook in sod., 1989)

Tris baza	50,4 g
Borova kislina	27,5 g
EDTA (0,5 M)	20 ml
<u>dH₂O</u>	<u>do 1000 ml</u>

Pufra nismo avtoklavirali.

0,5x TBE puffer za AFLP (Radišek in sod., 2001, 2003)

Borova kislina	2,52 g
Tris baza	6,40 g
EDTA (0,5 M)	2 ml
<u>ddH₂O</u>	<u>do 1000 ml</u>

Pufra nismo avtoklavirali.

3.2.5 Geli za analizo DNA

1 % agarozni gel za elektroforezo

Agarozna	0,35 g
<u>0,5x TBE puffer</u>	<u>35 ml</u>

Agarozni gel smo pripravili po metodi, ki so jo objavili Sambrook in sod. (1989). Zatehtano agarozo smo prenesli v 100 ml Erlenmeyerjevo bučko ter jo segrevali v mikrovalovni pečici dokler se ni raztopila. Med segrevanjem smo mešali in dolili toliko destilirane vode, kot je izparelo. Ko se je raztopljena agarozna ohladila na približno

40 °C, smo ji dodali 7 µl etidijevega bromida s koncentracijo 1 mg/ml, jo pazljivo premešali in vlili v pripravljen model z glavnički.

Priprava gela za AFLP

Pri metodi AFLP smo uporabili ReproGel™ poliakrolamidni gel (Amersham Bioscience, ZDA). Priloženi raztopini smo zmešali po navodilih proizvajalca, zlili gel med stekleni plošči z glavničkom in ga za 10 min izpostavili UV žarkom, da je polimeriziral. Nato smo odstranili glavničke in plošči z gelom vstavili v sistem ALFexpress® ter v banjice dolili 0,5x TBE pufer do oznak.

3.3 UPORABLJENI VZORCI IN VZORČENJE

V izbrani mesni industriji v Sloveniji smo vzorčili tri različne izdelke. Poleg treh različnih vrst sušenih mesnin smo vzorčili tudi zrak v proizvodnji in v sušilnih komorah ter sol, ki se uporablja za soljenje mesnin.

3.3.1 Vzorčenje sušenih mesnin

Vzorčili smo tri različne izdelke, poimenovane izdelek št. 1, izdelek št. 2 in izdelek št. 3. Vsak izdelek smo vzorčili v petih paralelkah in v petih različnih fazah od začetka proizvodnje do končnega izdelka. V Preglednici 3 je povzet časovni potek vzorčenja izbranih izdelkov. Vzorčili smo naključno med izdelki iste proizvodne linije. Vzorce odvzete v sami proizvodnji smo v roku 24 ur prenesli v hladilni torbi v prostore Katedre za biologijo mikroorganizmov oddelka za biologijo BF UL. V laboratoriju smo z uporabo splošnih mikrobioloških tehnik (Pitt in Hocking, 1997) v laminariju točkovno izolirali nitaste glive na dve izolacijski gojišči MEA in MEA + 5 % NaCl, obe z dodanim kloramfenikolom (v nadaljevanju CH). Spore oz. dele hif smo za izolacijo izbrali glede na barvo in videz micelija. Po 10-dnevni inkubaciji v temni komori pri temperaturi 15 °C smo preverili čistost kultur. V primeru mešanih kultur smo izbrani izolat ponovno precepili. Čiste kulture na petrijevkah smo nato shranili v hladno komoro (4 °C) do postopka identifikacije.

Preglednica 3: Časovni potek vzorčenja izbranih sušenih mesnin.

Datum vzorčenja	Izdelek št. 1	Izdelek št. 2	Izdelek št. 3
17.07.06	1 - po 10. dneh (22 °C)	1 - začetek (16 - 18 °C)	
27.07.06	2 - po 20. dneh (14-16 °C)	2 - po 10. dneh (16 - 18 °C)	1 - po 3. dneh (22 °C)
03.08.06			2 - po 10. dneh (16 °C)
07.08.06	3 - po 30. dneh (14-16 °C)		
14.08.06			3 - po 21. dneh (16 °C)
16.08.06	4 - po 40. dneh (14-16 °C)	3 - po 30. dneh (16 - 18 °C)	
23.08.06			4 - po 30. dneh (16 °C)
28.08.06	5 - po 52 dneh (14-16 °C)	4 - po 52. dneh (16 - 18 °C)	
04.09.06			5 - po 42. dneh (16 °C)
27.09.06		5 - po 82. dneh (16 - 18 °C)	

3.3.1.1 Izdelek št. 1

Izdelek št. 1 je sušena mesnina v ovoju. Tehnološki postopek priprave tega izdelka poteka približno 60 dni. Začne se s soljenjem, ki traja 12 dni pri temperaturi od 2 °C do 3 °C, sledi hladna faza zorenja, ki traja 7 dni pri 2 °C, nato sledi 5 do 7 dnevna faza ogrevanja (sušenja) pri temperaturi od 22 °C do 16 °C. Nato sledita še dve fazi zorenja in sicer faza zorenja 1, ki traja od 14 do 21 dni pri temperaturi od 14 °C do 16 °C ter faza zorenja 2, ki traja do konca proizvodnje.

Izdelek št. 1 smo vzorčili prvič 10 dni po zaključku faze soljenja in nato v razmakih 10 dni. Vzorčili smo 5 krat.

Izdelek št. 1 in izdelek št. 2 sta se nahajala na isti proizvodni lokaciji.

3.3.1.2 Izdelek št. 2

Izdelek št. 2 je dimljena sušena mesnina brez ovoja. Tehnološki postopek obsega 14 dni soljenja pri temperaturi 2 °C, sledi hladna faza zorenja, ki traja 21 dni pri temperaturi do 7 °C, nato je izdelek izpostavljen 2-dnevnom dimljenju pri temperaturi do maksimalno 22 °C. Zadnja faza je faza zorenja, ki traja 3 mesece pri temperaturi od 16 °C do 18 °C.

Izdelek smo prvič vzorčili tri dni po začetku 3-mesečne faze zorenja. Drugo, tretje in četrto vzorčenje si je sledilo v razmaku 14 dni, zadnje vzorčenje pa smo opravili mesec dni po četrtem vzorčenju. Vzorčili smo 5 krat.

3.3.1.3 Izdelek št. 3

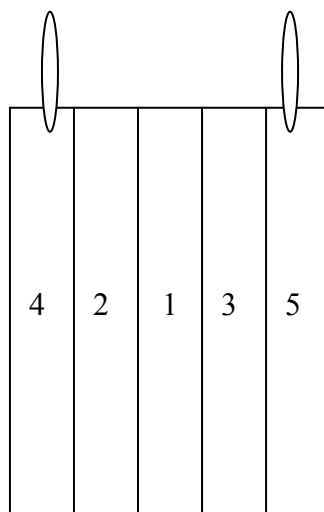
Izdelek št. 3 je sušena klobasa v ovoju. Tehnološki postopek izdelave traja približno 7 tednov, od tega je prvi teden po polnjenju izdelek shranjen pri temperaturi od 22 °C do 16 °C, nato sledi še od 5 do 6 tednov zorenja do končnega izdelka.

Prvo vzorčenje smo opravili 3 dni po izdelavi (polnjenju). Naslednje vzorčenje smo opravili 7 dni po prvem vzorčenju, naslednje tri pa v časovnih razmakih po 10 dni. Vzorčili smo 5 krat.

Izdelek št. 3 se je nahajal na drugi proizvodni lokaciji kot izdelka št. 1 in št. 2.



Slika 3: Odvzem vzorcev pri izdelku št. 1 (sušena mesnina v ovoju) in izdelku št. 3 (sušena klobasa v ovoju); 1-5 vzorčenja po planu na označenih vzorčnih mestih na izdelku (vzorčeno 5 krat v času dozorevanja od 1. do 60. dne za izdelek št. 1 in od 1. do 50. dne za izdelek št. 3)..



Slika 4: Odvzem vzorcev pri izdelku št. 2 (dimljena sušena mesnina brez ovoja); 1-5 vzorčenja po planu na označenih vzorčnih mestih na izdelku (vzorčeno 5 krat v času dozorevanja od 1. do 82. dne).

3.3.2 Vzorčenje zraka

Zrak smo vzorčili v prostorih proizvodnje in v sušilnih komorah proizvodnje izdelka št. 1 in izdelka št. 2. Vzorčili smo tako, da smo petrijevko z gojiščem MEA + 5 % NaCl + CH izpostavili zraku za 10 min (prilagojeno po Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Sledil je transport v laboratorij in inkubacija v temi pri 15 °C. Po izolaciji smo izolate precepili v čiste kulture in jih shranili v hladno komoro (4 °C) do postopka identifikacije.

3.3.3 Vzorčenje soli

Vzorčili smo sol v proizvodnji pripravljeno za nanos na mesnine in sol iz še izvorno zaprte in nepoškodovane embalaže. Raztopine soli smo filtrirali skozi membranski filter Millipore (pore velikosti 0,45 µm). Filtracijo smo izvedli tako, da smo 50 g soli raztopili v 150 ml sterilne vode, raztopino filtrirali ter filter položili na gojišče MEA + 5 % NaCl + CH (pilagojeno po Gunde-Cimerman in sod., 2000).

3.4 TAKSONOMSKE ANALIZE

Taksonomske analize smo izvedli na morfološkem, kemotaksonomskem in molekularno genetskem nivoju.

3.4.1 Morfološke analize

Za identifikacijo izolatov smo primarno izvedli makromorfološko analizo. Glede na makromorfologijo izolatov smo izolate pridobljene z izolacijskih gojiščih uvrstili v štiri rodove. V nadaljevanju smo za identifikacijo do vrste izolatov iz rodov *Penicillium*, *Aspergillus* in *Eurotium* nacepili s tritočkovno tehniko (Pitt, 1979) na identifikacijska gojišča. Izolate kvasovk in izolate iz rodu *Cladosporium* nismo identificirali do vrste. Poleg makromorfološke analize smo izvedli tudi mikromorfološke analize izolatov.

3.4.1.1 Makromorfološki opis

Z izolati iz rodov *Penicillium* in *Aspergillus* smo v SSS raztopini (3.2.2) pripravili suspenzijo spor in z njimi nacepili tritočkovno štiri identifikacijska gojišča MEA, CREA, CYA in YES in jih inkubirali pri temperaturi 25 °C v temi sedem dni (prilagojeno po Sonjak in sod., 2005; Samson in Frisvad, 2004). Podobno smo izolate iz rodu *Eurotium* nacepili na identifikacijska gojišča CY20, CY40 in DG18 ter jih inkubirali pri različnih temperaturah v temi. Gojišče CY20 smo inkubirali pri temperaturi 30 °C, gojišče CY40 pri temperaturi 25 °C, 30 °C in 37 °C ter gojišče DG18 pri temperaturi 25 °C (prilagojeno po Butinar in sod., 2005). Po sedemdnevni inkubaciji smo opisali obliko, barvo, izgled in premer kolonij, reverz in morebitno produkcijo vodotopnih pigmentov in eksudatov (Pitt in Hocking, 1997). Upoštevali smo parametre; rast, oblika kolonij, rob kolonij, barva kolonij in barva spor, obseg sporulacije, prisotnost in barva eksudata, značilnosti reverza, na gojišču CREA pa smo bili posebej pozorni na rast (prisotnost, odsotnost, velikost kolonij) in tvorbo kisline. Izolate smo na podlagi morfoloških podobnosti združili v skupine.

3.4.1.2 Mikromorfološki opis

Za mikromorfološki opis smo naključno izbrali nekaj izolatov iz vsake skupine makromorfološko podobnih si izolatov iz dominantnega rodu *Penicillium*. Del micelija smo z gojišč MEA ali CYA s sterilno iglo prenesli na objektno steklo, sprali z alkoholom in dodali kapljico 60 % mlečne kisline ali anilinskega modrila. Preparat smo pokrili s krovnim steklom (Samson in sod., 1995).

Vse preparate smo mikroskopirali in fotografirali z mikroskopom Olympus BX51 in kamero Olympus DP15. Pod fazno-kontrastnim mikroskopom smo določili verticilatnost ter izmerili za identifikacijo pomembne strukture kot so konidiji, fialide, metule in rami. Za vsako strukturo smo opravili 20 meritev in dimenzije podali kot povprečje izmerjenih struktur.

3.4.1.3 Identifikacija

Identifikacijo do vrste za izolate rodu *Penicillium* smo izvedli v sodelovanju z Department of Systems Biology (Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark), kjer so naredili kemotaksonomski profil, in s pomočjo literature Samson in Frisvad (2004) in Samson in sod. (1995). Za identifikacijo vrst iz rodu *Eurotium* pa smo uporabili ključ za identifikacijo nekaterih vrst iz rodu *Eurotium* (Frisvad, 2006. osebni vir; Preglednica 4).

3.4.2 Molekularno genetske taksonomske analize

V okviru molekularno genetskih analiz smo analizirali del nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2 (Slika 5) za vrste iz rodu *Aspergillus*, *Eurotium* in *Penicillium* ter del zaporedja gena za β -tubulin za vrste iz rodu *Penicillium* uvrščene v podrod *Penicillium* in na podlagi tega potrdili oz. ovrgli točnost identifikacije na nivoju morfologije.

Preglednica 4: Ključ za identifikacijo vrst iz rodu *Eurotium* (Frisvad, 2006. osebni vir)

CY40S / 37 °C dobra rast (v primerjavi z rastjo na CY40S / 25 ali 30 °C)	CY40S / 30 °C rumena reverz: svetlo rumen / rumen / zelen		<i>E. amstelodami</i>
	DG18 / 30 °C rumena / zlata / rjavkasta reverz: rjav / zlat / karamelne barve		<i>E. chevalieri</i>
	CY20S / 30 °C rumena / zlata / rjavkasta reverz: rjavkast v sredini		
CY40S / 37 °C ni / slaba rast (v primerjavi z rastjo na CY40S / 25 ali 30 °C)	CY20S / 30 °C dobra rast	CY40S / 30 °C topla rumena ("sončnična") reverz: rumen	<i>E. repens</i>
		CY40S / 30 °C oranžna / rdeča / rjasta	<i>E. rubrum</i>
	CY20S / 30 °C ni / slaba rast		<i>E. herbariorum</i> ali <i>E. echinulatum</i>

3.4.2.1 Izolacija genomske DNA

DNA smo izolirali po protokolu, ki sta ga objavila Gerrits van den Ende in de Hoog (1999). Dva tedna stare kulture smo s trdnega gojišča MEA cepili v 4 ml gojišča za izolacijo DNA v epruveti. Po štiridnevni inkubaciji pri sobni temperaturi smo s sterilno cepilno zanko prenesli micelij s površine tekočega gojišča v sterilno mikrocentrifugirko (2 ml) s približno 0,5 g mešanice celita in silikagela in dodali 500 µl pufra CTAB. Micelij smo homogenizirali s plutovrtom in sterilnimi mikropestilami. Homogeniziran micelij smo inkubirali 30 min v vodni kopeli pri 65 °C in nato centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min. Supernatant smo odpipetirali v čisto sterilno mikrocentrifugirko ter dodali 500 µl kloroforma, pretresli z vorteksom 1-2 sekundi in ponovno centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min. Vodno (zgornjo) fazo smo prenesli v čisto sterilno mikrocentrifugirko in ponovno dodali 500 µl kloroforma, centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in vodno fazo prenesli v čisto sterilno mikrocentrifugirko. Nato smo vodni fazi dodali dvakratni volumen 96 % etanola ohlajenega na -20 °C. Suspenzijo vodne faze in etanola smo inkubirali čez noč pri -20 °C. Po inkubaciji smo zmes centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in pazljivo

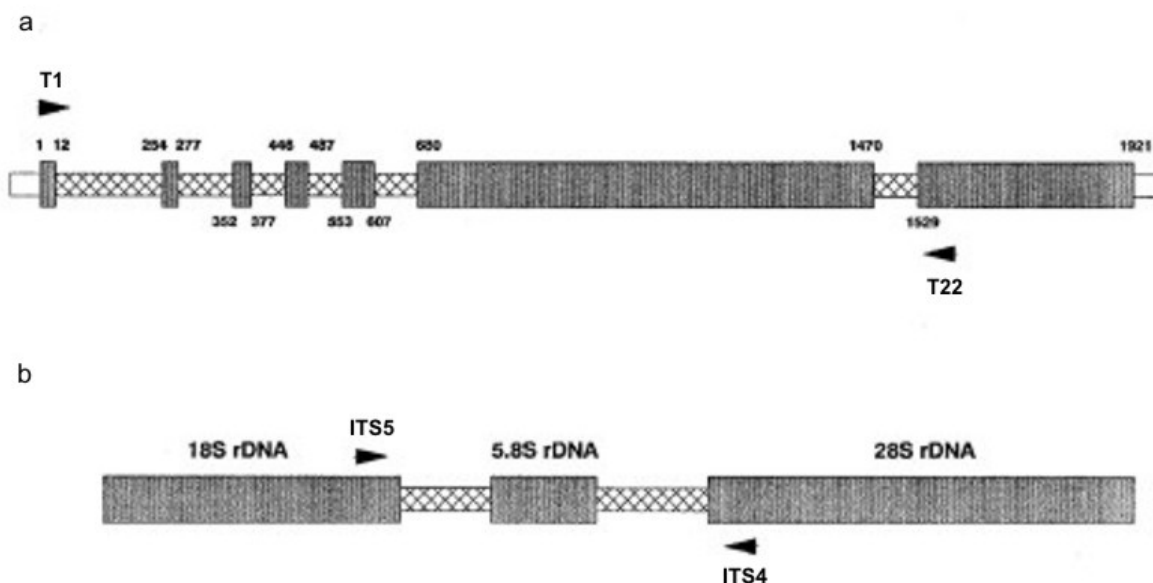
odstranili supernatant. Usedlino smo sprali s 500 μ l 70 % etanola ohlajenega na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in nato pazljivo odpipetirali etanol. DNA smo posušili, nato pa raztopili v 50 μ l TE pufra.

3.4.2.2 Pomnoževanje dela zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 in dela zaporedja gena za β -tubulin z verižno reakcijo s polimerazo

Pomnoževanje dela zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 in dela zaporedja gena za β -tubulin smo izvedli s cikličnim sistemom Eppendorf. Pomnoževanje dela zaporedja gena za β -tubulin smo izvedli le za vrste iz rodu *Penicillium* uvrščene v subgenus *Penicillium* (Samson in sod. 2004).

Za pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 smo uporabili univerzalna evkariontska oligonukleotidna začetnika ITS4 in ITS5. Oligonukleotidni začetnik ITS4 (zaporedje: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') nalega na 3' konec 28S rDNA. Oligonukleotidni začetnik ITS5 (zaporedje: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') pa nalega na 5' konec 18S rDNA (White in sod., 1990).

Za pomnoževanje dela zaporedja gena za β -tubulin smo uporabili oligonukleotidna začetnika T1 in T22. Oligonukleotidni začetnik T22 (zaporedje: 5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') nalega na 3' konec gena za β -tubulin. Oligonukleotidni začetnik T1 (zaporedje: 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') pa nalega na konec 5' gena za β -tubulin (O'Donnell in Cigelnik, 1997).



Slika 5: Lokacija naleganja oligonukleotidnih začetnikov: a) T1 in T22 na genu za β -tubulin in b) ITS4 in ITS5 na genih jedrne rDNA (Glass in Donaldson, 1995: 1327).

Priprava 25 μ l mešanice za PCR (1 vzorec)

10x pufer	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μ l
dNTP (10 mM)	1,0 μ l
oligonukleotidni začetnik 1 (20 μ M)	1,0 μ l
oligonukleotidni začetnik 2 (20 μ M)	1,0 μ l
<i>Taq</i> DNA polimeraza (5 U/ μ l)	0,25 μ l
ddH ₂ O	16,75 μ l
<u>DNA</u>	<u>1,0 μl</u>

Mešanico za PCR smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+2 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 2-negativna kontrola in rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl₂, dNTP in oligonukleotidni začetniki ITS4 in ITS5 oz. T1 in T22. Po dodatku oligonukleotidnih začetnikov smo zmes dobro premešali, dodali polimerazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 μ l) smo odpipetirali DNA oziroma enako količino sterilne bidestilirane vode v primeru negativne kontrole ter dodali 24 μ l PCR mešanice.

Program za pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo:

94 °C 180 sekund začetna denaturacija

94 °C	35 sekund	} 40 ciklov
52 °C	35 sekund	
72 °C	45 sekund	

72 °C 420 sekund končna elongacija

4 °C ∞

3.4.2.3 Gelska elektroforeza

Po končani verižni reakciji s polimerazo smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Agarozni gel (1 %) smo pripravili po receptu opisanem v poglavju 3.2.5. Iz gela smo odstranili glavničke in ga skupaj z nosilcem prenesli v elektroforezno banjico. Banjico smo napolnili z 0,5x pufrom TBE tako, da je bil gel popolnoma prekrit s pufrom (Sambrook in sod., 1989).

Na traku parafilma smo si pripravili vzorce po spodnjem receptu in jih s pipeto prenesli v luknjice na gelu. Luknjice ob robovih smo pustili prazne, v prvo naslednjo smo nanegli lestvico (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA lestvica), sledila je negativna kontrola in nato vzorci. Elektroforeza je potekala pod napetostjo 90 V približno pol ure. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali na transiluminatorju in ga obdelali z računalniškim programom UVI.

Priprava lestvice

Lestvica	2,0 µl
5x nanašalni pufer	1,0 µl
<u>ddH₂O</u>	<u>5,0 µl</u>

Priprava vzorcev

PCR pomnožek	3,0 μ l
5x nanašalni pufer	2,0 μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>3,0 μl</u>

3.4.2.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje pomnožka je določilo podjetje Macrogen (Seoul, Koreja) z DNA sekvenatorjem 3730xl, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi.

Nukleotidna zaporedja pomnožkov smo pregledali z računalniškim programom Clustal X (Thompson in sod., 1997) in jih z uporabo spletnega orodja basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul in sod., 1990, 1997) primerjali s tistimi v National Center for Biotechnology (NCBI, 2007). Prikazali smo dolžino uporabljenega zaporedja DNA, vrsto z najvišjim odstotkom podobnosti ter ustrezne E vrednosti (verjetnost, da je ugotovljena stopnja podobnosti slučajna, kjer vrednost $E=1$ predstavlja naključno podobnost, vrednosti manjše od ena pa nakazujejo, da so zaporedja morebiti homologna – manjša, kot je E vrednost, večja je verjetnost, da sta zaporedji homologni) (NCBI, 2007).

3.4.3 Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP)

Identificirane vrste smo primerjali med seboj in določili kot dominantno vrsto *Penicillium nordicum*. S sevi te vrste smo izvedli AFLP analizo. Polimorfizem dolžin pomnoženih zaporedij je genotipizacijska metoda, ki sestoji iz sedmih korakov.

3.4.3.1 Restrikcija genomske DNA

Z merjenjem absorbance svetlobe pri 260 in 280 nm smo določili koncentracijo in čistost izolirane genomske DNA ter pripravili 7,5 μ l raztopine, ki je vsebovala 250 ng DNA. Restriksijsko mešanico smo pripravili po sledečem protokolu (prilagojeno po Sonjak in sod., 2007).

Priprava 20 μ l restrikcijske mešanice (1 vzorec)

DNA (250 ng)	7,5 μ l
Pufer Y ⁺ /Tango 10x	2,5 μ l
<i>Eco</i> RI 10 U/ μ l	0,125 μ l
<i>Msp</i> I 10 U/ μ l	0,125 μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>9,75 μl</u>

Restrikcijsko mešanico smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda in pufer. Raztopino smo dobro premešali, dodali restrikcijske encime in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 μ l) smo odpipetirali DNA ter dodali 12,5 μ l restrikcijske mešanice.

Restrikcijsko mešanico smo inkubirali 3 ure v vodni kopeli pri 37 °C in nato restrikcijske endonukleaze inaktivirali z 20 min. inkubacijo pri 65 °C.

3.4.3.2 Priprava adapterjev

Mešanici adapterjev *Eco*RI in *Msp*I smo pripravili ločeno po sledečem protokolu (prilagojeno po Radišek in sod., 2001, 2003; Sonjak in sod., 2007).

Priprava 40 μ l adapterja *Eco*RI (5 pmol/ μ l)

<i>Eco</i> RI linker 1 (1 μ g/ μ l)	1,02 μ l
<i>Eco</i> RI linker 2 (1 μ g/ μ l)	1,10 μ l
TrisHCl (1 M, pH = 7,7)	10,00 μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>27,88 μl</u>

Priprava 40 μ l adapterja *Msp*I (50 pmol/ μ l)

<i>Msp</i> I linker 1 (1 μ g/ μ l)	6,75 μ l
<i>Msp</i> I linker 2 (1 μ g/ μ l)	6,45 μ l
TrisHCl (1 M, pH = 7,7)	10,00 μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>16,31 μl</u>

Mikrocentrifugirki z mešanicama adapterjev smo dali v segret termoblok (98 °C), ter počakali, da je temperatura padla na 25 °C.

3.4.3.3 Ligacija

Ligacija je potekala po sledečem protokolu (prilagojeno po Radišek in sod., 2001, 2003; Sonjak in sod., 2007).

Priprava 25 µl ligacijske mešanice (1 vzorec)

Restriksijska mešanica	20,0 µl
Adapter <i>MspI</i>	0,5 µl
Adapter <i>EcoRI</i>	0,5 µl
Ligacijski pufer 10x	0,5 µl
Ligaza T4 (1 U/ µl)	0,3 µl
<u>ddH₂O</u>	<u>3,2 µl</u>

Restriksijsko mešanico smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N=število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer in oba adapterja. Raztopino smo dobro premešali, dodali ligazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo odpipetirali restriksijsko mešanico ter dodali 5 µl ligacijske mešanice.

Inkubirali smo pri 22 °C čez noč. Encim smo inaktivirali z 10 min. inkubacijo pri 65 °C.

3.4.3.4 Predhodno pomnoževanje

Predhodno pomnoževanje je potekalo po sledečem protokolu (Radišek in sod., 2001, 2003; Sonjak in sod., 2007).

Priprava 25 µl mešanice za PCR (1 vzorec)

Restriksijsko-ligacijska mešanica	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl

Pufer s sulfatom (10x)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
oligonukleotidni začetnik <i>EcoRI</i> (75 ng/µl)	0,5 µl
oligonukleotidni začetnik <i>MspI</i> (75 ng/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraza (5 U/µl)	0,15 µl
<u>ddH₂O</u>	<u>16,85 µl</u>

Mešanico za PCR smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl₂, dNTP in oligonukleotidne začetnike *EcoRI* in *MspI*. Po dodatku oligonukleotidnih začetnikov smo zmes dobro premešali, dodali polimerazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo odpipetirali restriksijsko-ligacijsko mešanico ter dodali 22,5 µl mešanice za PCR.

Program za preamplifikacijo s cikličnim sistemom Eppendorf :

94 °C	30 sekund	} 20 ciklov
56 °C	60 sekund	
72 °C	60 sekund	

3.4.3.5 Pomnoževanje

Pomnoževanje je potekalo po sledečem protokolu (Radišek in sod., 2001, 2003; Sonjak in sod., 2007).

Priprava 10 µl mešanice za PCR (1 vzorec)

Preamplifikacijska mešanica	2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,6 µl
Pufer s sulfatom 10x	1,0 µl
dNTP (10 mM)	0,2 µl
oligonukleotidni začetnik <i>EcoRI</i> (15 ng/µl)	1,0 µl
oligonukleotidni začetnik <i>MspI</i> (15 ng/µl)	1,0 µl

<i>Taq</i> DNA polimeraza (5 U/ μ l)	0,06 μ l
ddH ₂ O	4,14 μ l

Mešanico za PCR smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl₂, dNTP in oligonukleotidne začetnike *Eco*RI in *Msp*I. Po dodatku oligonukleotidnih začetnikov smo zmes dobro premešali, dodali polimerazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 μ l) smo odpipetirali preamplifikacijsko mešanico ter dodali 8 μ l mešanice za PCR.

Program za amplifikacijo s cikličnim sistemom Eppendorf:

94 °C	30 sekund	} 13 ciklov
65 °C (-0,7 °C na cikel)	30 sekund	
72 °C	60 sekund	

94 °C	30 sekund	} 23 ciklov
56 °C	30 sekund	
72 °C	60 sekund	

4 °C ∞

3.4.3.6 Priprava vzorcev in poliakrilamidna gelska elektroforeza

Vzorci smo pripravili po sledečem protokolu (Radišek in sod., 2001, 2003; Sonjak in sod., 2007).

Po končani amplifikaciji smo vzorcem dodali mešanico formamida in barvila ter jih denaturirali z inkubacijo pri 94 °C 5 min in jih nato takoj prenesli na led. Enako smo naredili z lestvico.

Lestvico in vzorce smo s pipeto nanесли v luknjice gela (glej poglavje 3.2.5), ki smo jih pred tem temeljito sprali s pufrom. Elektroforeza je potekala pod naslednjimi pogoji:

- Električna napetost 1500 V
- Električni tok 60 mA
- Električna energija 15 W
- Temperatura 55 °C
- Čas reakcije 450 min
- Čas vzorčenja 1 s

3.4.3.7 Analiza gela

Gel smo analizirali z računalniškim programom Fragment Analyzer ter ročno. Elektroforegram smo pretvorili v matriko, kjer je kolona predstavljal sev, vrstica pa vrh na elektroforegramu. Če je bil določen vrh prisoten pri določenem sevu, smo to označili z 1, če je bil odsoten, pa z 0. Iz podatkov urejenih v matriko, smo s programom FreeTree (Pavliček in sod., 1999) izračunali podobnost ugotovljenih profilov Jaccard-ovega koeficienta. Jaccard-ov koeficient uporabimo takrat, kadar imamo veliko število rezultatov 0, ki nastanejo zaradi izbire neustreznih lastnosti. Ta koeficient ne upošteva parov 0-0. Za ugotavljanje podobnosti elektroforetskih profilov smo uporabili netehtano metodo parnih skupin z aritmetično sredino UPGMA (unweighted paired group method of agglomerative hierarchical clustering). Kladograme smo pregledovali s programom TreeView (Page, 2000).

3.4.4 Analiza profila sekundarnih metabolitov z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC)

Analizo profilov sekundarnih metabolitov izbranih izolatov so opravili na oddelku Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark kot je opisano v Frisvad in Thrane (1987; 1993) in Smedsgaard (1997).

4 REZULTATI

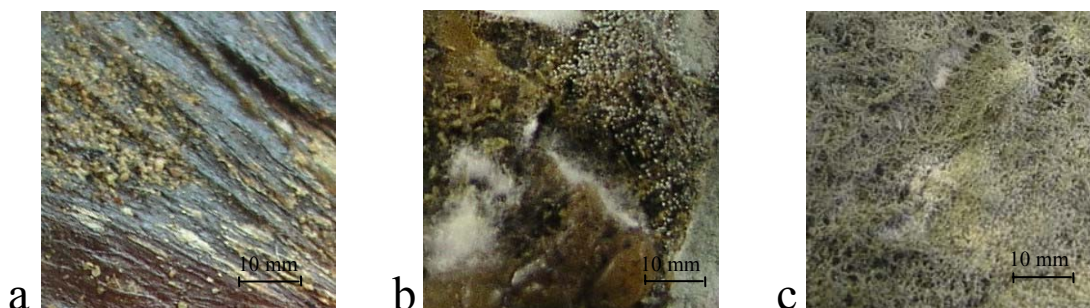
Delo na delovni hipotezi o izvoru in vrsti gliv, ki okužujejo sušene mesnine je potekalo od julija 2006 do decembra 2006. Terensko delo je potekalo z namenom vzorčenja na dveh različnih proizvodnih lokacijah sušenih mesnin v Sloveniji. V ekperimentalnem delu smo na izbranih izolacijskih gojiščih pridobili 400 izolatov katere smo identificirali in izmed vseh določili prevladujočo vrsto. Rezultati so predstavljeni na devetih slikah in v sedmih preglednicah.

4.1 OPIS STANJA ODVZETIH VZORCEV IN PREVERJANJE PRISOTNOSTI KVASOVK TER RAZLIČNIH RODOV NITASTIH GLIV

Izbrane vzorce mesnin treh različnih izdelkov smo iz proizvodnega obrata transportirali na Katedro za biologijo mikroorganizmov (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani), kjer smo jih opisali, poslikali in osamili glive s površine sušenih mesnin.

4.1.1 Opis stanja vzorcev izbranih sušenih mesnin pred izolacijo

Pred izolacijo gliv smo ocenili obsežnost kontaminacije vzorcev sušenih mesnin in opisali vidne lastnosti rasti kvasovk in nitastih gliv. Za lažje razumevanje opisov stanja vzorcev je na Sliki 6 prikazana lestvica ocene preraščenosti površin sušenih mesnin z glivami. Preraščenost smo ocenili na izdelku št. 2 na površini 50 mm x 50 mm.



Slika 6: Lestvica ocene preraščenosti površin sušenih mesnin z glivami. a) Ni rasti gliv na površini sušene mesnine, b) delno preraščena površina sušene mesnine in c) popolnoma preraščena površina sušene mesnine z glivami. Izdelek št. 2 (dimljena sušena mesnina brez ovoja) fotografiran z digitalnim fotoaparatom Camedia C-5050 200M Olympus pri dnevni svetlobi z razdalje 20 cm.

4.1.1.1 Izdelek št. 1 - opis stanja po pregledu petih paralelk vzorcev

Vzorčenje 1 (10 dni): Vzorci so bili po površini le delno preraščeni z nitastimi glivami. Nitaste glive so bile prisotne le na določenih predelih, prisotne pa so bile tudi kvasovke (bele in belo rumene kolonije). Opazili smo štiri morfološko različne tipe nitastih gliv (zelene, bele, sive z manj micelija in sivo modre). Števila nitastih gliv ni bilo mogoče določiti.

Vzorčenje 2 (20 dni): Vzorci so bili že bolj preraščeni. Vidne so bile še kvasovke (bele in belo rumene kolonije), ki jih nismo določali, ter že več nitastih gliv (zelene, bele in sive z manj micelija).

Vzorčenje 3 (30 dni): Vzorci so bili že skoraj v celoti preraščeni. Prevladovala sta dva tipa gliv, nitaste glive (temno sive z gostim zračnim micelijem) in kvasovke (bele kompaktne). Pojavljale so se tudi rjavo rumene, bele, zelene in sive z malo zračnega micelija).

Vzorčenje 4 (40 dni): Ni opaznega povečanja v preraščenosti vzorcev. Prevladovala sta dva morfološka tipa nitastih gliv (temno sive in zelene; pojavljale so se tudi rjave in bele) in kvasovke (bele kompaktne).

Vzorčenje 5 (52 dni): Ni opaznega povečanja preraščenosti vzorcev. Prevladovala sta dva morfološka tipa nitastih gliv (temno sive, zelene) in kvasovke (bele kompaktne).

4.1.1.2 Izdelek št. 2 - opis stanja po pregledu petih paralelk vzorcev

Vzorčenje 1 (začetek): Vzorci še niso bili preraščeni z nitastimi glivami, opazili smo le rahlo rast enga tipa (bele). Zato smo naredili brise površin in razmaze na gojišča in s tem ugotovili prisotnost propagul določenih vrst.

Vzorčenje 2 (10 dni): Vzorci so bili že vidno preraščeni z nitastimi glivami. Prevladoval je en tip (bele; pojavljale pa so se tudi sive z malo micelija in bele z zelenimi sporami). Prisotne so bile tudi kvasovke (bele kompaktne).

Vzorčenje 3 (30 dni): Vzorci so bili že močno preraščeni z nitastimi glivami, ki so tudi močno sporulirale. Prevladoval je en tip nitastih gliv (zelene; pojavljale pa so se tudi rumene, bele puhaste in sive z malo micelija). Prisotne so bile tudi kvasovke (bele kompaktne).

Vzorčenje 4 (52 dni): Vzorci so bili močno preraščeni. Čez celo površino vzorcev sta prevladovala dva tipa nitastih gliv (zelene in sive z malo micelija; pojavljale pa so se tudi bele puhaste, rumene in rjave). Prisotne so bile tudi kvasovke (bele kompaktne).

Vzorčenje 5 (82 dni): Vzorci so bili močno preraščeni. Prevladoval je en tip nitastih gliv (zelene; pojavljale pa so se tudi rumene (več kot prej), bele puhaste, rjave in sive z malo micelija). Prisotne so bile tudi kvasovke (bele kompaktne).

4.1.1.3 Izdelek št. 3 - opis stanja po pregledu petih paralelk vzorcev

Vzorčenje 1 (3 dni): Vzorci so bili neintenzivno a enakomerno poraščeni z dvema morfološkima tipoma gliv. Nitaste glive (bele puhaste) in kvasovke (bele ploske in kompaktne).

Vzorčenje 2 (10 dni): Površina vzorcev je bila že skoraj popolnoma preraščena. Prevladoval je en tip nitastih gliv (zeleno-modre puhaste; pojavljale pa so se tudi bele in rjavo-rumene). Pojavljale so se tudi kvasovke (bele ploske in kompaktne).

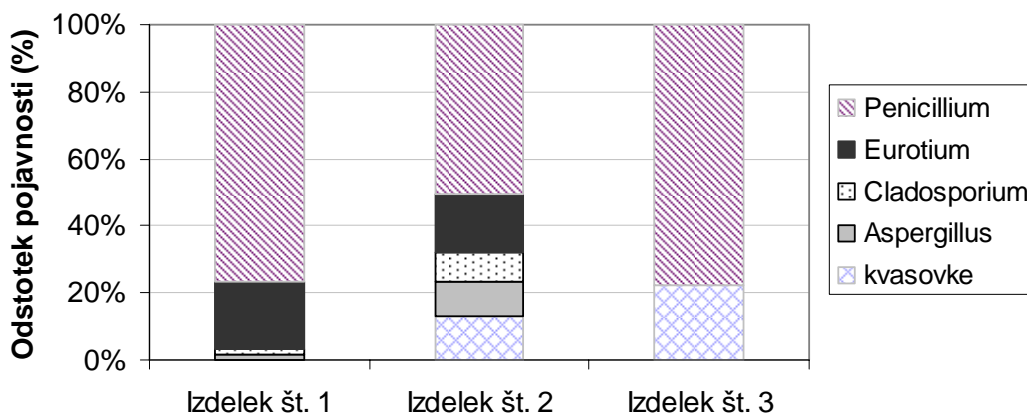
Vzorčenje 3 (21 dni): Vzorci so bili že precej preraščeni. Prevladoval je en tip nitastih gliv (zeleno-modre puhaste; pojavljale pa so se tudi bele in rjavo-rumene). Pojavljale so se tudi kvasovke (bele ploske in kompaktne).

Vzorčenje 4 (30 dni): Vzorci so bili že precej preraščeni. Prevladoval je en tip nitastih gliv (sivo-modre puhaste; pojavljale pa so se tudi bele, rjavo-rumen in zelene). Pojavljale so se tudi kvasovke (bele ploske in kompaktne).

Vzorčenje 5 (42 dni): Vzorci so bili že precej preraščeni. Prevladoval je en tip nitastih gliv (sivo-modre puhaste; pojavljale pa so se tudi bele, rjavo-rumene in zelene). Pojavljale so se tudi kvasovke (bele ploske in kompaktne).

4.1.2 Kvasovke in različni rodovi nitastih gliv izolirani s površin sušenih mesnin

Tekom vzorčenja smo izolirali 132 izolatov s površine izdelka št. 1, 164 s površine izdelka št. 2 in 103 s površine izdelka št. 3. Izolirali smo kvasovke in nitaste glive, ki smo jih uvrstili v štiri rodove: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium* in *Penicillium*. Število omenjenih rodov nitastih gliv in kvasovk na različnih izdelkih v odstotkih je prikazano na Sliki 7.



Slika 7: Delež nitastih gliv in kvasovk izoliranih s površin izdelka št. 1 (sušena mesnina v ovoju), izdelka št. 2 (dimljena sušena mesnina brez ovoja) in izdelka št. 3 (sušena klobasa v ovoju).

4.1.3 Različni rodovi nitastih gliv prisotni v vzorcih soli

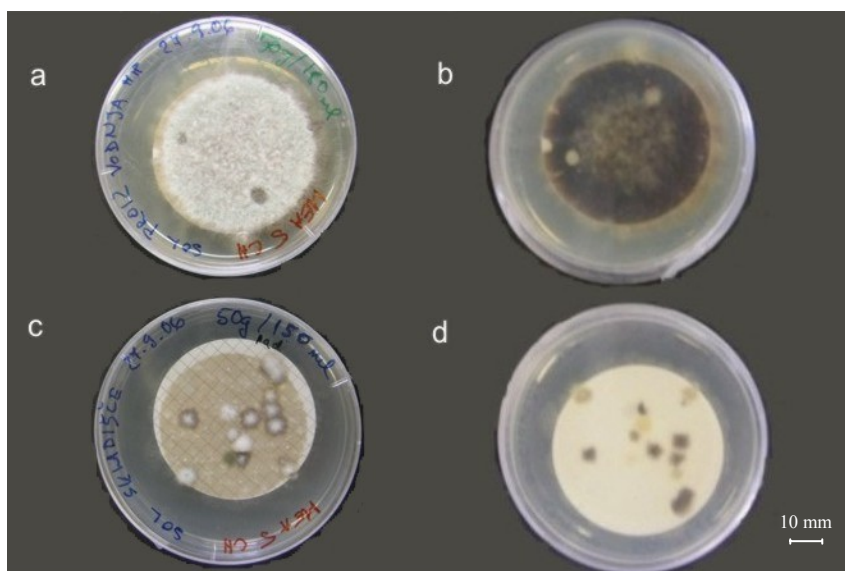
Opis stanja vzorcev soli smo opravili po filtraciji in 7-dnevni inkubaciji na gojišču MEA + 5 % NaCl + CH pri 15 °C v temi, ko je bilo mogoče razlikovati značilnosti posameznih kolonij (Slika 8).

Sol iz embalaže:

Po sedmih dneh inkubacije je zraslo nekaj belih okroglih kvasnih kolonij ter nitaste glive, ki smo jih uvrstili v naslednje rodove; ena zelena kolonija, ki smo jo uvrstili v rod *Cladosporium*, nekaj rumenih kolonij gliv, ki smo jih uvrstili v rod *Eurotium* in 14 kolonij, ki smo jih uvrstili v rod *Penicillium*.

Sol iz proizvodnje:

Po sedmih dneh inkubacije je bil filter papir popolnoma preraščen s nitastimi glivami in gojišče neštevno. Prevladoval je micelij vrst iz rodu *Penicillium*, ki smo ga v nadaljevanju izolirali v čisti kulturi in identificirali.



Slika 8: Izgled vzorcev soli po filtraciji in sedmih dneh inkubacije na gojišču MEA + 5 % NaCl + CH pri 15 °C v temi. a) Sol iz skladišča, b) reverz plošče a, c) sol iz embalaže in d) reverz plošče c. Fotografirano z digitalnim fotoaparatom Camedia C-5050 200M, Olympus pri dnevni svetlobi z razdalje 20 cm.

4.1.4 Različni rodovi nitastih gliv prisotni v vzorcih iz zraka

Opis stanja vzorcev zraka smo opravili po 11-dnevni inkubaciji gojišča MEA + 5 % NaCl + CH pri 15 °C v temi, ki je bilo izpostavljeno zraku za 10 min, ko je bilo mogoče razlikovati značilnosti posameznih kolonij.

Zrak iz celice z izdelkom št. 1:

Po enajstih dneh inkubacije je na gojišču zraslo 40 kolonij. Našteli smo 7 kolonij nitastih gliv, ki smo jih uvrstili v rod *Aspergillus*, 19 kolonij, ki smo jih uvrstili v rod *Eurotium*, in 14 uvrščenih v rod *Penicillium*.

Zrak iz celice z izdelkom št. 2:

Gojišče je bilo že po petih dneh neštevno. Z izolacijo čistih kultur nismo nadaljevali.

Zrak iz proizvodnje:

Po petih dneh inkubacije smo na gojišču paralelke 1 prešteli 7, po enajstih dneh pa 13 kolonij nitastih gliv. Od teh smo jih 5 uvrstili v rod *Eurotium* in 8 v rod *Penicillium*. Na gojišču paralelke 2 pa je po petih dneh zraslo 10, po enajstih dneh pa 11 kolonij. Od teh smo eno uvrstili v rod *Cladosporium*, eno v rod *Eurotium* in 9 kolonij nitastih gliv v rod *Penicillium*.

4.2 IDENTIFIKACIJA IZOLATOV DO VRSTE

Skupno smo izolirali 413 izolatov, ki so shranjeni v zbirki ekstremofilnih gliv EX-F Katedre za biologijo mikroorganizmov (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija). Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije je prikazan v Prilogi A. Izolirali smo tudi kvasovke, ki jih nismo vključili v nadaljne analize identifikacije in nitaste glive iz rodov *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium* in *Penicillium*. Izolatov iz rodu *Cladosporium* nismo identificirali do vrste.

Od vseh izolatov pridobljenih iz vzorcev soli in zraka smo v nadaljevanju identificirali le pripadnike rodu *Penicillium*.

Identifikacijo izolatov smo naredili na več nivojih. Izvedli smo makromorfološko analizo, mikromorfološko analizo in analizo nukleotidnega zaporedja izbranih sevov.

4.2.1 Morfološka analiza izolatov

Makromorfološke lastnosti smo opisali pri izolatih iz rodov *Aspergillus*, *Eurotium* in *Penicillium*, mikromorfološke pa pri izolatih iz rodu *Penicillium*.

Izolate smo glede na morfološke lastnosti razvrstili v skupine, jih opisali in določili. Premere kolonij smo na različnih gojiščih izmerili za vsak posamezen izolat (Priloga B in C), v nadaljevanju pa so prikazana le povprečja za posamezno skupino - vrsto.

4.2.1.1 Morfološka analiza izolatov iz rodu *Aspergillus*

Morfološki tip I

Identifikacija: *Aspergillus versicolor*

Število izolatov: 19

Vir izolacije: Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.

Opis:

CYA: Okrogle, koncentrične, rahlo valovite, izbočene kolonije z valovitim ali nepravilnim robom. Bel micelij in rumene, zelene ter modre spore. Sporulacija koncentrična in dvobarvna. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumeno-oranžen ali belo-krem.

Premjer: 16,92 cm

CREA: Dobra rast. Sevi niso tvorili kisline.

Okrogle kolonije z nepravilnim robom. Bel micelij in rumene ali zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije.

Premjer: 11,79 cm

MEA: Okrogle, gladke, izbočene in žametne kolonije z ravnim ali nepravilnim robom. Bel micelij in zelene in rumene spore. Sporulacija je bila dvobarvna. Reverz rumen, rahlo prosojen.

Premjer: 13,57 cm

YES: Okrogle, nagubane, puhaste kolonije z valovitim robom. Bel micelij in zelene in rumene spore. Sporulacija je bila koncentrična in dvobarvna. Reverz rumen ali rumeno-krem in naguban.

Premjer: 24,74 cm

Vse izolirane seve iz rodu *Aspergillus* smo identificirali kot *A. versicolor*.

4.2.1.2 Morfološka analiza izolatov iz rodu *Eurotium*

Izolate iz rodu *Eurotium* smo po štirinajstih dneh inkubacije s pomočjo enostavnega identifikacijskega ključa razvrstili v sedem morfoloških tipov glede na prisotnost/odsotnost rasti na posameznih gojiščih, obarvanosti kolonij in reverza pri določeni temperaturi (Preglednica 5)

Izmerili smo tudi premere, kjer je to bilo mogoče. Rezultati meritev so zajeti v Prilogi C.

Izolate rodu *Eurotium* smo po večini identificirali kot *E. herbariorum* ali *E. echinulatum*, osem smo jih identificirali kot *E. repens*, tri kot *E. amstelodami*, dva kot *E. repens* ali *E. rubrum* in le enega kot *E. rubrum*.

Preglednica 5: Lastnosti rasti različnih morfoloških tipov izolatov iz rodu *Eurotium* po štirinajstih dneh inkubacije.

TIP	CY40 (37 °C)	CY40 (30 °C)	CY40 (25 °C)	CY20 (30 °C)	DG-18 (30 °C)	Identifikacija	Število izolatov	Vir izolacije
I	/	/	dobra rast - svetlo rumena, reverz rumen	/	/	<i>E. herbariorum</i> ali <i>E. echinulatum</i>	12	Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.
II	/	/	dobra rast - svetlo rumena, reverz rumen	dobra rast - svetlo rumena, reverz rumen	/	<i>E. repens</i> ali <i>E. rubrum</i>	2	Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.
III	/	dobra rast - svetlo rumena, reverz rumen	dobra rast - svetlo rumena, reverz rumen	/	/	<i>E. herbariorum</i> ali <i>E. echinulatum</i>	29	Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.
IV	/	dobra rast - oranžno rdeča, reverz oranžen	dobra rast - oranžno rdeča, reverz oranžen	dobra rast - oranžno rdeča, reverz oranžen	dobra rast - oranžno rdeča, reverz oranžen	<i>E. rubrum</i>	1	Izdelek št. 1.
V	/	dobra rast - rumena, reverz rumen	dobra rast - rumena, reverz rumen	dobra rast - rumena, reverz rumen	/	<i>E. repens</i>	8	Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.
VI	dobra rast - rumena, reverz rumen	dobra rast - rjavo zelena, reverz zelen	dobra rast - rumeno zelena, reverz zelen	dobra rast - rumeno zelena, reverz zelen	dobra rast - rumeno zelena, reverz rumen	<i>E. amstelodami</i>	3	Izdelek št. 1.

Legenda: / ni rasti

4.2.1.3 Morfološka analiza izolatov iz rodu *Penicillium*

Morfološki tip I

Identifikacija: *Penicillium chrysogenum*

Število izolatov: 1

Vir izolacije: Izdelek št. 1.

Opis:

CYA: Okrogle, žametne ter žarkaste kolonije z rahlo izbočeno sredino in ravnim robom. Bel micelij in zelene spore, s sporulacijsko cono, ki je segala čez večji del kolonije. Prisoten je bil rumen eksudat. Reverz temno krem.

Premjer: 33,63 cm

CREA: Slaba rast. Sevi so dobro tvorili kislino.

Premjer: 23,18 cm

MEA: Velike, krogle, ploske in žametne kolonije z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumeno-krem in prosojen. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premjer: 28,58 cm

YES: Zelo velike, okrogle kolonije, nagubane z izbočeno sredino in ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumen.

Premjer: 49,27 cm

Morfološki tip II

Identifikacija: *Penicillium nalgiovense*

Število izolatov: 34

Vir izolacije: Izdelek št. 3, sol iz embalaže, zrak iz celice z izdelkom št.1 in zrak iz proizvodnje.

Opis:

CYA: Velike, okrogle, ploske in nagubane kolonije z ravnim robom. Bel micelij, spore svetlo zelene, temno zelene ali modre. Sporulacija je bila zelo intenzivna. Sporulacijska

cona je prekrivala večji del kolonije in je bila močnejša v centralnem delu. Prisoten je bil brezbarven eksudat. Reverz krem ali rumen.

Premier: 29,91 cm

CREA: Slaba rast. Sevi so dobro tvorili kislino (tvorba kisline do roba kolonije).

Premier: 18,10 cm

MEA: Okrogle, ploske in žametne kolonije z ravnim robom. Bel micelij in temno zelene spore. Sporulacijska cona je prekrivala večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumeno-oranžen, temnejši v centralnem delu. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premier: 22,92 cm

YES: Velike nagubane kolonije, nekatere z izbočeno sredico. Rob kolonij je bil valovit. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumeno-oranžen z razpokami.

Premier: 35,04 cm

Morfološki tip III

Identifikacija: *Penicillium nordicum*

Število izolatov: 200

Vir izolacije: Izdelek št. 1, izdelek št. 2, izdelek št. 3, sol iz embalaže, sol iz proizvodnje, zrak iz celice z izdelkom št.1 in zrak iz proizvodnje.

Opis:

CYA: Okrogle, izbočene kolonije, nagubane z valovitim robom. Bel micelij, spore bele, rumene, zelene ali modro-zelene. Nekateri sevi so imeli intenziven, skoraj črn, temen rob. Sporulacija šibkejša, pri nekaterih sevih tudi močnejša, v centru kolonij. Eksudat prisoten pri nekaterih sevih, brezbarven ali rumen. Reverz krem, temno krem ali temno rjav.

Premier: 17,10 cm

CREA: Rast na CREA zelo slaba ali slaba. Sevi niso tvorili kisline.

Premier: 9,15 cm

MEA: Okrogle kolonije, izbočene z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacija intenzivna, v centru kolonij. Brez eksudata, reverz krem do temno krem ali rumen in naguban. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premer: 13,44 cm

YES: Velike, okrogle, bolj ali manj izbočene kolonije z valovitim robom. Bel micelij, spore bele ali zelene. Brez eksudata. Reverz belo-krem, rumeno-krem ali rjav, naguban.

Premer: 23,52 cm



Slika 9: *Penicillium nordicum* (sev EX-F 2792) na identifikacijskih gojiščih: a) CYA, b) YES, c) MEA in d) CREA po sedmih dneh inkubacije pri 25 °C v temi. Fotografirano z digitalnim fotoaparatom Camedia C-5050 200M, Olympus pri dnevni svetlobi z razdalje 20 cm.

Morfološki tip IV

Identifikacija: *Penicillium olsonii*

Število izolatov: 2

Vir izolacije: Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.

Opis:

CYA: Okrogle, nizke, koncentrične, rahlo nagubane in žametne kolonije z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Prisoten je bil brezbarven eksudat. Reverz bel in prosojen.

Premer: 28,71 cm

CREA: Slaba rast. Sevi niso tvorili kisline.

Premer: 13,57 cm

MEA: Okrogle, nizke, žametne, ploske kolonije z rahlo izbočeno sredico in ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz bel in prosojen. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premer: 23,12cm

YES: Velike, okrogle, žarkasto nagubane kolonije z nazobčanim robom. Sredina je bila vbočena. Bel micelij in modre spore. Dobra sporulacija, eksudat ni bil prisoten. Reverz rumen in naguban.

Premer: 38,64 cm

Morfološki tip V

Identifikacija: *Penicillium polonicum*

Število izolatov: 8

Vir izolacije: Izdelek št. 1, izdelek št. 2 in izdelek št. 3.

Opis:

CYA: Okrogle, žarkasto nagubane kolonije z izbočeno sredino in ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat je bil prisoten. Reverz belo-krem in naguban.

Premer: 28,53 cm

CREA: Dobra in tudi slabša rast. Sevi so dobro do zelo dobro tvorili kislino.

Okrogle kolonije z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten.

Premer: 15,53 cm

MEA: Okrogle, ploske, žametne kolonije z ravnim robom. Na robu so bile vidne rumene rastne hife, v sredini pa bel sekundarni micelij. Spore temne, zeleno-modre. Prisoten je bil brezbarven eksudat. Reverz rumeno-oranžen. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premer: 28,76 cm

YES: Velike, okrogle, puhaste, nagubane, izbočene kolonije z belim sekundarnim micelijem v sredini. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumeno-oranžen, intenzivnejši v centralnem delu kolonije in naguban.

Premier: 37,99 cm

Morfološki tip IV

Identifikacija: *Penicillium* sp. 1

Število izolatov: 30

Vir izolacije: Izdelek št. 1, izdelek št. 2, izdelek št. 3, zrak iz celice z izdelkom št.1 in zrak iz proizvodnje.

Opis:

CYA: Okrogle, žarkasto nagubane kolonije z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz belo-krem do rumen.

Premier: 25,39 cm

CREA: Slaba rast. Devetdeset odstotkov izolatov je tvorilo kislino, ostali je niso.

Premier: 13,07 cm

MEA: Okrogle, ploske, žametne kolonije rahlo izbočene na sredini. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz belo-krem in z intenzivno obarvano sredino rumeno-oranžne barve. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premier: 20,99 cm

YES: Manjše in večje, nagubane, puhaste kolonije z ravnim robom in izbočeno sredino. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumen in naguban.

Premier: 34,20 cm



Slika 10: *Penicillium* sp. 1 (sev EX-F 2793) na identifikacijskih gojiščih: a) CYA, b) YES, c) MEA in d) CREA po sedmih dneh inkubacije pri 25 °C v temi. Fotografirano z digitalnim fotoaparatom Camedia C-5050 200M, Olympus pri dnevni svetlobi z razdalje 20 cm.

Morfološki tip VII

Identifikacija: *Penicillium* sp. 2

Število izolatov: 2

Vir izolacije: Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.

Opis:

CYA: Majhne, okrogle, rahlo izbočene kolonije z valovitim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz krem, bolj rumen na sredini in naguban.

Premer: 18,44 cm

CREA: Slaba rast. Sevi so zelo dobro tvorili kislino (2x večja cona tvorbe kisline kot je velikost kolonij).

Premer: 10,22 cm

MEA: Okrogle, nizke, žametne kolonije z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz krem. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premer: 12,13 cm

YES: Okrogle, žarkasto nagubane kolonije z močno izbočeno sredino in nazobčanim robom. Bel micelij in modro-zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz rumeno-krem in naguban.

Premer: 26,15 cm



Slika 11: *Penicillium* sp. 2 (sev EX-F 2794) na identifikacijskih gojiščih: a) CYA, b) YES, c) MEA in d) CREA po sedmih dneh inkubacije pri 25 °C v temi. Fotografirano z digitalnim fotoaparatom Camedia C-5050 200M, Olympus pri dnevni svetlobi z razdalje 20 cm.

Morfološki tip VIII

Identifikacija: *Penicillium* sp. 3

Število izolatov: 2

Vir izolacije: Izdelek št. 1 in izdelek št. 2.

Opis:

CYA: Okrogle kolonije v sredini močno izbočene, z valovitim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz belo-krem.

Premer: 16,75 cm

CREA: Slaba rast. Sevi niso tvorili kisline.

Premer: 6,44 cm

MEA: Okrogle, žametne, malo nagubane in na sredini rahlo vzdignjene kolonije z ravnim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz belo-krem. Mikromorfološki parametri so predstavljeni v Preglednici 6.

Premer: 13,21 cm

YES: Okrogle, žarkaste, zelo nagubane kolonije z visoko vzdignjeno sredino in zelo nagubanim robom. Bel micelij in zelene spore. Sporulacijska cona je segala čez večji del kolonije. Eksudat ni bil prisoten. Reverz prosojen.

Premer: 27,32 cm

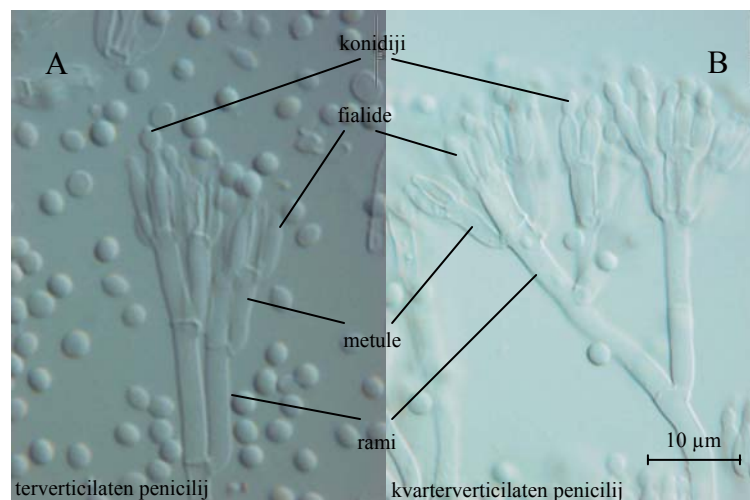


Slika 12: *Penicillium* sp. 3 (sev EX-F 2791) na identifikacijskih gojiščih: a) CYA, b) YES, c) MEA in d) CREA po sedmih dneh inkubacije pri 25 °C v temi. Fotografirano z digitalnim fotoaparatom Camedia C-5050 200M, Olympus pri dnevni svetlobi z razdalje 20 cm.

Izolate rodu *Penicillium* smo identificirali kot osem različnih vrst. En sam izolat smo identificirali kot *P. chrysogenum*, po dva pa smo identificirali kot *P. olsonii* in *Penicillium* sp. 2 in *Penicillium* sp. 3, ki smo ju tako označili, ker sta to najverjetneje za znanost novi vrsti. Osem izolatov smo identificirali kot vrsto *P. polonicum*, 28 kot *Penicillium* sp. 1, ki verjetno predstavlja za znanost novo vrsto ter 30 kot *P. nalgiovense*. Nenazadnje smo identificirali 191 izolatov kot vrsta *Penicillium nordicum*, za katero smo lahko z gotovostjo potrdili, da je dominantna vrsta.

Preglednica 6: Širine in dolžine taksonomsko pomembnih mikromorfoloških struktur izmerjenih pod fazno kontrastnim mikroskopom. Podana so povprečja (N=20) za posamezno skupino izolatov iz rodu *Penicillium*.

Morfološki tip - vrsta	konidiji dolžina (µm)	konidiji širina (µm)	fialide dolžina (µm)	fialide širina (µm)	metule dolžina (µm)	metule širina (µm)	rami dolžina (µm)	rami širina (µm)	verticilatnost
I - <i>P. chrysogenum</i>	3,24	2,86	8,78	2,60	10,32	2,92	16,36	3,42	bi-, ter- in kvarterverticilaten
II - <i>P. nalgiovense</i>	3,22	2,92	8,62	2,30	10,50	3,18	19,40	3,42	bi-, ter- in kvarterverticilaten
III - <i>P. nordicum</i>	3,21		8,65	2,77	12,22	3,12	16,94	3,34	terverticilaten
IV - <i>P. olsonii</i>	3,82	2,96	8,90	3,06	11,24	3,88	10,70	4,38	terverticilaten
V - <i>P. polonicum</i>	3,36	3,06	8,10	2,64	10,86	3,08	17,76	3,42	terverticilaten, občasno tudi bi- in kvarterverticilatni konidioforji s površinskih hif
VI - <i>P. sp. 1</i>	3,50	2,96	10,32	3,16	11,40	3,24	17,28	3,66	bi-, ter- in kvarterverticilaten
VII - <i>P. sp. 2</i>	3,42	2,64	8,64	3,20	11,40	3,72	17,38	3,80	terverticilaten
VIII - <i>P. sp. 3</i>	3,06	2,72	7,80	3,14	10,64	3,92	16,98	3,58	bi- in terverticilaten



Slika 13: Mikromorfološke strukture vrst iz rodu *Penicillium*. A) *Penicillium nordicum* (sev EX-F 2792) in B) *Penicillium polonicum* (sev EX-F 2875); 1000-kratna povečava. Fotografirano z digitalno kamero DP12, Olympus.

4.2.3 Analiza nukleotidnega zaporedja

Za potrditev identifikacije na nivoju morfologije smo med izolati opisanimi kot *Aspergillus versicolor*, *Eurotium herbariorum* ali *echinulatum* morfološki tip I (pri ostalih tipih smo imeli težave z izolacijo DNA), ter *Penicillium nordicum*, *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2 in *Penicillium* sp. 3 izbrali predstavnike za analizo nukleotidnega zaporedja.

Pri vrsti *Aspergillus versicolor*, vrstah iz rodu *Eurotium* in *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2 ter *Penicillium* sp. 3 smo pomnoževali in analizirali del nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2, pri vrsti *Penicillium nordicum*, ki spada v podrod *Penicillium* pa smo pomnoževali in analizirali del zaporedja gena za β -tubulin. Rezultati analize so navedeni v Preglednici 7, uporabljena nukleotidna zaporedja pa v Prilogi D in E.

Preglednica 7: Seznam izolatov vključenih v analizo nukleotidnega zaporedja in rezultati primerjave določenih zaporedij z zaporedji v bazi podatkov GeneBank centra NCBI.

Oznaka izolata	Rod	Vrsta	Dolžina analiziranega zaporedja DNA	% podobnosti z vrsto	E-vrednost *
EX-F2859	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	511 bp - ITS	100 <i>Aspergillus versicolor</i>	0
EX-F2906	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	508 bp - ITS	100 <i>Aspergillus versicolor</i>	0
EX-F3208	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i> ali <i>echinulatum</i> - TIP I	462 bp - ITS	99 <i>Eurotium herbariorum</i>	0
EX-F2792	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	536 bp - β -TUB	99 <i>Penicillium nordicum</i>	0
EX-F2792	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	536 bp - β -TUB	99 <i>Penicillium nordicum</i>	0
EX-F2956	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	419 bp - β -TUB	99 <i>Penicillium nordicum</i>	2e-119
EX-F3003	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	490 bp - β -TUB	100 <i>Penicillium nordicum</i>	2e-166
EX-F2937	<i>Penicillium</i>	sp. 1	527 bp - ITS	98 <i>Penicillium olsonii</i>	0
EX-F2940	<i>Penicillium</i>	sp. 1	532 bp - ITS	98 <i>Penicillium olsonii</i>	0
EX-F2950	<i>Penicillium</i>	sp. 1	539 bp - ITS	98 <i>Penicillium olsonii</i>	0
EX-F2796	<i>Penicillium</i>	sp. 2	518 bp - ITS	100 <i>Penicillium lanosum</i>	0
EX-F2791	<i>Penicillium</i>	sp. 3	528 bp - ITS	100 <i>Penicillium brevicompactum</i>	0

* E vrednost - pričakovana vrednost (ang. Expectation value) (verjetnost, da je ugotovljena stopnja podobnosti slučajna, kjer vrednost E=1 predstavlja naključno podobnost, vrednosti manjše od ena pa nakazujejo, da so zaporedja morebiti homologna).

4.2.4 Rezultati identifikacije izolatov izoliranih s površine sušenih mesnin

S treh vrst izdelkov smo v petih vzorčenjih po pet paralelk izolirali 399 gliv. Identificirali smo 44 kvasovk in 355 nitastih gliv, od katerih smo jih 19 uvrstili v rod *Aspergillus*, 55 v rod *Eurotium*, 17 v rod *Cladosporium* in 264 v rod *Penicillium*. Do vrste smo identificirali izolate rodov *Aspergillus*, *Eurotium* in *Penicillium*.

Z različnih izdelkov in v različnih fazah proizvodnje smo izolirali različne nitaste glive (Preglednice 8, 9 in 10).

Preglednica 8: Število identificiranih izolatov določene vrste / rodu z izdelka št. 1 (sušena mesnina v ovoju) glede na čas vzorčenja.

Izdelek št. 1 vrsta/rod izolata	Čas vzorčenja					Vsota
	10 dni	20 dni	30 dni	40 dni	52 dni	
<i>A. versicolor</i>				1	1	2
<i>Cladosporium</i> spp.	1	1				2
<i>Eurotium</i> spp.	4	4	6	5	8	27
<i>P. chrysogenum</i>				1		1
<i>P. nalgiovense</i>						0
<i>P. nordicum</i>	13	10	22	16	15	76
<i>P. olsonii</i>	1					1
<i>P. polonicum</i>				2		2
<i>Penicillium</i> sp.1	3	2	3	6	5	19
<i>Penicillium</i> sp.2	1					1
<i>Penicillium</i> sp. 3				1		1
Vsota	23	17	31	32	29	132

Preglednica 9: Število identificiranih izolatov določene vrste / rodu z izdelka št. 2 (dimljena sušena mesnina brez ovoja) glede na čas vzorčenja.

Izdelek št. 2 vrsta/rod izolata	Čas vzorčenja					Vsota
	začetek	10 dni	30 dni	52 dni	82 dni	
<i>A. versicolor</i>	6			5	6	17
<i>Cladosporium</i> spp.	14	1				15
<i>Eurotium</i> spp.	9	2	5	8	4	28
<i>P. chrysogenum</i>						0
<i>P. nalgiovense</i>						0
<i>P. nordicum</i>	12	10	14	13	19	68
<i>P. olsonii</i>			1			1
<i>P. polonicum</i>	4					4
<i>Penicillium</i> sp.1		3	1	3	1	8
<i>Penicillium</i> sp.2			1			1
<i>Penicillium</i> sp. 3					1	1
Vsota	45	16	22	29	31	143

Preglednica 10: Število identificiranih izolatov določene vrste / rodu z izdelka št. 3 (sušena klobasa v ovoju) glede na čas vzorčenja.

Izdelek št. 3 vrsta/rod izolata	Čas vzorčenja					Vsota
	3 dni	10 dni	21 dni	30 dni	42 dni	
<i>A. versicolor</i>						0
<i>Cladosporium</i> spp.						0
<i>Eurotium</i> spp.						0
<i>P. chrysogenum</i>						0
<i>P. nalgiovense</i>	4	7	7	7	5	30
<i>P. nordicum</i>		8	13	11	15	47
<i>P. olsonii</i>						0
<i>P. polonicum</i>	1				1	2
<i>Penicillium</i> sp.1					1	1
<i>Penicillium</i> sp.2						0
<i>Penicillium</i> sp. 3						0
Vsota	5	15	20	18	22	80

4.2.5 Pojavnost posameznih vrst iz rodu *Penicillium* v soli in zraku

Sol iz embalaže:

V 50 g soli iz embalaže sta bili prisotni 2 koloniji vrste *P. nalgiovense* in 12 kolonij vrste *P. nordicum*.

Sol iz proizvodnje:

V 50 g soli iz proizvodnje je prevladovala (neštevno) vrsta *P. nordicum*.

Zrak v celici z izdelkom št. 1:

Po 10 minutni izpostavitvi petrijevke zraku smo po inkubaciji in izolaciji čistih kultur 1 sev identificirali kot *P. nalgiovense*, 4 kot *P. nordicum* in 8 kot *Penicillium* sp. 1.

Zrak v proizvodnji:

Po 10 minutni izpostavitvi petrijevke zraku smo po inkubaciji in izolaciji čistih kultur 1 sev identificirali kot *Penicillium nalgiovense* in 7 kot *Penicillium* sp. 1.

4.3 ANALIZA PROFILA SEKUNDARNIH METABOLITOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO (HPLC)

Rezultati analize profila sekundarnih metabolitov za izbrane izolate najpogostejše vrste *P. nordicum* in za izbrane izolate rodu *Penicillium* treh skupin (sp. 1, sp. 2 in sp. 3), ki jih nismo uspeli uvrstiti med znane vrste, so prikazani v Preglednici 11.

Preglednica 11: Profili sekundarnih metabolitov izbranih izolatov določenih s HPLC metodo.

Oznaka izolata	Rod	Vrsta	Profil sekundarnih metabolitov
EX-F2792	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	verukolon, sklerotigenin, ohratoksin A
EX-F2795	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	verukolon, anacin, ohratoksin A
EX-F2790	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	verukolon, anacin, sklerotigenin, ohratoksin A
EX-F2789	<i>Penicillium</i>	sp. 1	asperfenamat, krizogin, ksantopocin
EX-F2793	<i>Penicillium</i>	sp. 1	asperfenamat, krizogin, ksantopocin
EX-F2797	<i>Penicillium</i>	sp. 1	asperfenamat, krizogin
EX-F2794	<i>Penicillium</i>	sp. 2	asperfenamat, krizogin
EX-F2796	<i>Penicillium</i>	sp. 2	asperfenamat, krizogin

4.4 ANALIZA POPULACIJE IZOLIRANIH SEVOV *Penicillium nordicum* Z METODO POLIMORFIZMA DOLŽIN POMNOŽENIH DELOV

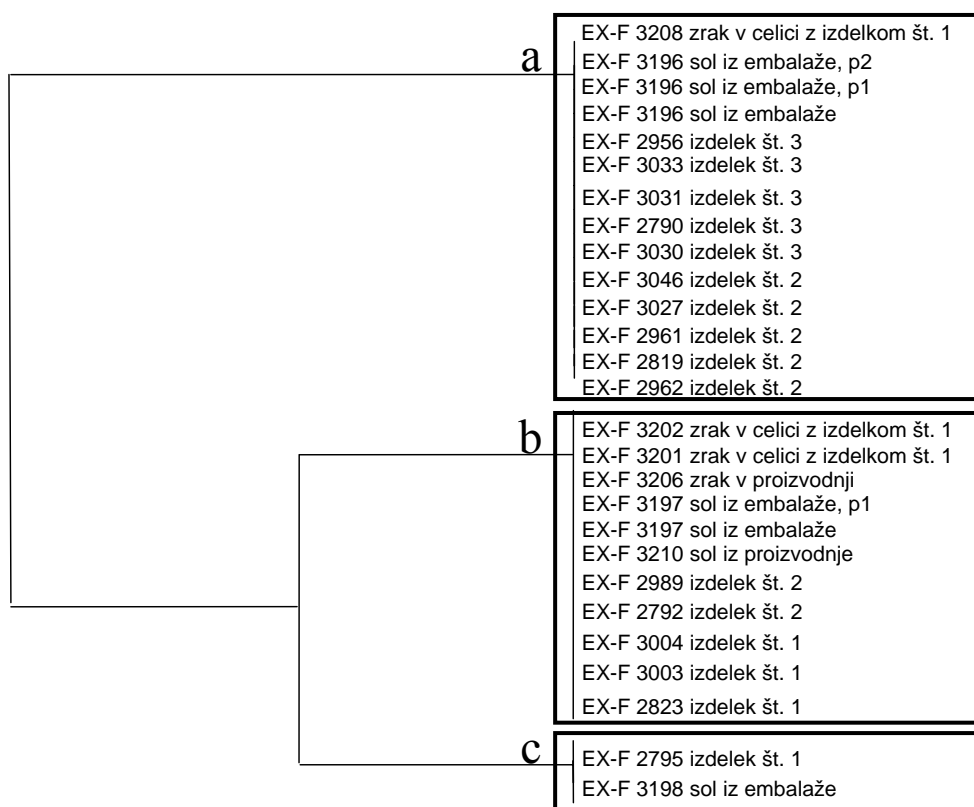
Vrsta, ki smo jo najpogosteje izolirali z vzorcev sušenih mesnin, je bila *P. nordicum*. Na podlagi polimorfizma dolžin pomnoženih delov (AFLP) smo analizirali populacijo sevov izoliranih iz mesnin, kot tudi sevov izoliranih iz zraka in soli.

Pri analizi elektroforegrama smo upoštevali pomnožene lise v razponu velikosti 50 do 650 baznih parov. Po večini smo za vsak sev določili 30 lis. Na podlagi elektroforegrama smo oblikovali matriko $n \times t$ (3.4.3.7) in s programom FreeTree izračunali matriko podobnosti, na podlagi katere smo oblikovali kladogram (Slika 14).

Sevi se združujejo v tri gruče, kar je razvidno na Sliki 14. V prvi večji gruči (gruča a) so sevi izolirani iz vseh treh izdelkov in sicer; dva seva izolirana z izdelka št. 1, trije sevi izolirani z izdelka št. 2 ter vsi sevi z izdelka št. 3 vključeni v analizo. V prvi gruči sta tudi

sev iz zraka v celici z izdelkom št. 1 ter sev iz soli iz embalaže, katerega analiza je bila 2x ponovljena.

V drugi večji gruči (gruča b) so trije sevi izolirani z izdelka št. 1 ter dva izolirana seva izolirana z izdelka št. 2. V drugi gruči so tudi sevi iz zraka v celici z izdelkom št. 1, sevi iz zraka v proizvodnji ter sev iz soli iz proizvodnje in sev izoliran iz soli iz embalaže v dveh ponovitvah.



Legenda: p1 ponovitev 1
p2 ponovitev 2

Slika 14: Kladogram narejen na podlagi matrike podobnosti profilov AFLP. S polno debelo črto so označene gruče a) prva gruča, b) druga gruča in c) tretja gruča, ki nam povejo kakšna je sorodnost med sevi znotraj populacije dominantne vrste *P. nordicum*.

V tretji gruči (gruča 3) sta le dva seva in sicer sev izoliran z vzorca št. 1 ter sev izoliran iz soli iz embalaže.

Sevi v posamezni gruči so imeli enake AFLP profile. Prva gruča sevov se je od druge gruče razlikovala v petih polimorfnihih znakih, od tretje pa v šestih polimorfnihih znakih. Druga in tretja gruča sta se med seboj razlikovali le v treh polimorfnihih znakih.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Tekom diplomskega dela smo potrdili vse hipoteze. Potrdili smo, da je vir okužbe z dominantno vrsto nitastih gliv kontaminirana osnovna surovina in sicer sol. Predpostavili smo tudi, da je vir kontaminacije prostor, kar smo tudi potrdili za naključne kontaminante. Potrdili smo tudi hipotezo, da bodo kontaminante predvsem različne psihrotolerantne, kserofilne, proteolitične in lipolitične vrste nitastih gliv iz rodov *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium*, ki smo jih uspeli osamiti z uporabo primernih osamitvenih metod. Vrste iz rodov *Alternaria*, *Aureobasidium* in *Scopulariopsis* nismo izolirali, smo pa izolirali vrsto *Aspergillus versicolor* in vrste iz rodu *Eurotium*, ki jih v hipotezah nismo navedli.

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo identificirali nitaste glive, ki smo jih izolirali s površine treh različnih sušenih mesnin. 338 izolatov smo identificirali do vrste in določili dominantno vrsto. Da bi določili izvor dominantne vrste smo vzorčili tudi sol in zrak in vse izolirane seve analizirali z genotipizacijsko metodo AFLP.

5.1.1 Mikrobiota sušenih mesnin

Tekom raziskovalnega dela smo izolirali 399 gliv s površin vzorčenih sušenih mesnin. Nitaste glive (355 izolatov) smo uvrstili v štiri rodove in sicer *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium* in *Penicillium*. Kvasovke (44 izolatov) smo izolirali predvsem z izdelka št. 2 in izdelka št. 3 ter nobene z izdelka št. 1.

Opazili smo razlike v številu izolatov izoliranih s površin raziskovanih mesnin, predvsem glede na lokacijo proizvodnje, ne pa tudi znatnih razlik glede na časovni potek proizvodnje (Preglednice 8, 9 in 10). Glede na to, da se mikrobioti izdelka št. 1 in izdelka št. 2 znatno ne razlikujeta in da sta izdelka proizvedena na isti lokaciji, lahko sklepamo, da izvor kontaminacije ni surovina sama, ampak bodisi prostor, zrak ali dodatki dodani med proizvodnim postopkom. Ker vemo, da sta proizvodna postopka izdelka št. 1 in št. 2

različna (str. 33) in kljub temu ni večjih razlik v sestavi mikrobiote lahko zopet potrdimo predhodno ugotovitev, da je izvor kontaminacije nekaj kar je skupno obema izdelkoma in poleg tega lahko ugotovimo, da temperatura, vlažnost zraka in dimljenje ne vplivajo na rast preiskovane mikrobiote.

Iz rezultatov je razvidno, da je mikobiota izdelka št. 3 manj raznolika kot mikobiota izdelkov št. 1 in št. 2 (Slika 7). To kaže na boljšo higiensko prakso oziroma manjšo kontaminiranost prostorov proizvodnje na lokaciji izdelka št. 3, saj smo že ugotovili, da sam postopek proizvodnje mesnin oz. surovine kritično ne vplivajo na mikobioto izdelkov. Pomembna razlika v sestavi mikrobiote izdelkov je ta, da smo le s površine izdelka št. 3 izolirali vrsto nitastih gliv *Penicillium nalgiovense* (str. 57). *Penicillium nalgiovense* je nitasta gliva, ki se v mesni industriji uporablja kot starterska kultura (Bem in Adamič, 1991) in lahko deluje kompetitivno in inhibitorno na druge mikroorganizme, kar je tudi možen razlog za manjšo pestrost mikrobiote izdelka št. 3. Proizvodnja izdelka št. 3 ne vključuje dodajanja starterske kulture, zato je prisotnost *P. nalgiovense* le naključje.

Vrste rodov *Aspergillus*, *Eurotium* in *Penicillium* so predstavljale več kot 95 % vseh izolatov s površine sušenih mesnin (str. 67). Izolate rodu *Cladosporium* smo izolirali le občasno. Vrste rodu *Cladosporium* so ubikvitarne (Samson in sod., 1995) ter se pojavljajo tako na stenah hladilnic kot tudi na mesnih izdelkih (Bem in Adamič, 1991), zato lahko sklepamo, da gre za kontaminante iz zraka oziroma prostorov, predvsem na proizvodni lokaciji izdelkov št. 1 in št. 2 (Slika 7).

Aspergillus versicolor je bila edina izolirana vrsta tega rodu. Izolirali smo jo le redko z izdelkov št. 1 in št. 2 in sicer v enaki frekvenci kot izolate rodu *Cladosporium* (Preglednici 8 in 9), vendar za razliko od teh, ki smo jih izolirali tekom prvih dveh vzorčenj, smo *A. versicolor* izolirali predvsem tekom zadnjih dveh vzorčenj. V nasprotju z dognanji Cantoni in sod. (1977) in Dragoni in sod. (1980 a,b), ki so vrste rodu *Aspergillus* določili za dominantne nitaste glive sušenih mesnin, lahko iz rezultatov naše raziskave zaključimo, da je bila nitasta gliva *A. versicolor* le naključna kontaminanta iz okolja. Comi in sod. (2004) so iz istrskih mesnin, tako kot v tem diplomskem delu, izolirali le nekaj izolatov rodu *Aspergillus*, nobeden od teh pa ni bil določen kot vrsta *A. versicolor*. Vrsta *A. versicolor* je

splošno razširjena v zaprtih prostorih in ker proizvajajo toksične mikotoksine (Samson in sod., 1995) je posledično nevarna za zdravje ljudi.

Z izdelkov št. 1 in št. 2 smo v vseh fazah proizvodnje izolirali tudi vrste iz rodu *Eurotium* (Preglednici 8 in 9). Izolate iz rodu *Eurotium* smo glede na morfologijo po večini identificirali kot *E. herbariorum* ali *E. echinulatum* (41), osem smo jih identificirali kot *E. repens*, tri seve kot *E. amstelodami*, dva kot *E. repens* ali *E. rubrum* in le enega kot *E. rubrum* (Preglednica 5). Po analizi nukleotidnega zaporedja smo 12 izolatov morfološkega tipa I identificirali kot *E. herbariorum*. Frekvenca teh izolatov pa je v primerjavi s frekvenco izolatov iz rodu *Penicillium* zanemarljiva, kar je v nasprotju s študijami Comi in sod. (2004). Pri raziskovanju mikrobiote istrskih mesnin je bila vrsta *E. repens* edina izolirana vrsta tega rodu in hkrati dominantna vrsta v vseh preiskovanih mesninah, kar so pripisali visoki odpornosti spor te vrste na izsuševanje tako zraka kot mesnin samih. Comi in sod. (2004) so tudi predpostavili, da so vzrok za dominanco te vrste verjetno nekontrolirana temperatura in relativna vlažnost, saj so mesnine sušili na burji, vetru, ki izsuši površino mesnin do te stopnje, da favorizira rast vrst iz rodu *Eurotium*. V primeru naše raziskave, pa so bili vzorci sušeni v klimatsko kontroliranih prostorih, kar je najverjetneje razlog, da rod *Eurotium* ni prevladujoč.

Izolate uvrščene v rod *Penicillium* smo identificirali kot *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. olsonii*, *P. polonicum* in kot *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2 in *Penicillium* sp. 3 (str. 57). Morfologija vrst *Penicillium* sp. 1, sp. 2 in sp. 3 se ni ujemala z nobeno od že opisanih vrst, prav tako tudi profil sekundarnih metabolitov. Analiza nukleotidnega zaporedja (Preglednica 7) je sicer pokazala visoko ujemanje z nekaterimi že poznanimi vrstami, vendar smo na podlagi morfologije in profila sekundarnih metabolitov identifikacijo ovrgli in sklepali, da so te vrste najverjetneje nove za znanost. V raziskavah Leistner in Ayres (1968), Bullerman in sod. (1969), Hadlock in sod. (1976), Dragoni in Cantoni (1979), Dragoni in sod. (1980 a,b), Rojas in sod. (1991), Spotti in sod. (1989) in Nunez in sod. (1996) so bile vrste iz rodu *Penicillium* kot tudi *Aspergillus* izolirane v večjih frekvencah. Nunez in sod. (1996) so poročali, da pri a_w vrednosti sušenih mesnin do 0,90, prevladujejo vrste iz rodu *Penicillium*. Spotti in sod. (1989) so ugotovili, da lahko v primeru, da sušene mesnine zorijo pri visoki relativni vlažnosti, prevladujoča vrsta postane

P. verrucosum. Kasneje so Larsen in sod. (2001) ugotovili, da so vsi izolati iz mesnih izdelkov in sira pravzaprav pripadniki vrste *P. nordicum* in ne vrste *P. verrucosum*, kot so sprva mislili. V naši raziskavi smo prišli do podobnih ugotovitev kot Spotti in sod. (1989). Iz rezultatov tega diplomskega dela je namreč razvidno, da smo z vseh treh izdelkov najpogosteje izolirali ravno vrsto *P. nordicum* (Preglednice 8, 9 in 10). Izolati te vrste so za izdelek št.1 in 2 predstavljali več kot polovico vseh izolatov in več kot tri četrtine vseh izolatov iz rodu *Penicillium*, z izdelka št. 3 pa smo podobno pogosto kot vrsto *P. nordicum* izolirali tudi vrsto *P. nalgiovense*. Ostale vrste iz rodu *Penicillium* smo izolirali le redko, z izjemo vrste *Penicillium* sp. 1, ki smo jo z izdelka št. 1 izolirali tekom vseh vzorčenj, z izdelka št. 2 pa tekom vseh razen začetnih vzorčenj (Preglednice 8, 9 in 10). Rast vrst rodu *Penicillium* po mnenju Northolt in Bullerman (1982) in Spotti in sod. (1988), z izjemo *P. nalgiovense*, na sušenih mesninah ni zaželjena, saj lahko negativno vpliva na aromo izdelkov, poleg tega pa mnoge vrste proizvajajo toksične metabolite.

Comi in sod. (2004) so izolirali predvsem kserofilne vrste, ki prevladujejo v živilih z nizko vrednostjo a_w in pri nizki relativni vlažnosti, lahko pa rastejo tudi na mesnih izdelkih, ki so izpostavljeni visoki relativni vlažnosti, kar velja tudi za izdelke vključene v to diplomsko delo.

5.1.2 Dominantna vrsta *Penicillium nordicum*

Vrsto *P. nordicum* sta prva opisala Dragoni in Cantoni leta 1979, leta 1985 pa jo je uradno poimenoval Ramírez (Larsen in sod., 2001). Larsen in sod. (2001) so dokazali, da so nekateri sevi določeni kot vrsta *P. verrucosum* v resnici pripadniki vrste *P. nordicum*. Izolate obeh vrst so ločili glede na profil sekundarnih metabolitov in ugotovili, da se vrsti *P. verrucosum* in *P. nordicum* pojavljata v različnih ekoloških nišah. Vrsta *P. verrucosum* se pojavlja v rastlinkem materialu, vrsta *P. nordicum* pa v živilih bogatih z beljakovinami kot so sir in mesni izdelki.

Pri analizi sekundarnih metabolitov so Larsen in sod. (2001) ugotovili, da poleg ohratoksina A in verukolona, ki sta skupna obema vrstama, vrsta *P. verrucosum* proizvaja še ohratoksin B, verucine in citrinin, nikoli pa ne proizvaja anacina in sklerotigenina, ki sta

tipična za seve vrste *P. nordicum*. Nekateri sevi vrste *P. nordicum*, ne pa tudi vrste *P. verrucosum*, proizvajajo lumpidin. Sevi vrste *P. nordicum*, ki proizvajajo lumpidin, hkrati proizvajajo manj ohratoksina A, podobno kot vrsta *P. verrucosum*. To so Larsen in sod. (2001) razložili z biosintetsko potjo proizvodnje metabolitov verucina in lumpidina. Kot je razvidno iz rezultatov analize profila sekundarnih metabolitov (Poglavje 4.3), so vsi trije kemotaksonomsko analizirani sevi vrste *P. nordicum* izolirani tekom diplomskega dela poleg verukolona in ohratoksina A proizvajali bodisi anacin, bodisi skletotigenin ali oba metabolita. Larsen in sod. (2001) so opazili tudi, da sevi vrste *P. nordicum* proizvajajo veliko več ohratoksina A kot sevi vrste *P. verrucosum*. Bogs in sod. (2006) pa so v svojem delu potrdili, da so vsi sevi vrste *P. nordicum* sposobni proizvajati ohratoksin A, kar po njihovem pomeni, da je varnost živil kontaminiranih s to vrsto zelo vprašljiva.

Bogs in sod. (2006) so analizirali mikrobioto sušenih mesnin različnih proizvodenj in ugotovili, da je prevladujoča vrsta sicer *P. nalgiovense*, vendar je bila druga najpogostejša vrsta *P. nordicum*, ki producira ohratoksin A. Ker so večino sevov vrste *P. nordicum* izolirali iz zraka in ne z mesnin samih in ker je vrsta *P. nalgiovense*, podobno kot vrsta *P. nordicum*, prilagojena na okolja bogata z beljakovinami, so sklepali, da ima v takšnem okolju vrsta *P. nalgiovense* kompeticijsko prednost pred vrsto *P. nordicum* in je lahko vodilo za varnejšo pripravo živil. Tudi v tem diplomskem delu smo analizirali zrak v proizvodnji in v zorilnih celicah, vendar v našem primeru, v nasprotju z ugotovitvami Bogs in sod. (2006), *P. nordicum* v vzorcih zraka ni bila prevladujoča vrsta. To pa ne izključuje možnosti, da bi vrsta *P. nalgiovense* uporabljena kot starterska kultura prerasla oz. onemogočila rast vrste *P. nordicum*. To smo opazili na primeru izdelka št. 3, kjer je bila frekvenca vrste *P. nordicum* za približno 30 % nižja kot pri izdelku št. 1 in št. 2, kjer *P. nalgiovense* ni prisoten (Preglednice 8, 9 in 10).

Vrsto *P. nordicum*, kot tudi vrste *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense*, *P. olsonii* in *P. polonicum* (Gunde-Cimerman in sod., 2003; Sonjak in sod., 2006), so bile izolirane tudi iz arktičnih habitatov, kot so morska voda, morski led in ledeniki, za katere so značilne nizke temperature in nizka oz. znižana vodna aktivnost. Vrste iz rodu *Penicillium* so kozmopolitske, psihrotolerantne in kot lahko razberemo iz dejstva, da lahko preživijo v najbolj ekstremnih okoljih, tudi zelo trdožive. Zaradi dejstva, da je bila vrsta *P. nordicum*

prevladujoča v arktičnem morskem ledu (Gunde-Cimerman, 2006. osebni vir) in da poteka pridelava sušenih mesnin pri nizkih temperaturah, smo predpostavili, da bi vir kontaminacije izdelkov z vrsto *P. nordicum* lahko bila sol. Sol smo analizirali in kot je razvidno iz rezultatov, smo hipotezo potrdili, saj smo iz soli iz izvorno zaprte in nepoškodovane embalaže, ki se uporablja v postopku pridelave sušenih mesnin, izolirali vrsto *P. nordicum*, ki je v soli tudi prevladovala (str. 69).

5.1.3 Genotipizacija izolatov vrste *Penicillium nordicum*

Seve vrste *P. nordicum* izolirane z vseh treh analiziranih sušenih mesnin, zraka in soli smo analizirali z genotipizacijsko metodo, da bi ugotovili, kakšna je sorodnost med sevi oz. kakšna je stopnja polimorfizma znotraj populacije izoliranih sevov. Uporabili smo metodo določanja polimorfizmov dolžin pomnoženih zaporedij (AFLP) in znotraj te kombinacijo restriktijskih endonukleaz in oligonukleotidnih začetnikov, za katero so Sonjak in sod. (2007) pokazali, da omogoča dovolj visoko razlikovanje med sevi vrste *Penicillium crustosum*, da jih lahko do neke mere loči tudi glede na geografski izvor.

Pri analizi elektroforegrama AFLP smo upoštevali pomnožene lise v razponu velikosti 50 do 650 baznih parov. Na osnovi profilov AFLP odsekov smo izrisali kladogram v katerem so se sevi združili v tri gruče (Slika 14). V prvo večjo gručo so se združili sevi izolirani z izdelka št. 1 in 2 in vsi sevi izolirani z izdelka št. 3, sev izoliran iz zraka iz celice z izdelkom št. 1 in sev iz soli iz embalaže. V drugo gručo sevi izolirani z izdelka št. 1 in 2, sevi iz zraka iz celice z izdelkom št. 1, sevi iz zraka iz proizvodnje, sev iz soli iz proizvodnje in sev iz soli iz embalaže. V tretjo gručo le sev z izdelka št. 1 in sev izoliran iz soli iz embalaže.

Glede na to, da so se v isto AFLP gručo združili tako sevi izolirani z mesnin kot tudi sevi iz zraka in soli iz embalaže, znotraj gruče pa so imeli sevi enak AFLP profil, lahko zaključimo, da sevi izolirani s površin mesnin in iz zraka izvirajo iz soli. Ob predpostavki, da identični AFLP profili odsevajo skupni klonski izvor pa lahko zaključimo, da so bili v izvorni soli prisotni vsaj trije kloni. Glede na topologijo kladograma (Slika 14) lahko predpostavimo, da je izvorni klon prve gruče matični iz katerega sta nastala izvorni klon

druge in tretje gruče. Sol je bila vzorčena na proizvodni lokaciji izdelkov št. 1 in št. 2, vendar pa so imeli sevi izolirani z izdelka št. 3 iz druge lokacije proizvodnje enak profil AFLP kot izolati z izdelkov št. 1 in št. 2, zraka in soli v AFLP gruči 1. To lahko pripišemo dejstvu, da imajo na obeh proizvodnih lokacijah istega dobavitelja soli. To, da so v prvi AFLP gruči izolati z vseh izdelkov in torej z obeh proizvodnih lokacij, še dodatno potrjuje, da je izvorni klon prve gruče matični klon (Slika 14).

Dejstvo, da je več različnih klonov prisotnih le v soli na proizvodni lokaciji izdelkov št. 1 in št. 2, lahko pripišemo zunanjim dejavnikom, kot so klima (temperatura in vlažnost okolja) in načinu skladiščenja soli na eni in na drugi lokaciji. Fizikalno-kemijski stres, kot naprimer pomankanje hranil, nizke temperature ali visok zračni tlak vplivajo na genetsko diverziteto (Sonjak in sod., 2007). Ekstremno okolje selekcionira mikroorganizme v tiste, ki preživijo na račun specifičnih prilagoditev na okolje. Tak primer je npr. vrsta *Penicillium crustosum* izolirana na Arktiki, ki ni sposobna razgradnje kreatina (Sonjak in sod., 2007). Sol je ekstremno okolje in tudi sušene mesnine, ki so soljene ali razsoljevane in shranjene pri nizkih temperaturah prištevamo k ekstremnim okoljem, zato lahko pričakujemo, da v takšnem okolju preživi manjše število klonov, ki pa so dobro prilagojeni. Od izvornih sevov iz naravnega okolja, pa se bodo morda s časom razlikovali tudi v fenotipskih lastnostih.

Do danes je bilo razvitih veliko molekularnih metod za analize genetske diverzitete, kot so naključno pomnoževanje polimorfne DNA (RAPD), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), enoveržni konformacijski polimorfizem (SSCP), mini/mikrosatelitna DNA, AFLP ter druge (Scott in Straus, 2000). Med temi tehnikami je AFLP široko uporabljena zaradi robustnosti, ponovljivosti in diskriminatorne moči (Vos in sod., 1995).

Uporabnost te metode smo potrdili tudi v naši raziskavi. Za določene seve smo ponovili celoten postopek, vključno z izolacijo DNA in vedno smo dobili identični AFLP profil, ter tako potrdili ponovljivost metode (Slika 14).

Da bi potrdili ali natančneje razkrili diverziteto znotraj populacije dominantne vrste *P. nordicum* na genetskem nivoju, bi morali poleg uporabljene AFLP kombinacije

restrikcijских encimov in oligonukleotidnih začetnikov, uporabiti tudi več drugih oz. uporabiti različne metode prstnih odtisov.

5.1.4 Analiza tveganja in hipotetični ukrepi

Mikobiota ima pomemben vpliv na kakovost proizvodov v prehrabeni industriji. Če poznamo lastnosti vrst, ki kvarijo živila, lahko prilagodimo higienski nadzor med proizvodnjo in preprečimo širjenje kontaminacije oziroma preprečimo samo kontaminacijo (Filtenborg in sod., 1996; Samson in sod., 1995).

Mikotoksini imajo v prehranjevalni verigi velik ekonomski vpliv, najpomembnejši pa je vpliv na zdravje ljudi (Bryden, 2007). Mikotoksini predstavljajo globalno grožnjo za varno prehrano, zato bi bilo potrebno razviti učinkovit program nadzora "od polja do potrošnikove mize". Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (HACCP) bi morala biti podkrepljena z znanjem o mikotoksinih, potrebno pa bi bilo razviti enostavne in specifične metode za detekcijo in nadzor kritičnih kontrolnih točk (Bryden, 2007; Richard, 2007; Samson in sod., 1995).

Do danes je bilo odkritih že več sto mikotoksinov (Samson in sod., 1995), vendar pa še veliko sekundarnih metabolitov gliv sploh ni bilo testiranih za toksičnost ali bilo povezanih z izbruhi bolezni (Bryden, 2007). Kontaminacijo živil z nitastimi glivami in njihovimi toksini lahko preprečimo le, če dejansko poznamo mikobioto nekega proizvoda (Filtenborg in sod., 1996; Samson in sod., 1995). V našem primeru smo ugotovili, da je vrsta *P. nordicum* prevladujoča nitasta gliva na vzorčenih sušenih mesninah in da proizvaja ohratoksin A, ki je zdravju ljudi nevaren (str. 58 in Preglednica 11). Vendar pa prisotnost ali rast gliv ni vedno pogoj za proizvodnjo toksinov; proizvodnja le teh je odvisna predvsem od ekoloških in procesnih parametrov proizvodnje (Samson in sod., 1995; Filtenborg in sod., 1996).

Prisotnost in koncentracijo ohratoksina A v mesninah bi lahko dokazali z različnimi metodami. Toscani in sod. (2007) so razvili HPLC kvantitativno metodo, s katero lahko zaznamo koncentracije nižje od 1 µg/kg mesnine, kar je trenutna dovoljena koncentracija

ohratoksina A v mesninah v Italiji. Obstajajo tudi druge metode, ki temeljijo na kvantitativni esterifikaciji karboksilne skupine ohratoksina A, encimska konverzija OTA v α -ohratoksin (OT α) in druge (Toscani in sod., 2007).

Tekom raziskovalnega dela smo ugotovili, da je izvor dominantne vrste *P. nordicum* soli, ki je bila uporabljena v proizvodnji izbranih sušenih mesnin (str. 77). Da bi kontaminacijo omejili bi bilo potrebno zamenjati dobavitelja soli. Tekom raziskovalnega dela smo preverili tudi prisotnost vrste *P. nordicum* v soli drugih proizvajalcev in ugotovili, da v ostalih preiskovanih vzorcih *P. nordicum* ni bil prisoten. Izključitev kontaminirane soli iz proizvodnje sama po sebi ne bi bila dovolj, da bi preprečili nadaljno prisotnost vrste *P. nordicum* na sušenih mesninah, saj se je kontaminacija razširila po opremi in zraku prostorov proizvodnje. Da bi kontaminacijo omejili bi bilo potrebno prostore razkužiti ter primerno urediti prezračevanje.

Veliko proizvajalcev mesnih izdelkov se še vedno zanaša na oskrbo inokuluma iz hišne mikrobne združbe, ki pa lahko povzroči nevšečnosti, kot je proizvodnja mikotoksinov, zato se takšni nekontrolirani postopki vedno bolj opuščajo. Z razvojem je raziskovalcem uspelo določiti mikroorganizme odgovorne za določene procese, tako je danes jasno, da za nekatere fermentirane proizvode potrebujemo monokulture in za nekatere multi kulture. V zadnjem času se na tržišču pojavlja vse več podobnih komercialno dostopnih starterskih kultur, zato se je potrebno odločiti, katera bo prava za naš izdelek in našo tehnologijo. Pogosto pa specifikacije proizvajalcev starterskih kultur niso dovolj in je potrebno izvesti dodatne analize (Raspor, 2003).

Vrsta *P. nalgiovense* se uporablja kot komercialna starterska kultura (Raspor, 2003). Iz rezultatov tega diplomskega dela je razvidno, da smo imeli v primeru izdelka št. 3, s katerega smo z veliko frekvenco izolirali vrsto *P. nalgiovense*, veliko manj pestro in posledično, z vidika prisotnosti mikotoksinogenih nitastih gliv, manj problematično mikobioto, kot pri izdelkih št. 1 in 2 (Slika 7 in Preglednice 8, 9 in 10). Kot so omenili že Bogs in sod. (2006) bi z uporabo starterske kulture lahko močno zmanjšali tveganje za dominanco vrste *P. nordicum*.

Mikotoksine lahko iz živil odstranimo z uporabo kemijskih in fizikalnih metod, obstajajo pa tudi biološke. Fuchs in sod. (2008) so izvedli raziskavo v kateri so dokazali sposobnost mlečnokislinskih bakterij, da razstrupljajo mikotoksina ohratoksin A in patulin. Sevi vrst *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium animalis* so bili najbolj učinkoviti in bi jih lahko uporabili za razstrupljanje že kontaminiranih proizvodov z ohratoksinom A in patulinom.

5.2 SKLEPI

Glede na hipoteze o izvoru in vrsti gliv prisotnih na površini sušenih mesnin, ki smo jih postavili v uvodu, smo prišli do naslednjih sklepov:

- Z uporabo ustreznih tehnik izolacije in identifikacije smo uspeli karakterizirati mikrobioto površin treh izbranih sušenih mesnin.

- Tekom vzorčenja smo izolirali 399 gliv, ki so bile v glavnem kserofilne vrste nitastih gliv iz rodov *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium* in *Penicillium*. Najpogosteje smo izolirali kserofilne in psihrotolerantne vrste iz rodu *Penicillium*. Identificirali smo 19 izolatov nitastih gliv kot vrsto *Aspergillus versicolor*, 17 kot vrste iz rodu *Cladosporium*, 55 kot vrste iz rodu *Eurotium* in 264 kot osem vrst iz rodu *Penicillium*. *Penicillium* sp. 1, 2 in 3 so za znanost verjetno nove vrste. Izolirali smo tudi 44 kvasovk.

- Izolate iz rodu *Aspergillus* in *Cladosporium* smo izolirali le na proizvodni lokaciji izdelka št. 1 in 2. Izolate *P. nalgiovense* smo izolirali le na proizvodni lokaciji izdelka št. 3, kjer je bila mikrobiota tudi manj raznolika. Tekom vzorčenja se frekvenca pojavnosti posameznih vrst ni bistveno spreminjala in postopek proizvodnje na mikrobioto ni bistveno vplival.

- Prevladovala je vrsta *P. nordicum*, ki se je pojavljala na vseh treh proizvodih ves čas vzorčenja, izolirali smo jo tudi iz zraka in soli. Predstavljala je približno polovico vseh izolatov s površin sušenih mesnin. Za vse analizirane seve smo dokazali, da proizvajajo ohratoksin A. AFLP analiza je pokazala, da je stopnja genetske diverzitete med izoliranimi sevi zelo nizka.

- S pomočjo AFLP metode smo ugotovili, da je bila sol osnovni vir kontaminacije mesnin z vrsto *P. nordicum*.

6 POVZETEK

V mesni industriji se fermentacija mesa uporablja kot eden izmed načinov pridobivanja visoko hranljivih z beljakovinami bogatih končnih izdelkov, ki imajo daljšo obstojnost. Fermentacija poteka s pomočjo aktivnosti mikroorganizmov. Na določenih sušenih mesninah se pogosto pojavljajo tudi nitaste glive, ki so lahko škodljive ali koristne. Proizvajajo lahko toksične metabolite, so ubikvitarne in lahko kontaminirajo sušene mesnine. Po navedbah iz literature so najpogostejše nitaste glive v zraku zunanjih in notranjih prostorov predvsem različne vrste iz rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, in *Scopulariopsis*. Kontaminacija se lahko pojavi v različnih stopnjah proizvodnje, vendar se rast gliv pojavi le ob ugodnih pogojih, ki določajo prevladujoče vrste. Nizka vodna aktivnost, nizka temperatura, substrat bogat s proteini in lipidi so glavne lastnosti sušenih mesnin, zato jih lahko naseljujejo predvsem psihrotolerantne in kserofilne glive. Vzorčili smo tri različne sušene mesnine na dveh različnih lokacijah. Za izolacijo gliv s površin sušenih mesnin, iz soli uporabljene v proizvodnji sušenih mesnin in iz zraka smo uporabili gojišči MEA in MEA s 5 % NaCl s kloramfenikolom. Identifikacijo izolatov smo izvedli na gojiščih CYA, YES, CREA, MEA, DG-18, CY20S in CY40S, glede na rodno pripadnost vrst in sicer na morfološkem, kemotaksonomskem in molekularno genetskem nivoju. Izolirali smo predvsem kserofilne in psihrotolerantne vrste nitastih gliv, in sicer vrste iz rodov *Aspergillus*, *Eurotium*, *Cladosporium* in *Penicillium*, ki je prevladoval. S površin sušenih mesnin smo izolirali 399 gliv, od tega smo jih 19 identificirali kot vrsto *Aspergillus versicolor*, 17 kot vrste iz rodu *Cladosporium*, 55 kot vrste iz rodu *Eurotium* ter 264 kot osem vrst iz rodu *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. olsonii*, *P. polonicum* in *Penicillium* sp. 1, 2 in 3, ki so za znanost verjetno nove vrste). Izolirali smo tudi 44 kvasovk. Dominantna nitasta gliva je bila vrste *P. nordicum*, ki je prevladovala na vseh treh proizvodih ves čas vzorčenja in je predstavljala približno polovico vseh izolatov s površin sušenih mesnin, izolirali pa smo jo tudi iz zraka in soli. AFLP analiza je pokazala, da je stopnja genetske diverzitete med izoliranimi sevi vrste *P. nordicum* zelo nizka in da je sol vir kontaminacij mesnin. Opravili smo tudi HPLC analizo profila sekundarnih metabolitov dominantne vrste in ugotovili, da poleg verukolona, sklerotigenina in anacina proizvaja tudi zdravju škodljiv mikotoksin ohratoksin A.

7 VIRI

- Abouzied M.M., Horvath A.D., Podlesny P.M., Regina N.P., Metodiev V.D., Kamenova-Tozeva R.M., Niagolova N.D., Stein A.D., Petropoulos E.A., Ganev S. 2002. Ochratoxin A concentration in food and feed from a region with Balkan endemic nephropathy. *Food Additives and Contaminants*, 19, 8: 755-764
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402
- Andersen S.J., Frisvad J.C. 1994. Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 486-488
- Baldini P., Raczynski R. 1979. The prosciutto (raw ham) of Parma and San Daniele: changes in physico-chemical properties and microbial populations. V: *Food microbiology and technology. International meeting on food microbiology and technology held at Tabiano Bagni, Italy on April 20-23.* Jarvis B., Christian J.H.B., Michener H.D. (eds.). Parma, Medicina-Viva-Servizio-Congressi-Srl.: 107-111
- Bem Z., Adamič J. 1991. *Mikrobiologija mesa in mesnih izdelkov.* Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 248 str.
- Blakeslee A.F. 1915. Lindner's roll tube method of separation cultures. *Phytopathology*, 5: 68-69
- Bogs C., Battilani P., Geisen R. 2006. Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 39-47
- Bryden W.L. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16: 95-101
- Bullerman L.B., Hartman P.A., Hayres J.C. 1969. Aflatoxin production in meats: II. Aged dry salamis and aged country cured hams. *Applied Microbiology*, 18: 718-722
- Butinar L., Zalar P., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2005. The genus *Eurotium* - members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 155-166
- Campbell-Platt G. 1987. *Fermented foods of the world. A dictionary and guide.* London, Butterworths: 291 str. Cit. po: Raspor P. 2003. *Starterske kulture. V: Mikrobiologija*

živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 171-206

Cantoni C., D'Aubert S., Cattaneo P. 1977. Le muffe e gli alimenti carnei. *Industrie Alimentari*, 16, 10: 89-92

Christensen C.M., Fanse H.A., Nelson G.H., Bates F., Mirocha C.J. 1967. Microflora of black and red pepper. *Applied Microbiology*, 15: 622-628

Comi G., Cantoni C. 1983. Presenza dei lieviti nei prosciutti crudi stagionati. *Industrie Alimentari*, 22, 202: 102-104

Comi G., Orlic S., Redzepovic S., Urso R., Iacumin L. 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 29-34

Dragoni I., Cantoni C. 1979. Le muffe negli insaccati crudi stagionati. *Industrie Alimentari*, 18, 160: 281-285

Dragoni I., Marino C., Cantoni C. 1980a. Muffe in prodotti carnei salati e stagionati (bresaole e prosciutti crudi). *Industrie Alimentari*, 19, 172: 405-407

Dragoni I., Ravenna R., Marino C. 1980b. Descrizione delle specie di *Aspergillus* isolate dalla superficie di prosciutti stagionati di Parma e San Daniele. *Archivio Veterinario Italiano*, 31: 1-56.

Filtenborg O., Frisvad J.C., Svendsen J.A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 581-585

Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U. 1990. The significance of yeast extract composition on metabolite production in *Penicillium*. V: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.). New York, USA, Plenum Press: 433-440

Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85-102

Fink-Gremmels J., Leistner L. 1990. Toxicological evaluation of moulds. *Food Biotechnology*, 4: 579-584

Frisvad J.C. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicillia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 568-579

Frisvad J.C. 1985. Creatine - sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 109-113

- Frisvad J.C. 1987. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography*, 392: 333-347
- Frisvad J.C. 1993. Modifications on media based on creatine for use in *Penicillium* and *Aspergillus* taxonomy. *Letters in Applied Microbiology*, 16: 154-157
- Frisvad J.C. 2006. "The key for the identification of species of the genera *Eurotium*". Lyngby, Technical University of Denmark, Department of Systems Biology (personal communication, september 2006)
- Frisvad J.C., Filtenborg O. 1983. Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 1301-1310
- Frisvad J.C., Filtenborg O. 1989. Terverticillate *Penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81: 837-861
- Frisvad J.C., Thrane U. 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-Vis spectra (diode-array detection). *Journal of Chromatography*, 404: 195-214
- Frisvad J.C., Thrane U. 1993. Liquid column chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography Library*, 54: 253-372
- Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 4: 1398-1407
- Fung D.Y.C. 1992. Food fermentation. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol. 2. Hui Y.H. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 1034-1041
- Gams W., Christensen M., Onions A.H., Pitt J.I., Samson R.A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. V: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Pitt J.I., Samson R.A. (eds.). New York, Plenum Press: 55-62
- Garbutt J. 1997. *Essentials of food microbiology*. London, Sydney, Auckland, Arnold: 251 str.
- Gareis M., Scheuer R. 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51: 102-103
- Gerrits van den Ende A.H.G, de Hoog G.S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 43: 151-162

- Glass N.L., Donaldson G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4: 1323-1330
- Gunde-Cimerman N. 2006. "Prevladujoča vrsta *P. nordicum* v arktičnem morskem ledu". Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za biologijo mikroorganizmov (osebni vir, november 2006)
- Gunde-Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvad J.C., Diderichsen B., Plemenitaš A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28, 28-39: 1273-1278
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. 2000. Hipersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240
- Hadlock R., Samson R., Stolk A., Schipper M. 1976. Mould contamination of meat products. *Fleischwirtschaft*, 56: 322-327
- Hocking A.D., Pitt J.I. 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 488-492
- IARC - International Agency of Research on Cancer. 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans: Vol. 56. Lyon, WHO: 612 str.
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specification for Foods. 1998. Microorganisms in foods. Volume 6: Microbial ecology of food commodities. New York, Blackie Academic & Professional: 615 str.
- Jay J.M. 1992. Modern food microbiology. 2nded. New York, London, New York & Hall: 701 str.
- Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A. 2005. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 207-214
- Krogh P., Rodricks J.V., Hesseltine C.W., Mehlman M.A. 1977. Mycotoxins in human and animal health. Park Forest South, Illinois, Pathotox Publishers: 489-498
- Laich F., Fierro F., Cardoza R.E., Martin J.F. 1999. Organization of the gene cluster for biosynthesis of penicillin in *Penicillium nalgiovense* and antibiotic production in cured dry sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3: 1236-1240

- Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3630-3635
- Leistner L., Ayres J.C. 1968. Molds and meats. *Fleischwirtschaft*, 1: 62-65
- Lusky K., Tesch D., Göebel R. 1994. Effect of natural and crystalline ochratoxin A in pig after a feeding period of 28 days, and behaviour of the toxin residues in body fluids, organs, and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 46: 45-48
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11thed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall, Inc.: 992 str.
- Madsen A., Hald B., Lillehoj E., Mortensen H.P. 1982. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 32: 369-372
- Mally A., Hard G.C., Dekant W. 2007. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 2254-2260
- Mandeel Q.A. 2005. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159, 2: 291-298
- Mullis K.B. 1990. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using a thermostable enzyme. US Patent 4,965,188. Cit. po: Scott J.A., Straus N.A. 2000. A review of current methods in DNA fingerprinting. V: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 209-224
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. 2007. Basic local alignment search tool (BLAST). Bethesda, National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (27.7.2007): 1 stran
- Northolt M.D., Bullerman L.B. 1982. Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental condition. *Journal of Food Protection*, 45: 519-523
- Nunez F., Rodrìguez M.M., Bermudez M.E, Co`rdoba J.J., Asensio M.A. 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 32: 185-197
- Page R.D.M. 2000. Treeview software. Glasgow, University of Glasgow, Institute of Biomedical and Life Sciences, Division of Environmental and Evolutionary Biology <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> (31.6.2001): software
- Pavliček A., Hrda S., Flegr J. 1999. FreeTre - freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of

- the trees robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica*, 45: 97-99
- Pérez-Margariño S., González-Sanjósé M.L. 2003. Biotechnology in food production. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 1. 2nded. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 500-506
- Pitt J.I. 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. V: Water relations of foods. Duckworth (ed.). London, Academic Press: 273-307
- Pitt J.I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states of *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, Academic Press: 634 str.
- Pitt J.I., Hocking A.D. 1985. Fungi and food spoilage. Sydney, Academic Press: 413 str.
- Pitt J.I., Hocking A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2nded. London, Blackie Academic & Professional: 593 str.
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. 2001. Optimisation of amplified fragment polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium alboatrum* and *Verticillium dahliae*). Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani: Kmetijstvo, 77, 2: 136-146
- Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. 2003. Characterization of *Verticillium alboatrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease*, 87: 633-638
- Raper C.A., Raper J.R., Miller R.E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 64: 1088-1117
- Raper K.B., Fennell D.I. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams and Wilkins: 686 str.
- Raper K.B., Thom C. 1949. A manual of the *Penicillia*. Baltimore, Wilkins and Wilkins: 875 str.
- Raspor P. 2003. Starterske kulture. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 171-206
- Richard J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10
- Rojas F.I., Jodral M., Gosalvez F., Pozo R. 1991. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 13: 249-256

- Romagnoli B., Menna V., Gruppioni N., Bergamini C. 2007. Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control*, 18, 6: 697-701
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Heiguchi R., Hory G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491
- Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor: 854 str.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 1995. *Introduction to food-borne fungi*. 4th ed. Baarn, Delft, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 322 str.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 1995. *Introduction to food-borne fungi*. 4thed. Baarn, Delft, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 322 str.
- Samson R.A., Pitt J.I. 2000. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Abingdon, Harwood Academic Publishers: 3-309
- Samson R.A., Frisvad J.C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 253 str.
- Scolari G., Sarra P.G., Baldini P. 2003. Mikrobiologija suhega mesa. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 351-362
- Scott J.A., Straus N.A. 2000. A review of current methods in DNA fingerprinting. V: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 209-224
- Shay B.J., Egan A.F. 1992. Meat starter cultures and the manufacture of meat products. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol. 3. Hui Y.H. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 1735-1745
- Shimokomaki M., Youssef Youssef E. 2003. Curing. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 3. 2nded. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1702-1708
- Singh K., Frisvad J.C., Thrane U., Mathur S.B. 1991. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins.

Jordbrugsforlaget, Frederiksberg, Denmark, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries: 133 str.

- Smedsgaard J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A*, 760: 264-270
- Smith G. 1949. The effect of adding trace elements to Czapek-Dox medium. *Transactions of the British Mycological Society*, 32: 280-283
- Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2005. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 51-60
- Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2006. *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. *Microbial Ecology*, 52, 2: 207-216
- Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2007. Genetic variation among *Penicillium crustosum* isolates from Arctic and other ecological niches. *Microbial Ecology*, 54: 298-305
- Spotti E., Mutti P., Campanini M. 1988. Indagine microbiologica sul difetto dell'acido fenico del prosciutto durante la stagionatura. *Industria Conserve*, 63: 343-346
- Spotti E., Mutti P., Campanini M. 1989. Presenza di muffe sui prosciutti durante la prestagionatura e la stagionatura: contaminazione degli ambienti e sviluppo sulla porzione muscolare. *Industria Conserve*, 64: 110-113
- Sung-Hye C., Chang-Hee L., Mi-Ran J., Young-Wook S., Sang-Mok L., In-Sun C., So-Hee K., Dai-Byung K. 2008. Aflatoxin contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*, 107, 3: 1283-1288
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882
- Toscani T., Moseriti A., Dossena A., Dall'Asta C., Simoncini N., Virgili R. 2007. Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. *Journal of Chromatography B*, 855: 242-248
- Vos P., Hojers R., Bleeker M., Reijans M., van der Lee T., Hornes M., Frijetas A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.). London, Academic Press: 315-322

Zabeau M., Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent 0 534 858 A1. Cit. po: Scott J.A., Straus N.A. 2000. A review of current methods in DNA fingerprinting. V: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 209-224

Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Scripta, Študentska založba: 92 str.

Žlender B. 2004. Pravilnik o kakovosti mesnih izdelkov. Meso in mesnine, 5, 2: 59-62

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem somentorici diplomskega dela asist. dr. Silvi Sonjak in mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman, ki sta omogočili izvedbo raziskav.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Jensu Christianu Frisvadu (Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark) za sodelovanje in pomoč pri pridobivanju rezultatov.

Iskreno se zahvaljujem tudi slovenskemu podjetju, ki je dovolilo uporabo svojih proizvodov pod pogojem, da ni imenovano.

Nenazadnje se zahvaljujem vsem, ki so bili z menoj in ob meni.

PRILOGA A

SEZNAM VSEH IZOLATOV S PRIPADAJOČIMI EX-F OZNAKAMI,
IDENTIFIKACIJAMI IN VIROM IZOLACIJE

EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
2858	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2859	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2860	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2861	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2862	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2863	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2906	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 1
2907	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 1
2908	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2909	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2910	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
2911	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3164	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3165	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3166	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3191	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3192	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3193	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3195	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i>	Izdelek št. 2
3064	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3065	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3066	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3067	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3068	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3069	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3070	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 1
3071	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3072	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3073	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3074	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3075	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3076	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3077	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 1
3078	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3079	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
3080	<i>Cladosporium</i>		Izdelek št. 2
2885	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 1
2886	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 1
2887	<i>Eurotium</i>	<i>repens ali rubrum</i>	Izdelek št. 2
2888	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 1
			Se nadaljuje

Nadaljevanje - Priloga A : Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
2889	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
2890	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
2891	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 2
2892	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
2893	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 1
2894	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 2
2895	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 1
2896	<i>Eurotium</i>	<i>repens ali rubrum</i>	Izdelek št. 1
2897	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 1
2898	<i>Eurotium</i>	<i>rubrum</i>	Izdelek št. 2
2899	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 2
2900	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
2901	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 1
2902	<i>Eurotium</i>	<i>rubrum</i>	Izdelek št. 1
2903	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3129	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3130	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3131	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3132	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3133	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3134	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3135	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3136	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3137	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3138	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3139	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3140	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3141	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3142	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 1
3143	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3144	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 2
3145	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 1
3146	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 2
3147	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 2
3148	<i>Eurotium</i>	<i>amstelodami</i>	Izdelek št. 1
3149	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 1
3150	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3151	<i>Eurotium</i>	<i>amstelodami</i>	Izdelek št. 1
3152	<i>Eurotium</i>	<i>amstelodami</i>	Izdelek št. 1
3153	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 1
3154	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 2
3155	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3156	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3157	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 1
3158	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 1
3159	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
3160	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3161	<i>Eurotium</i>	<i>repens</i>	Izdelek št. 2
3162	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3163	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum</i>	Izdelek št. 2
3194	<i>Eurotium</i>	<i>herbariorum ali echinulatum</i>	Izdelek št. 2
3084	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3085	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3086	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3087	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3088	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3089	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3090	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3091	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3092	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3093	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3094	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3095	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3096	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3097	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3098	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3099	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3100	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3101	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3102	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3103	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3104	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3105	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3106	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3107	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3108	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3109	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3110	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3111	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3112	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3113	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3114	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3115	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3116	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3117	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3118	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3120	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3121	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3122	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3123	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3124	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 3
3125	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
3126	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3127	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
3128	<i>kvasovke</i>		Izdelek št. 2
2884	<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	Izdelek št. 1
2877	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2878	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2879	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2880	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2881	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2912	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2913	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2914	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2915	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2916	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2917	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2918	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2919	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2920	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2921	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2922	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2923	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2924	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2925	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2926	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2927	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2928	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2929	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2930	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2931	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2932	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2933	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2934	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2935	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
2936	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Izdelek št. 3
3199	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Sol iz embalaže
3200	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Sol iz embalaže
3204	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Zrak iz celice z izdelkom št. 1
3207	<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	Zrak iz proizvodnje
2795	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2800	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2801	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2802	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2803	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2804	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2805	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2806	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
2807	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2808	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2809	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2810	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2811	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2812	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2813	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2814	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2815	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2816	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2817	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2818	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2819	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2820	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2821	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2822	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2823	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2824	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2825	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2826	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2827	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2828	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2829	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2830	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2832	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2833	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2834	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2835	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2836	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2837	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2838	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2839	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2840	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2841	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2842	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2843	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2844	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2845	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2846	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2847	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2848	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2849	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2850	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2851	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2852	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2853	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
2854	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2855	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2856	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2857	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2955	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2956	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2957	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2958	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2959	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2961	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2962	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2963	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2964	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2965	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2966	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2967	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2968	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2969	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2970	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2971	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2972	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2973	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2974	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2975	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2976	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2977	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2978	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2979	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2980	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2981	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2982	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2983	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2984	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2985	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2986	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2987	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2988	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2989	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2990	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2991	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2992	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2993	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
2994	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2995	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2996	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
2997	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
2998	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
2999	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3000	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3001	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3002	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3003	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3004	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3005	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3006	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3007	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3008	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3009	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3010	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3011	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3012	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3013	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3014	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3015	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3016	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3017	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3018	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3019	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3020	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3021	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3022	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3023	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3024	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3025	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3026	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3027	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3028	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3029	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3030	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3031	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3032	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3033	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3034	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3035	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3036	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3037	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3038	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3039	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3040	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3041	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3042	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3043	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
3044	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3045	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3046	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3047	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3048	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3049	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3050	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3051	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3052	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3053	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3054	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3055	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3056	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3057	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3058	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3059	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3060	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3061	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3062	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3063	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3167	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3168	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3169	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3170	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3171	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3172	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3173	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3174	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3175	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3176	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3177	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3178	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3179	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3180	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3181	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3183	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3184	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3185	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3186	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3187	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 1
3188	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3189	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 2
3190	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Izdelek št. 3
3196	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Sol iz embalaže
3197	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Sol iz embalaže
3198	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Sol iz embalaže
			Se nadaljuje.

Nadaljevanje - Priloga A: Seznam vseh izolatov s pripadajočimi EX-F oznakami, identifikacijami in virom izolacije			
EX-F številka	Genus	Species	Vir izolacije
3201	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Zrak iz celice z izdelkom št. 1
3202	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Zrak iz celice z izdelkom št. 1
3206	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Zrak iz proizvodnje
3208	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Zrak iz celice z izdelkom št. 1
3210	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	Sol iz proizvodnje
2882	<i>Penicillium</i>	<i>olsonii</i>	Izdelek št. 1
2883	<i>Penicillium</i>	<i>olsonii</i>	Izdelek št. 2
2871	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 2
2872	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 2
2873	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 1
2874	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 2
2875	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 2
2876	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 1
2904	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 3
2905	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	Izdelek št. 3
2864	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2865	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2866	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2867	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2868	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2869	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2870	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2937	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2938	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2939	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2940	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2941	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2942	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2943	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2944	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2945	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2946	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2947	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2948	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2949	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2950	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 2
2951	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2952	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2953	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2954	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 3
3203	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Zrak iz celice z izdelkom št. 1
3205	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Zrak iz proizvodnje
2797	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	Izdelek št. 1
2794	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 2</i>	Izdelek št. 2
2796	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 2</i>	Izdelek št. 1
3182	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 3</i>	Izdelek št. 2

Nadaljevanje - Priloga B: Rezultati meritev premerov kolonij izbranih izolatov uvrščenih v rodova <i>Penicillium</i> in <i>Aspergillus</i>						
EX-F	Rod	vrsta	CYA (mm)	CREA (mm)	MEA (mm)	YES (mm)
2813	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	17,44	8,43	14,69	22,99
2847	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	16,66	6,93	14,76	26,32
2822	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	13,16	6,10	10,08	18,42
2816	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	15,85	8,20	11,93	21,68
2824	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	16,17	6,77	14,14	23,25
3029	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	20,68	11,33	15,94	23,52
2838	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	16,21	7,31	12,16	24,39
2994	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	15,83	6,63	11,64	21,00
2821	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	15,21	7,77	10,29	23,58
2795	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	16,50	7,70	11,37	19,21
2837	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	21,02	12,08	14,68	25,22
3005	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	17,17	11,14	11,12	17,23
2811	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	15,55	8,50	12,80	21,40
3058	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	17,83	10,30	13,59	21,86
3054	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	15,29	9,75	11,58	24,44
3178	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	20,29	11,29	15,78	31,10
2956	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	20,64	10,48	15,28	29,51
2995	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	20,33	11,09	15,16	24,65
3176	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	21,04	11,51	14,63	24,86
3047	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	17,79	11,70	15,32	32,29
3210	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	20,56	11,64	14,70	22,97
3196	<i>Penicillium</i>	<i>nordicum</i>	20,10	10,01	15,61	28,56
2882	<i>Penicillium</i>	<i>olsonii</i>	30,46	13,47	23,44	38,28
2883	<i>Penicillium</i>	<i>olsonii</i>	26,96	13,66	22,79	38,99
2876	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	29,02	16,40	28,34	39,46
2875	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	26,80	14,50	28,93	36,53
2874	<i>Penicillium</i>	<i>polonicum</i>	29,76	15,70	29,01	37,99
2869	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	23,78	14,10	14,43	32,23
2865	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	19,54	11,13	22,26	34,79
2947	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	25,71	11,62	21,67	39,52
2954	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	30,33	18,04	14,78	37,64
2946	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	22,15	13,25	23,52	39,74
2953	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	27,14	13,85	21,62	35,74
2870	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	22,58	11,51	18,99	20,92
2866	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	22,92	11,00	17,96	34,83
2797	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	26,42	12,71	23,32	27,64
2937	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	23,70	17,38	26,31	44,86
2793	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	21,38	10,35	16,94	30,35
2952	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	28,27	15,27	20,37	31,33
2943	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	28,27	13,52	21,81	33,50
2938	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	31,19	10,15	26,46	40,83
2939	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	28,34	11,95	22,80	38,67
3203	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 1</i>	24,44	13,25	22,56	24,58
2796	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 2</i>	17,21	9,60	11,68	22,55
2794	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 2</i>	19,67	10,83	12,58	29,75
2791	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 3</i>	15,25	5,67	13,63	23,03
3182	<i>Penicillium</i>	<i>sp. 3</i>	18,24	7,20	12,78	31,61

PRILOGA C

**REZULTATI MERITEV PREMEROV KOLONIJ IZBRANIH IZOLATOV
UVRŠČENIH V ROD *EUROTIIUM*.**

EX-F	Rod	TIP	CY40 (37°C) (mm)	CY40 (30°C) (mm)	CY40 (25°C) (mm)	CY20 (30°C) (mm)	DG-18 (30°C) (mm)
3147	<i>Eurotium</i>	I			35,94		
3154	<i>Eurotium</i>	I		7,13	32,82		
3158	<i>Eurotium</i>	I			43,71		
3142	<i>Eurotium</i>	I			40,22		
2886	<i>Eurotium</i>	I			44,56		
3144	<i>Eurotium</i>	I			36,15		
2894	<i>Eurotium</i>	I			72,21		
2896	<i>Eurotium</i>	II			60,43	14,52	
3159	<i>Eurotium</i>	III		15,61	47,54		
3156	<i>Eurotium</i>	III		19,63	51,45		
3135	<i>Eurotium</i>	III		29,15	42,20		
3153	<i>Eurotium</i>	III		29,87	40,05		
3141	<i>Eurotium</i>	III		22,10	50,28		
3155	<i>Eurotium</i>	III		23,05	49,73		
3160	<i>Eurotium</i>	III		25,57	35,33		
3139	<i>Eurotium</i>	III		18,67	43,79		
3140	<i>Eurotium</i>	III		16,52	45,81		
3150	<i>Eurotium</i>	III		23,04	37,40		
2892	<i>Eurotium</i>	III		16,24	78,00		
2900	<i>Eurotium</i>	III		24,50	76,30		
3134	<i>Eurotium</i>	III		35,24	47,15		
3162	<i>Eurotium</i>	III		44,15	41,05		
3129	<i>Eurotium</i>	III		44,50	36,92		
3137	<i>Eurotium</i>	III		39,25	42,91		
3136	<i>Eurotium</i>	III		45,66	45,99		
2898	<i>Eurotium</i>	IV		prerasla	prerasla	65,00	8,98
2902	<i>Eurotium</i>	IV		prerasla	prerasla	prerasla	8,16
3157	<i>Eurotium</i>	V		58,05	51,20	21,51	
2897	<i>Eurotium</i>	V		66,31	60,20	20,15	
3161	<i>Eurotium</i>	V		62,32	53,18	12,37	
3143	<i>Eurotium</i>	V		63,38	64,60	14,75	
3149	<i>Eurotium</i>	V		70,37	51,40	30,63	
2895	<i>Eurotium</i>	V		22,49	prerasla	15,73	
2897	<i>Eurotium</i>	V		18,70	66,89	13,72	
2893	<i>Eurotium</i>	V		16,53	51,85	9,25	
2901	<i>Eurotium</i>	V		25,76	prerasla	6,94	
2899	<i>Eurotium</i>	V		25,80	prerasla	7,65	
3148	<i>Eurotium</i>	VI	56,68	prerasla	66,36	46,53	60,45

PRILOGA D**NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA DELA GENA ZA β -TUBULIN ZA IZBRANE SEVE**

S sivo je označen del zaporedja, ki smo ga uporabili za analizo.

EX-F 2792 - *Penicillium nordicum*

>061213-09_M01_2792TUB-T1.ab1 848 0 848 ABI

NTTTTACACTCACACGAAAAGTCAATNCCCTGAACGTGAGGCGCGTGAGAGTGTAGTCCCTTCAACATACATAAAGAAAAG
GTTACCTCCAAACCGGCCAGTGTGTAAGTTCGACATGGAACATTCTTGGAAACATTCTTCTGCTCGTGGGACTAAATTGG
AATTGGATTACAGGGTAACCAAATTTGGTGCCGCTTTCTGGTAAGTGCCGAGCCTTTTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGA
CGGGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCATGGTCTCGATGGTGACGGACAGTAAGTTCAATGGTG
ATGTTGGTTTCTGGTGGATTGCACGCTGATATCTTGTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAAC
GTCTACTCAACCATGTGAGTTCAACGACTGGAACCGGAATAAACGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCTTTGATAATC
TAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGG
TCCCTTCGGCAAGCTTTCCGCCCGACAACCTTCATCTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCTAAGGGTCACTA
CACCAAGGGTGCCGAGCTTTGTTGACCAGGTTCTCGATGTCTCCGCCGTGAAGCCGAGGGCTGTGATTGCCTCCAGGGTT
TCCGATCACCACTCCCTGGGTGGTGGAAACCGGAGCCGGTACACTTTTGATCTCCAAGATCCGTGAGGAGTTC
CCCGACCGCATGATGAGCATCTTCTCCGTCGTCCCTCCCTCC

EX-F 2956 - *Penicillium nordicum*

>061213-01_A05_69TUB-T1.ab1 851 0 851 ABI

NNAACACCGTCAACGCCATAGATGAAACAGCCCCTGAGCCATGACCCCACTCTCAACAGATCTTTTGCTAACGACGATC
TAGGTTACCTCCAAACCGGCCAGTGTGTAAGTTCGACATGGAACATTCTTGGAAACATTCTTCTGCTCGTGGGACTAAAT
TGGAAATGGATTACAGGGTAACCAAATTTGGTGCCGTTTCTGGTAAGTGCCGAGCCTTTTTTTTTTCGCGTTGGGTATCA
ATTGACGGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCATGGTCTCAATGGTGACGGACAGTAAGTTTCAA
TGGTGATGTTGGTTTTCTGGTGGATTGCACGCTGATATCTTGTAGGTACAATGGTACCAATGGTACCTCCAACCTCCAGCTCGAGCGTA
TGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTTCAACGACTGGAACCGGAATAAACGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCTTTGA
TAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTCAATTTGAAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCT
CCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGACAACCTTCGTTCTCGGTAGTCCGGTGTGGTAACAACCTGGGCTAAGGGTC
ACTACACCAAGGGTGCCAAGCTTGTTAACCAAGTTCTCGATGTCTCCGCCGTGAACCAAGGGCTGTGATTGCCTCCAG
GGTTTCAAATCACCACTCCCTGGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACACTTTTGATCTCCAAGATCCGTGAGGA
GTTCCCGACCGTATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTCCCTCCCTCC

EX-F 3003 - *Penicillium nordicum*

>061213-09_G01_85TUB-T1.ab1 853 0 853 ABI

NTTTCGACCTCCAAAGTGTGTTGGCCGTGNGTCTGGCGCCAGCTCTCGGATTATCTTTTGCTAACGAAAATCTAGGTTT
ACCTCCAAACCGGCCAGTGTGTAAGTTCGACATGGAACATTCTTGGAAACATTCTTCTGCTCGTGGGACTAAATTGGAAT
TGGATTACAGGGTAACCAAATTTGGTGCCGCTTCTGGTAAGTGCCGAGCCTTTTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACGG
GTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCATGGTCTCGATGGTGACGGACAGTAAGTTTCAATGGTGATG
TTGGTTTCTGGTGGATTGCACGCTGATATCTTGTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTC
TACTTCAACCATGTGAGTTCAACGACTGGAACCGGAATAAACGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCTTTGATAATCTAG
GCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCC
TTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGACAACCTTCGTTCTCGGTAGTCCGGTGTGGTAACAACCTGGGCTAAGGGTCACTACACC
GAGGGTGCCGAGCTTGTGACCAGGTTCTCGATGTCTCCGCCGTGAAGCCGAGGGCTGTGATTGCCTCCAGGGTTTCCA
GATCACCACTCCCTGGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACACTTTTGATCTCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCTCC
ACCGTATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTCCCTCCCTCC

