



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2017 60 stp  
Institutt for kjemi, bioteknologi- og matvitenskap

## **Identifisering og karakterisering av *Penicillium* spp. isolert fra spekematindustrien**

Identification and characterization of *Penicillium*  
spp. isolated from dried and cured meat production

Lene Øverby  
Matvitenskap – Produksjon og utvikling

## Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende del av et 2-årig mastergradsstudium i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Hovedoppgaven er en del av forskningsprosjektet `Effektiv produksjon av muggfritt pinnekjøtt og spekemat`. Prosjektet er et samarbeid mellom Nortura, Veterinærinstituttet, Nofima, Danmarks tekniske universitet, Animalia og Sintef energi. Prosjektet er eid og finansiert av Nortura, Forskningsrådet (Bionær) og Veterinærinstituttet.

Denne oppgaven er utført ved Nofima, Ås og Veterinærinstituttet, Adamstuen i tidsrommet januar 2016 – mai 2017. Oppgaven er gjennomført parallelt med en 50 % ingeniørstilling ved Nofima Ås.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til veileder og forsker Bjørn C Schirmer og forsker Cathrine Finne Kure for deling av kunnskap, oppmuntring og gjennomlesing av oppgaven. Tusen takk til hovedveileder førsteamanuensis Hilde Østlie for gode tilbakemeldinger og gjennomlesing av oppgaven. Takk til forsker Kristian Hovde Liland for utførelsen av statistikk og gjennomlesing av deler av oppgaven. Takk til alle kolleger og ingeniører som har hatt forståelse, delt erfaringer og vært behjelpelig med arbeidet underveis, og ikke minst til Nofima for å kunne kombinere studiene med arbeidet.

Til slutt en stor takk til familie og venner, og ikke minst min kjære samboer for forståelse, oppmuntring og tålmodighet underveis.

Ås, mai 2017

Lene Øverby

## Sammendrag

Det produseres årlig rundt 2000 tonn pinnekjøtt i Norge med en verdi på over 400 millioner kroner. I 2013 måtte Nortura SA tilbakekalle over 230 tonn pinnekjøtt fra markedet på grunn av muggsopp på deler av partiet. Muggsopp er ansett som den viktigste årsaken til ødeleggelse av spekemat. For å kunne oppdage uønsket muggsopp på et tidlig stadium vil det være behov for mer effektive metoder for identifisering. Det vil også være nyttig med kunnskap om utvalgte muggsoppers egenskaper som eventuelt kan benyttes for å hemme eller hindre oppvekst av slik problemmugg.

Målet med denne oppgaven var å undersøke hvor følsomme metodene «Fourier Transform Infrared Spectroscopy» (FT-IR) og «Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectroscopy» (MALDI-TOF MS) er for klassifisering av problemmugg isolert fra spekematindustrien, samt å undersøke hvordan ulike vekstbetingelser som frysing, innhold av salt (NaCl) og ulik fuktighet påvirker artene *Penicillium solitum*, *Penicillium nordicum* og *Penicillium chrysogenum*.

I denne studien ble det benyttet til sammen 142 isolater til klassifisering med FT-IR og MALDI-TOF. Resultatene for FT-IR metoden viste et samsvar på 92,2 % artsnivå og 99,5 % på slektsnivå mellom metoden og tidligere identifisering med tradisjonell metode. 36 av 59 isolater ble klassifisert med høy grad av identifikasjon med MALDI-TOF, men bare ni av disse ble klassifisert i samsvar med den tidligere identifiseringen med tradisjonell metode og/eller sekvensering. I vekstforsøkene ble det målt radius av koloniene for å dokumentere veksten under de forskjellige betingelsene, samt at det ble tatt bilder av koloniutseende. Av artene viste resultatene at *P. solitum* ble mest hemmet av saltkonsentrasjonene i forhold til kontrollen, men høyere saltkonsentrasjon ga minst vekst for alle isolatene. Det ble også vist at isolatene ble hemmet av frysing, og de som ble fryst tre dager etter inokulering ble mest hemmet. Innfrysning rett etter inokulering ga isolatene mer «strøvekst» enn isolater fryst tre døgn etter inokulering.

Identifisering av muggsopp med FT-IR og MALDI-TOF viste lovende resultater, men det mangler tilstrekkelig databaser for å gjøre klassifiseringen god nok. Forandring i vekstbetingelsene til *P. solitum*, *P. nordicum* og *P. chrysogenum* påvirket isolatene i forskjellig grad, og alle ble til dels hemmet av både salt (NaCl) og frysing.

## Abstract

Annually it is produced around 2000 tonnes of “pinnekjøtt” in Norway with a value of over 400 million Norwegian kroner. In 2013, Nortura SA had to recall over 230 tonnes of “pinnekjøtt” from the market due to mould growth on the product. Mould growth is considered the main cause of spoilage of dry-cured meat. In order to detect unwanted growth of mould at an early stage, more efficient methods of identification will be needed. It will also be helpful with knowledge of selected properties of mould that may be used to inhibit or prevent the growth of spoilage fungi.

The aim of this study was to investigate how sensitive Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-Of-Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS) are for the classification of unwanted mould isolated from the food industry, as well as investigating how different growth conditions such as freezing, salt content (NaCl) and different humidity the species *Penicillium solitum*, *Penicillium nordicum* and *Penicillium chrysogenum*.

In this study, 142 isolates were used for classification with FT-IR and MALDI-TOF. The results for the FT-IR method showed a compliance of 92.2% species level and 99.5% at genus level between the method and earlier identification using traditional methodology and/or sequencing. 36 out of 59 isolates were classified with a high identification with MALDI-TOF, but only nine of them were identified in accordance with the previous identification with traditional method and / or sequencing. In the growth experiments, the radius of the colonies was measured to document the growth under the various conditions, and photographs of the appearance of the colonies were taken. Among the species, the results showed that *P. solitum* was inhibited the most by the salt concentrations compared to the control, but higher salt concentrations gave less growth for all isolates. It was also shown that the isolates were inhibited by freezing and those who were frozen three days after inoculation were most inhibited. Freezing immediately after inoculation resulted more scattered growth than isolates frozen three days after inoculation.

Identification of spoilage fungi with FT-IR and MALDI-TOF showed promising results, but there are insufficient databases to make the classification good enough. Changes in the growth conditions of *P. solitum*, *P. nordicum* and *P. chrysogenum* affected the isolates in different degree, but all were partly inhibited by both salt (NaCl) and freezing.

# Innhold

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Spekemat og pinnekjøtt .....	1
1.2 Muggsopp .....	1
1.3 Penicillium spp. ....	2
1.4 Penicillium spp. i spekematindustrien .....	4
1.4.1 Penicillium solitum .....	5
1.4.2 Penicillium nordicum .....	5
1.4.3 Penicillium chrysogenum .....	6
1.5 Vekstbetingelser for muggsopp .....	6
1.5.1 Næringsstoffer .....	6
1.5.2 Temperatur .....	7
1.5.3 Vannaktivitet .....	7
1.6 Toksinproduksjon .....	8
1.7 Allergener .....	9
1.8 Identifisering av muggsopp .....	9
1.9 Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR .....	10
1.10 Identifisering av muggsopp med FT-IR.....	12
1.11 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectroscopy, MALDI-TOF MS .....	13
1.12 Identifisering av muggsopp med MALDI-TOF.....	13
1.13 Bakgrunn for studiene .....	14
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>15</b>
2.1 Muggsoppisolater .....	15
2.2 Oppbevaring av muggsoppisolater .....	16
2.3 Medier.....	16
2.4 FT-IR .....	16
2.4.1 Dyrking av mycel .....	16
2.4.2 Preparering av prøvematerialet .....	17

2.4.3	Dataanalyse .....	17
2.4.4	Statistikk.....	18
2.5	MALDI-TOF MS .....	19
2.5.1	Dyrking av mycel .....	19
2.5.2	Preparering av prøvematerialet .....	19
2.5.3	Dataanalyse .....	20
2.6	Vekstforsøk.....	21
2.6.1	Muggsoppisolater .....	21
2.6.2	Innledende forsøk med salt (NaCl) .....	21
2.6.3	Innledende forsøk med frysing.....	23
2.7	Hovedforsøk vekst med salt (NaCl) og frysing.....	23
2.7.1	Statistikk salt (NaCl) .....	24
2.8	Fuktighet og temperatur.....	24
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>25</b>
3.1	FT-IR .....	25
3.2	Isolater fra 2016.....	27
3.3	MALDI-TOF MS .....	28
3.4	Vekstforsøk - Effekt av ulike saltkonsentrasjoner (NaCl).....	30
3.4.1	Innledende forsøk.....	30
3.4.2	Hovedforsøk.....	32
3.4.3	Sporedannelse.....	34
3.5	Vekstforsøk - Effekt av frysing .....	36
3.5.1	Kolonistørrelse etter frysing.....	40
3.6	Vekstforsøk - Effekt av ulik fuktighet.....	41
3.6.1	Innledende forsøk.....	41
3.6.2	Hovedforsøk .....	41
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>43</b>
4.1	FT-IR .....	44
4.1.1	Isolater fra 2016 .....	46
4.2	MALDI-TOF .....	46
4.3	Vekstforsøkene .....	48
4.4	Vekstforsøk - Effekt av ulike saltkonsentrasjoner (NaCl).....	49
4.4.1	Vekstforsøk - Sporedannelse.....	51

4.5	Vekstforsøk - Effekt av Frysing .....	52
4.6	Vekstforsøk - Effekt av ulik fuktighet.....	53
4.7	Konklusjon.....	54
<b>5</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Vedlegg .....</b>	<b>62</b>
6.1	Muggsoppisolater .....	62
6.2	Tillaging av medier.....	66
6.3	Beregninger .....	67
6.4	Statistikk hovedforsøk salt (NaCl) .....	67
6.5	Rådata innledende forsøk med salt (NaCl).....	68
6.6	Rådata hovedforsøk med salt (NaCl).....	74
6.7	Sporedannelse hovedforsøket for salt (NaCl).....	80
6.8	Rådata kolonistørrelse fryseforsøk .....	83
6.9	Rådata kolonistørrelse fuktighetsforsøk .....	84

# 1 Introduksjon

## 1.1 Spekemat og pinnekjøtt

Tørking og salting av kjøtt har lange tradisjoner i Norge og regnes som en av de viktigste konserveringsmetodene i historien. Spekemat er ofte betegnelsen når et kjøttråstoff blir konservert ved tørking og/eller salting. Kjøttet blir som regel saltet før det blir tørket (Riddervold 1993). Spekemat kan for eksempel være spekeskinke, fenalår, pinnekjøtt etc. Det kan enten være røkt eller urøkt (Animalia 2009).

Det saltede rå kjøttet blir gradvis tørket under definerte betingelser, som temperatur og fuktighet. Produktets egenskaper som pH og vannaktivitet ( $a_w$ ) er ulike for forskjellige spekevarer. Dersom prosessen for speking er optimal sikrer den god kvalitet til produktet, og tilstrekkelig holdbarhet ved romtemperatur hvis  $a_w$  er under 0,90 (Animalia et al. 2007). Spekeskinke og fenalår skal henges til speking på et mørkt, luftig og kjølig sted. Disse spekeproduktene spises uten noen form for varmebehandling (Riddervold 1993).

Pinnekjøtt er tørket og saltet ribbe fra lam eller sau (Høberg 2016). Pinnekjøtt har sin opprinnelse i det gamle norske bondesamfunn i områder med stort sauehold som på Vestlandet, samt i enkelte bygder på Østlandet og i Nord – Norge (Gilde.no u.å.-a). Pinnekjøtt er en tradisjonell norsk rett og mange forbinder den med julehøytiden. Pinnekjøtt blir som regel vannet ut før det blir tilberedt og skiller seg fra annen spekemat ved at det varmebehandles før det blir spist (Høberg 2016).

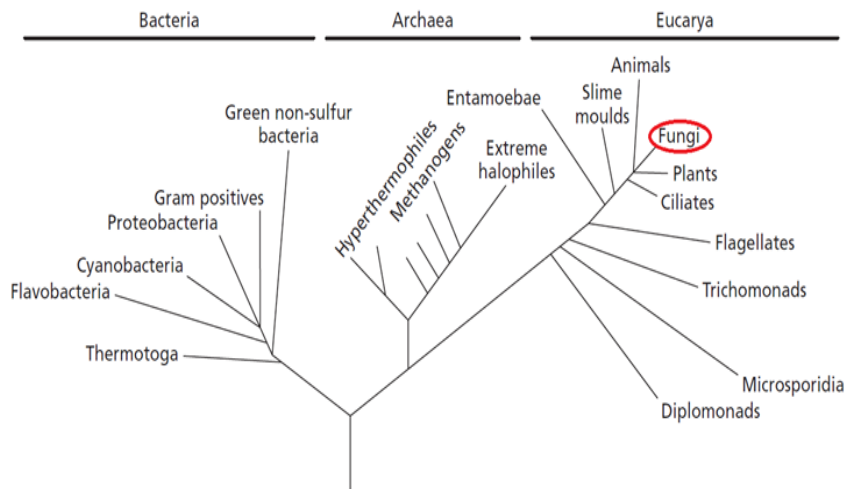
Pinnekjøtt har et høyt innhold av fett, protein og salt. I pinnekjøtt kan næringsinnholdet variere, men typisk kan det inneholde 35 g fett, 24 g protein og 9,4-11 g NaCl, alle per 100 g (Gilde.no u.å.-a). I spekeskinke inneholder det vanligvis 12-22 g fett, 24-31 g protein og 7-8,5 g NaCl, alle per 100 g (Gilde.no u.å.-b).

## 1.2 Muggsopp

Soppriket består av en stor gruppe organismer som blant annet inkluderer muggsopp og gjær (Madigan et al. 2010). Soppene er på lik linje med dyr og planter plassert i et eget rike, Figur 1 (Deacon 2006). Innen soppriket kan så mye som 1,5 millioner arter eksistere og rundt 100 000



arter er beskrevet (Madigan et al. 2010). Sopp kan variere fra flercellede organismer som danner hyfer til et mycel til encellede gjærceller (Deacon 2006).



Figur 1. Et fylogenetisk tre, som viser noen av de store gruppene av organismer. Soppriket (Fungi) er ringet rundt, og gruppen er nærmest planteriket («plants») og dyreriket («animals») (Deacon 2006).

Muggsopper kan være til både nytte og til skade, og det finnes utallige arter i verden med ulike funksjoner (Deacon 2006). De finnes overalt i naturen og har viktige økologiske roller som saprotrofer, som vil si at de vokser på ikke-levende materialer, eller lever i symbiose med andre organismer eller at de er parasitter (Webster & Weber 2007). Muggsopper er viktige nedbrytere i naturen (Deacon 2006) og de har en avgjørende rolle i mineraliseringen av organisk karbon (Madigan et al. 2010). Noen produserer giftstoffer som kan gi sykdom til dyr og mennesker, og noen kan være årsak til at avlinger går tapt. Men muggsopper er også til nytte i matindustrien og til produksjon av antibiotika (Deacon 2006). Til blant annet ost blir arter som *Penicillium roquefortii* og *Penicillium camemberti* benyttet, og til salami blir *Penicillium nalgiovense* benyttet (Gravesen et al. 1994).

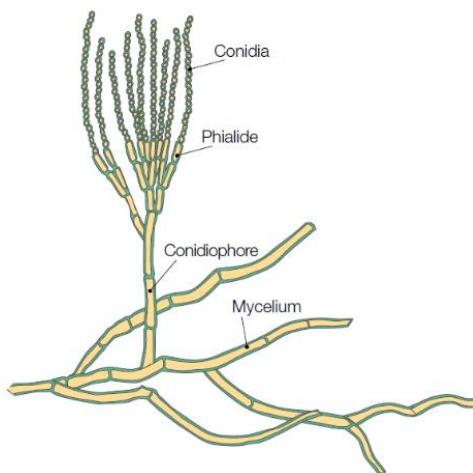
### 1.3 *Penicillium* spp.

Sekkesporesoppene, Ascomycota, er den største gruppen med ca. 64 000 kjente arter innenfor soppriket. De fleste slekter innen sekkesporesoppene er muggsopp som produserer hyfer med regelmessig septa (Moore et al. 2011). *Penicillium* og *Aspergillus* er velkjente slekter innenfor orden Eurotiales. De fleste er anarmorfe som vil si at de har en aseksuell livssyklus.

*Penicillium* kan forekomme på alle typer lagrede produkter, og sporene finnes overalt i lufta (Webster & Weber 2007). Sporene blir produsert for å spre muggsoppen, og er årsaken til

kontaminering av næringsmidler. Sporene er motstandsdyktige mot et bredt spekter av ugunstige miljøforhold som for eksempel lav  $a_w$ , høye temperaturer og UV-stråling, og de frigjøres som respons på omgivelsene, når de blir «trigget» (Nguyen Van Long et al. 2017). Av en spore dannes det hyfe. Hyfene forgreiner seg bak hyfespissen som resulterer i et myselium. Hyfene har apikal vekst og hovedkomponenten i hyfeveggen består oftest av chitin (Deacon 1984), samt at veksten skjer i spissen (UiO.no 2011).

Taksonomien til *Penicillium* spp. er primært basert på mikro- og makromorfologien og vekst karakteristikk på ulike medier. På bakgrunn av dette kan det være vanskelig å skille mellom arter som er nært relaterte (Gori et al. 2011). *Penicillium* arter kan tilpasse seg omgivelsene, og små forskjeller i næringsstoff, temperatur, lys eller fuktighet kan være avgjørende for hvilke arter som etablerer seg. Noen ganger kan det være vanskelig med sammenligninger mellom studier (Visagie et al. 2014). Ved mikroskopering kan *Penicillium* spp. se ut som en pensel, og aseksuelle sporer dannes i kjeder fra de forgrenede konidiebærerne, Figur 2. *Penicillium* arter er oftest grønne eller blå i fargen (snl.no 2017).



Figur 2. Et typisk utseende av en *Penicillium* art under mikroskop. Bilde: (Bylund 1995)

#### 1.4 *Penicillium* spp. i spekematinindustrien

I Norge er det uønsket med muggsopp på spekeemat (Håseth 2012), og kontaminering med muggsopp er ansett som den viktigste årsaken til kvalitetsødeleggelse (Asefa et al. 2010). Det produseres årlig rundt 2000 tonn pinnekjøtt i Norge med en verdi på over 400 millioner kroner. I 2013 måtte Nortura SA tilbakekalle over 230 tonn pinnekjøtt fra markedet på grunn av muggsopp på deler av partiet (Veterinærinstituttet.no 2015). Imidlertid er det mer vanlig med bruk av muggkultur sør i Europa, i land som for eksempel Spania, Italia og Frankrike (Sunesen & Stahnke 2003). For eksempel i Spania er husfloraen hovedkilden til kontaminering av spekeemat (López-Díaz et al. 2001).

Muggsopp kan finnes i produksjonslokaler for spekeemat, noe som kan kontaminere produkter under produksjon. Muggsopp som kontaminerer produkter er ofte de som trives godt ved lav  $a_w$  som for eksempel xerofile sopp (Animalia 2009; Asefa et al. 2010). Kontaminering med muggsopp kan gi økonomiske konsekvenser og uønskede effekter som bismak, udelikat utseende og dannelsen av giftstoffer (Scaramuzza et al. 2015).

De oftest registrerte artene isolert fra forskjellige kjøttprodukter kommer fra *Penicillium* spp. og *Aspergillus* spp. (Jay 1987). Den dominerende soppfloraen i spekevarer er fra *Penicillium* slekten (Pitt & Hocking 1999). I begynnelsen av en fermenteringsprosess er det gjær som er mest dominerende på overflaten av spekevarer, men etter noen uker er det muggsopper som *Penicillium olsonii*, *Penicillium chrysogenum* og *Penicillium solitum* som dominerer (Filtenborg et al. 1996).

I Tabell 1 er et utvalg av muggsopp isolert fra spekematinindustri vist. De hyppigst isolerte muggsoppisolatene var blant annet *Penicillium brevicompactum*, *P. solitum* og *P. chrysogenum*.

Tabell 1. Utvalg av muggsoppisolater isolert fra produkt, sted etc.

Sted eller produkt	Isolerte muggsopparter	Referanse
Spekevarer	<i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium olsonii</i> , <i>Penicillium solitum</i> og <i>Penicillium salamii</i>	Ferrara et al. (2016)
Spekevarer og sjøsalt	<i>Penicillium nordicum</i>	Sonjak et al. (2011b)
Norske spekevarer	<i>P. nalgiovense</i> , <i>Penicillium solitum</i> , <i>Penicillium crustosum</i> og <i>Penicillium chrysogenum</i>	Asefa et al. (2010)
Greske pølser	<i>Penicillium solitum</i>	Papagianni et al. (2007)
Fransk spekeskinke	<i>Penicillium solitum</i>	Tabuc et al. (2004)

Rå skinke under modning	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> og <i>Penicillium expansum</i>	Pitt og Hocking (1999)
Nord-Italia og Syd-Østerrike	<i>Penicillium solitum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> og <i>Penicillium commune</i>	Iacumin et al. (2017)
Produksjonsanlegg spekemat og pate	<i>Penicillium brevicompactum</i> og <i>Penicillium solitum</i>	Sorensen et al. (2008)
Produksjonsanlegg Argentina	<i>Penicillium nordicum</i> , <i>Penicillium solitum</i> og <i>Penicillium chrysogenum</i>	Castellari et al. (2010)
Spania	<i>Penicillium olsonii</i> og <i>Penicillium commune</i>	López-Díaz et al. (2001)
Fuktige bygninger	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium expansum</i> og <i>Penicillium brevicompactum</i>	Gravesen et al. (1994)

#### 1.4.1 *Penicillium solitum*

*Penicillium solitum* er en muggsopp som er assosiert med kontaminering av harde oster, leverpostei og kjøttprodukter, og arten kan være patogen for epler. Den har også vært isolert fra kjøttprodukter fra Færøyene (Samson et al. 2004a). *Penicillium solitum* er halo- og psykotolerant, og vokser godt ved lave temperaturer. Arten har ingen vekst eller vokser dårlig ved 30 °C, og kan tolerere lave pH verdier og ganske lav vannaktivitet. *Penicillium solitum* ligner på arten *P. commune* (Samson et al. 2010).

#### 1.4.2 *Penicillium nordicum*

*Penicillium nordicum* er en art som kan kontaminere et bredt spekter av proteinrik mat. Den er ofte isolert fra spekeskinke og spekepølse. *Penicillium nordicum* kan vokse godt ved lave temperaturer som 15 °C, og ved økt saltinnhold som 5 % NaCl. Arten er derfor ofte isolert fra nedkjølt og saltet proteinholdige matvarer (Sonjak et al. 2011b).

*Penicillium nordicum* og *P. verrucosum* kan produsere giftstoffet okratoksin A (OTA). Disse to artene er fylogenetisk relaterte og de har svært like morfologiske egenskaper. *Penicillium verrucosum* er primært funnet på korn, mens *P. nordicum* er mest isolert fra spekemat. *Penicillium nordicum* har blitt isolert fra luft i produksjonslokaler for kjøtt (Sonjak et al. 2011b), og også funnet i rent salt (NaCl). I studien til Rodriguez et al. (2014) ble det viste at tre stammer av OTA produserende *P. nordicum* vokste bedre på 22 % NaCl (0,87 a<sub>w</sub>) enn på 10 % NaCl (0,94 a<sub>w</sub>). På grunn av lang modningstid for spekemat er forurensning med OTA en risiko på spekevarer (Rodriguez et al. 2014).

### 1.4.3 *Penicillium chrysogenum*

*Penicillium chrysogenum* finnes vanligvis innendørs i lufta, og er ofte isolert fra fuktige bygninger fra for eksempel veggteppet. *Penicillium chrysogenum* har optimum temperatur for vekst ved 23 °C, men arten kan vokse i temperaturområde mellom 5-37 °C (Gravesen et al. 1994). *Penicillium chrysogenum* kan produsere penicillin (Frisvad & Samson 2004). Den ble tidligere kjent som *Penicillium notatum* som den første produsenten av antibiotika. *Penicillium chrysogenum* kan også produsere andre metabolitter som alkaloids roquefortine C, meleagrinn og chrysogin (Gravesen et al. 1994). *Penicillium chrysogenum* kan bli benyttet som startkultur, men ettersom noen stammer kan produsere penicillin bør det gjøres grundige undersøkelser før bruk (Sunesen & Stahnke 2003).

## 1.5 Vekstbetingelser for muggsopp

Matvarer inneholder mange næringsstoffer som kan gi et rikt vekstmiljø for mikroorganismer som muggsopper. Faktorer som vannaktivitet, prosessering, lagringstemperatur, innhold av næringsstoffer og konserveringsteknikker kan ha en betydning for veksten (Pitt & Hocking 1999). Det må være tilstrekkelig vekstvilkår for at muggsoppene skal vokse og de ulike faktorene kan variere fra art til art (Filtenborg et al. 2000). Temperatur og vannaktivitet er rapportert som de viktigste årsakene til vekst av muggsopp på spekeprodukter (Asefa et al. 2010; López Díaz et al. 2002).

De fleste muggsopper krever oksygen tilgang for å vokse, og hvis forholdene ligger til rette kan de vokse overalt. Muggsopper kan vokse i pH området fra rundt 2-11, en vannaktivitet fra rundt 0,62 – 0,995 og i et temperaturområde fra -10 °C til rundt 60 °C (Jay 1987). Miljøbetingelsene som er i produksjonsanleggene for spekevarer kan fremme veksten til den opprinnelige flora på overflaten av produktene (Ferrara et al. 2016).

### 1.5.1 Næringsstoffer

All muggsopp er heterotrofe (kjemo-organotrofe) og de krever organisk materiale som både kan være energikilde men også karbonkilde for cellyntesen. Muggsopper fordøyer ikke

næringsstoffer men de absorberer de utenfra ved å frigjøre ekstracellulære enzymer til miljøet slik at de blant annet kan absorbere komplekse karbohydrater (Deacon 1984). Muggsopper kan bruke aminosyrer som en karbonkilde, og kan vokse på produkter som er rike på proteiner og uten karbohydrater. Dermed kan muggsopper benytte spekemat som substrat (Filtenborg et al. 2000).

### 1.5.2 Temperatur

Majoriteten av *Penicillium* arter vokser best mellom 20-30 °C, og til rutine analyser er det 25 °C som blir benyttet. Optimalt temperatur-område for *Penicillium* arter er 25-30 °C, og maksimal temperatur er 28-35 °C (Filtenborg et al. 2000).

Arter av *Penicillium* er ofte assosiert med ødelagte næringsmidler lagret ved lave temperaturer (Moss 1987), og de fleste er i stand til å vokse ved 5 °C (Frisvad & Samson 2004). I en studie har det blitt vist at arter som *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium verrucosum*, *P. brevicompactum* og *P. chrysogenum* er i stand til å vokse ved lave temperaturer som 5 °C i løpet av sju dager (Moss 1987). Noen *Penicillium* arter kan vokse raskere ved 15 °C enn ved 25 °C, som blant annet er *Penicillium bialowiezense* og *P. verrucosum*. Artene som vokser dårlig ved 30 °C inkluderer blant annet *Penicillium commune*, *P. solitum*, *P. bialowiezense*, *P. nordicum* og *P. verrucosum*, *P. brevicompactum*, *P. olsonii* og *P. expansum* (Frisvad & Samson 2004).

### 1.5.3 Vannaktivitet

Vannaktivitet ( $a_w$ ) er et mål for fritt vann i næringsmidler. Det frie vannet kan være tilgjengelig for vekst av mikroorganismer (Filtenborg et al. 2000). *Penicillium* arter omfatter en stor gruppe som kan vokse ved en vannaktivitet under 0,85 (Moss 1987). Eksempler på arter er vist i Tabell 2. *Penicillium* arter kan også tåle 5 % NaCl godt. Arter som vokser raskere på medium med 5 % NaCl enn uten NaCl er blant annet *P. brevicompactum*, *P. olsonii*, *P. chrysogenum*, *P. solitum*, *P. nordicum* og *P. verrucosum*. *Penicillium chrysogenum* (blant annet) er vanlig i tørre habitater og kan opprinnelig kommet fra ørken habitat og salt jord. *Penicillium chrysogenum* har blitt funnet på matvarer med lav vannaktivitet som for eksempel saltet kjøtt, men den har også blitt isolert fra vanlig innendørs luft miljøer (Frisvad & Samson 2004).

Tabell 2. Minimum vannaktivitet for vekst av ulike utvalgte muggsopp (Moss 1987).

Arter	Minimum $a_w$ for vekst
<i>Penicillium expansum</i>	0,82
<i>Penicillium corylophilum</i>	0,80
<i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	0,78

## 1.6 Toksinproduksjon

Noen muggsopper kan produsere sekundære metabolitter, som ikke er nødvendig for muggsoppens vekst og reproduksjon. Sekundære metabolitter kan for eksempel være giftstoffer og penicillin som produseres gjennom naturlige reaksjonsveier i muggsoppene. Metabolittene som produseres er avhengig av den næringen som muggsoppen har tilgang på (Bondegaard 2016).

De fleste kjente giftstoffene er produsert fra arter innen slektene *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* og *Alternaria*. For eksempel Okratoksin A (OTA) er kreftfremkallende og blant annet produsert av *P. verrucosum* og *P. nordicum*. *Penicillium nordicum* har blitt isolert fra kjølelagret kjøtt og osteprodukter (Frisvad & Thrane 2004). *Penicillium nordicum* er ansett som den viktigste OTA produserende arten som oftest er isolert fra spekeemat (Lippolis et al. 2016). Giftstoffene er i stand til å gi akutte og kroniske forgiftninger hos dyr og mennesker (Van Egmond 2004). Okratoksin A akkumulerer spesielt i nyrene, og absorberes langsomt fra mage-tarm kanal (Aune 2007).

Det er når muggsoppen vokser ukontrollert at den kan danne giftstoffer som OTA. Muggsoppene er avhengig av miljøbetingelser som fuktighet og temperatur for å produsere OTA (Van Egmond 2004). I spekeemat kan OTA komme direkte fra kontaminasjon fra muggsoppen, eller det kan overføres indirekte fra forurenset fôr igjennom dyr (Lippolis et al. 2016). Produksjon av OTA kan oppstå når kontaminerte næringsmidler blir lagret i fuktige omgivelser. I tillegg til spekevarer kan OTA finnes i et bredt utvalg av næringsmidler som korn og tørket frukt (Aish et al. 2004).

Det har blitt utført en studie i Nord-Italia for å undersøke nærværet av muggsopper som kan produsere OTA på overflaten av spekepølser. Det ble totalt isolert 757 stammer fra spekepølsetarmene, det vil si fra overflaten av spekepølsene. *Penicillium olsonii*, *P. chrysogenum* og *P. verrucosum* var av de hyppigst identifiserte artene. I studien ble OTA funnet på utsiden av spekepølsetarmene, mens tilstedeværelsen av OTA inn i kjøttet var under deteksjonsgrensen (Iacumin et al. 2009).

## 1.7 Allergener

Forekomsten av *Penicillium* og *Aspergillus* er ofte høyere inne enn i uteluften, og de er ofte knyttet til allergiske luftveis symptomer (Fischer & Dott 2003). Som tidligere nevnt er også noen arter penicillin produserende, hvor da penicillinet kan være allergenet. De fleste muggsopper har evnen til å produsere sporer i store mengder. Når en så stor mengde sporer frigjøres til den omgivende lufta blir sporene ansett som organisk støv. Som alt annet støv kan dette feste seg til overflater eller det kan bli pustet inn av mennesker. Repeterende eksponering med et stort antall av muggsporer kan øke risikoen for å utvikle spesifikke allergiske reaksjoner. Muggsopper som *P. roquefortii* og *P. camembertii* kan forårsake astma ved mye eksponering (Gravesen et al. 1994).

## 1.8 Identifisering av muggsopp

Muggsopp og sporer er ikke alltid synlige eller påviselige på det stadiet når problemene oppstår (Gravesen et al. 1994). Det er vesentlig å kunne identifisere problematisk muggsopp på et tidlig stadium og skille disse fra tilfeldig kontaminering med muggtyper som ikke utgjør et problem på produktet (Animalia 2009).

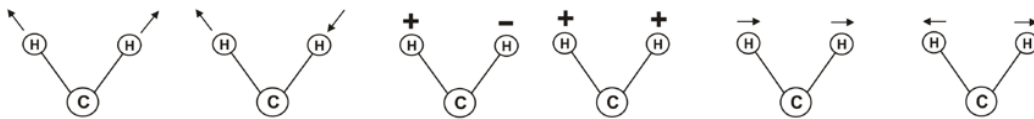
Muggsopp blir vanligvis identifisert med tradisjonelle fenotypiske metoder, som er basert på makroskopiske og mikroskopiske egenskaper. Disse fremgangsmåtene er både tid- og arbeidskrevende samt at de noen ganger ikke er tilstrekkelig nøyaktig. Det kreves kunnskap og kompetanse for å utføre en morfologiske analyse av sopp (Lecellier et al. 2014). Molekylær metode er også brukt for identifisering, og sekvensering av DNA er hyppigst brukt. For *Penicillium* spp. er det sekvensering av  $\beta$ -tubulin lokus (gitt gen) som er anbefalt (Samson et al. 2010). De molekylære metodene er mer spesifikke og pålitelige, men samtidig er de dyre, tidkrevende og krever spesialkompetanse (Lippolis et al. 2016). Det er også ofte mulig å observere muggvekst på produktet med det blotte øye ettersom muggveksten normalt skjer på overflaten men også på grunn av størrelsen på muggkolonien (Samson et al. 2004c). Det vil på bakgrunn av fordeler og ulemper med tradisjonelle og molekylære metoder fremdeles være behov for nye metoder til identifisering av muggsopp.



## 1.9 Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR

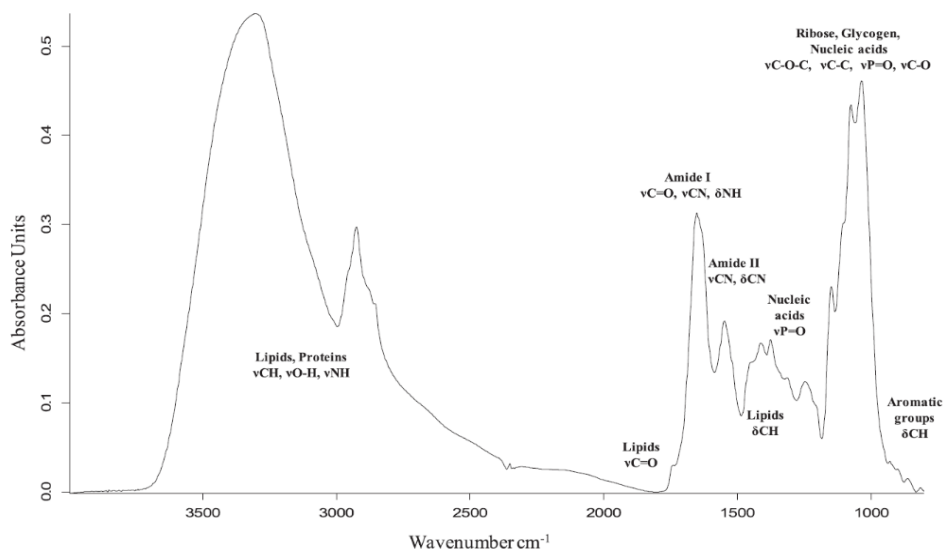
«Fourier transform infrared spectroscopy» (FT-IR), har i de senere år fått oppmerksomhet som en rask metode for identifisering av muggsopp (Shapaval et al. 2013). Det er en anvendelig metode som også kan brukes til analyser av faste stoffer, væsker og gasser (Santos et al. 2010). Den har et potensiale til å bli brukt som rutinemetode på kontrollaboratorier (Shapaval et al. 2013) og kan også bli anvendbar i industriell sammenheng (Lecellier et al. 2014).

Helt siden 1950-årene har det blitt benyttet infrarød spektroskopi (IR) til klassifisering av mikroorganismer (Mariey et al. 2001). FT-IR er en teknikk basert på vibrering av atomer i et molekyl. Atomene kan vibrere på forskjellige måter, avhengig av molekylets natur. Det skjer for eksempel når den kjemiske bindingen absorberer infrarødt lys, Figur 3 (Nawrocka & Lamorsk 2013).



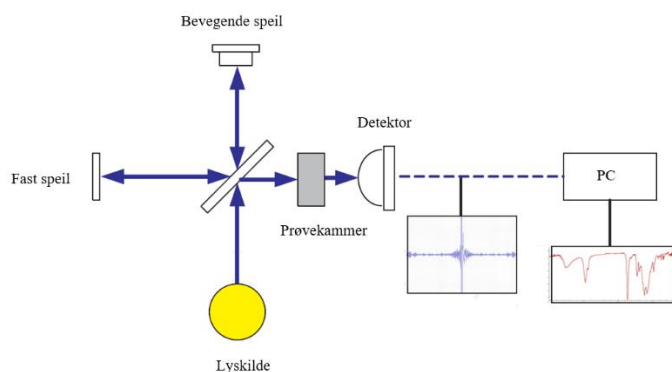
Figur 3. Molekyler som vibrerer på varierende måte når den kjemiske bindingen absorberer det infrarøde lyset. Fra venstre mot høyre: Symmetrisk strekking, asymmetrisk strekking, vridning, «wagging», «rocking» og saksing (Nawrocka & Lamorsk 2013).

Prinsippet for FT-IR er at en prøve inneholder ulike molekyler som absorberer infrarødt lys i forskjellig grad. Det kan oppnås unike spektre som gir molekulære «fingeravtrykk». Et absorpsjonsspektrum av muggsopp er illustrert i Figur 4, som viser soppenes innhold av makromolekyler som nukleinsyrer, proteiner, lipider, polysakkarider etc. Kjemiske bindinger i et molekyl kan bestemmes ved tolkning av det infrarøde absorpsjonsspektrumet (Santos et al. 2010).



Figur 4. Karakteristisk ubehandlet absorpsjonsspektrum av muggsopp. De molekylære bindingene er angitt med deres biomolekylære navn.  $\delta$  = bøying og  $\nu$  = strekking (Lecellier et al. 2015).

De grunnleggende komponentene i et FT-IR spektrometer er ifølge Stuart (1997) og Stuart (2004): Lyskilde  $\rightarrow$  Interferometer  $\rightarrow$  Prøve  $\rightarrow$  Detektor  $\rightarrow$  Forsterker  $\rightarrow$  Omformer (analog til digital)  $\rightarrow$  PC for *Fourier transform* (Figur 5)



Figur 5. De grunnleggende komponentene i et FT-IR spektrometer (Liu et al. 2015)

Et interferometer blir brukt for å analysere materialet som blir bestrålt. En infrarød stråle går inn i prøvekammeret, hvor det enten blir helt eller delvis absorbert eller reflektert av prøvematerialet. Lys-strålen treffer detektoren for en endelig måling og signalet blir digitalisert og sendt tilbake til en pc (Santos et al. 2010). Det er i datamaskinen at den matematiske metoden *Fourier-transformasjon* finner sted (Stuart 1997).

FT-IR foregår i området mid-infrarød som er fra  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . Området omfatter fire regioner:  $1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$ : Fingeravtrykks-regionen,  $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ : Dobbelbinding-regionen,  $2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ : Trippelbinding-regionen og  $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ : X-H strekking-regionen (Nawrocka & Lamorsk 2013).

## 1.10 Identifisering av muggsopp med FT-IR

Det har blitt utført studier som viser at identifisering av muggsopp med FT-IR virker lovende. Identifisering av muggsopp med FT-IR er mer kompleks og følsom, og ikke så robust som den er for bakterier og gjær (Shapaval et al. 2013)

Blant annet i studien til Shapaval et al. (2010) ble det utviklet en protokoll for identifisering av muggsopp. I denne studien ble muggsoppen dyrket i buljong som gjør at sporer produseres på et senere tidspunkt. Etersom sporer er hydrofobe kreves det en forbehandling med for eksempel etanol som kan påvirke IR-spektrene (Shapaval et al. 2010). Et mycel har mer spesifikke og komplekse biokjemiske sammensetninger enn sporer, som gjør at det er egnet til en FT-IR analyse (Lecellier et al. 2014).

Identifisering av muggsopp med FT-IR ble utført i en studie av Lecellier et al. (2014) som viste at 98,97 % ble klassifisert korrekt på slektsnivå, og 98,77 % ble klassifisert korrekt på artsnivå. I en annen senere studie utført av Lecellier et al. (2015) ble det benyttet en database med 288 stammer for å identifisere 105 forskjellige arter. Studien viste at 99,7 % ble korrekt klassifisert på slektsnivå, mens 92,3 % ble riktig klassifisert på artsnivå. I samme studie ble det også utført en blindtest der 101 av 105 stammer ble klassifisert riktig (Lecellier et al. 2015). Lecellier et al. (2015) antydte også at FT-IR ikke er å betrakte som et alternativ til eksisterende metoder, men kan benyttes som et supplement for å identifisere muggsopp i en tidlig fase.

For FT-IR analysen kreves det et bibliotek med referansespekter av de muggsoppene man vil identifisere. Utfordringen ved bruk av et slikt bibliotek er hvis arten ikke finnes i biblioteket, vil den bli tilskrevet en art som ligger nærmest og dermed vil det bli gitt feil identifikasjon (Lecellier et al. 2015). For å analysere og klassifisere muggsopp med FT-IR benyttes det forskjellige statistiske metoder som for eksempel «Partial Least Squares Diskriminant Analyse» (PLS-DA) (Lecellier et al. 2015), «Hierarchical Cluster Analysis» (HCA) eller «Principle Component Analysis» (PCA) (Mariey et al. 2001).

## 1.11 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectroscopy, MALDI-TOF MS

«Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectroscopy» (MALDI-TOF) er en annen metode for identifisering av mikroorganismer. På samme måte som FT-IR kan også MALDI-TOF gi unike fingeravtrykk (Carbonnelle et al. 2011).

MALDI-TOF fungerer på den måten at prøvene blir bestrålt med en laser. Matrixen som blir tilsatt prøven ekstraherer ut proteinene fra mikroorganismene, og når laseren treffer prøven frigjør den intakte og ladede proteiner og peptider. Ettersom forskjellige proteiner og peptider har ulik masse, vil ionene treffe detektoren til ulik tid (Bruker 2014). Det vil genereres et spektrum for hver mikroorganisme som samsvarer med et referansespektrum, og gir identifikasjon av mikroorganismen (Panda et al. 2015).

Valg av riktig matrix er avgjørende for identifikasjon av muggsopp. Korrekt bruk av disse vil føre til optimalt signal og mindre støy på prøven. De to mest brukte er 2,5-dihydroksybenzoacid (DHB) og  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamicacid (CHCA) (Lima & Santos 2017).

## 1.12 Identifisering av muggsopp med MALDI-TOF

I den senere tid har det også vist seg at MALDI-TOF er en god metode for identifisering av muggsopp som *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* og ulike gjærtyper (Chalupova et al. 2014). Metoden har vært mest benyttet til identifisering av bakterier i klinisk sammenheng (Del Chierico et al. 2012; Rizzato et al. 2015). Metoden krever ingen forbehandling av prøvene (Carbonnelle et al. 2011).

I studien til Chen og Chen (2005) ble det identifisert sporer av *Penicillium* arter direkte ved bruk av MALDI-TOF. Blant disse ble *P. chrysogenum* og *P. expansum* identifisert, som er vanlig i luft. Artene ble også identifisert med denne metoden i studien til Singhal et al. (2015).

Identifisering og klassifisering av kvalitetsødeleggende sopp krever en god database, for eksempel BioTyper™ (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Tyskland). Ribosomale proteiner blir som oftest brukt som referanse molekyler for å sammenligne med ukjente proteiner i organismen. Det er begrensninger for deknningen av taksonomien i kommersielle databaser til MALDI-TOF. Databaser for muggsopp er mindre veletablerte og omfattende enn for bakterier (Lima & Santos 2017).

Ved bruk av MALDI-TOF til identifisering av muggsopp har det blitt observert variasjon innenfor hver art og også mellom replikater av samme isolat. For å gjøre databasen robust må det inkluderes et større antall isolater av samme art. Selv om MALDI-TOF er lovende gjenstår det fortsatt arbeid for å klargjøre metoden til rutineidentifikasjon (Visagie et al. 2014).

### 1.13 Bakgrunn for studiene

Som tidligere nevnt i oppgaven er muggsopp ansett som den viktigste årsaken til kvalitetsødeleggelse av spekemat (Asefa et al. 2010). De vanligste muggslektene i spekematindustrien er *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* og ulike gjærsopp (Veterinærinstituttet.no 2015).

Målene med denne studien er å undersøke hvor følsomme metodene «Fourier transform infrared spectroscopy» (FT-IR) og «Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectroscopy» (MALDI-TOF MS) er for identifisering av problemmugg fra spekematindustrien. Det vil i denne oppgaven være fokus på *Penicillium*-arter og ødeleggelsen den gjør på spekemat med hovedfokus på pinnekjøtt. Ulike vekstbetingelser som frysing, innhold av salt (NaCl) og ulik fuktighet for artene *P. solitum*, *P. nordicum* og *P. chrysogenum* er også undersøkt i denne oppgaven for å kunne gi råd om mulig tiltak for å redusere veksten av muggsopp.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Muggsoppisolater

Muggsoppisolater benyttet i denne studien er vist i Tabell 3. Det er benyttet 31 isolater fra *Aspergillus* spp. og 111 isolater fra *Penicillium* spp. (Vedlegg 6.1). Isolatene ble hovedsakelig isolert fra to produksjonssteder i 2015 og 2016, i tillegg ble noen isolater fra mykologikartoteket på Veterinærinstituttet (VI) benyttet. Isolatene var på forhånd identifisert med tradisjonell metode og/eller sekvensert ( $\beta$ -tubulin og ITS) av Veterinærinstituttet.

Tabell 3. Oversikt over isolater, opprinnelse og forsøk de er benyttet i.

Art	Antall isolat per art	Kilde	Opprinnelse	Forsøk
<i>Penicillium solitum</i>	25	Fra anlegg A (2015 og 2016) og B (2015 og 2016)	Luft, skjærevfall og spekeskinke	FT-IR, MALDI-TOF MS og vekstforsøk
<i>Penicillium chrysogenum</i>	12	Fra anlegg A (2015 og 2016), B (2015 og 2016), C (2006) og VI (2007, 2014)	Luft, pinnekjøtt, spekeskinke, ventilasjon, klimasone	FT-IR, MALDI-TOF MS og vekstforsøk
<i>Penicillium nordicum</i>	17	Fra anlegg A (2015), B (2015 og 2016), C (2007) og VI (2014)	Luft, spekeemat, pinnekjøtt, vifte, vegg	FT-IR, MALDI-TOF MS og vekstforsøk
<i>Penicillium brevicompactum</i>	18	Fra anlegg A (2015 og 2016) og B (2015 og 2016)	Luft, pinnekjøtt	FT-IR
<i>Penicillium olsonii</i>	6	Fra mykologikartoteket (2006, 2011, 2015) og anlegg A (2016)	Luft, spekeskinke	FT-IR
<i>Penicillium commune</i>	7	Fra mykologikartoteket (2005, 2007, 2015), anlegg A (2016) og B (2016)	Luft, spekeskinke, pinnekjøtt	FT-IR
<i>Penicillium corylophilum</i>	7	Fra mykologikartoteket (2007, 2014, 2015) og anlegg A (2016)	Luft, spekeemat, salami	FT-IR
<i>Penicillium crustosum</i>	6	Fra mykologikartoteket (2006, 2014, 2015) og anlegg A (2016)	Luft, spekeskinke	FT-IR
<i>Penicillium expansum</i>	6	Fra mykologikartoteket (2005, 2007, 2015) og anlegg A (2016)	Luft, spekeskinke, spekeemat	FT-IR
<i>Penicillium decumbens</i>	7	Fra mykologikartoteket (2014, 2015, 2016) og anlegg A (2016)	Luft, støv, vegg	FT-IR
<i>Aspergillus</i> spp.	31	Fra anlegg A (2015 og 2016) og B (2015 og 2016)	Luft, vegg, gulv, røykespon, tarmer, pinnekjøtt	FT-IR og MALDI-TOF MS

## 2.2 Oppbevaring av muggsoppisolater

Rene muggsoppisolater ble dyrket på Malt Extract Agar (MEA, Oxoid, Basingstoke, England) skåler i fem dager ved 25 °C. Agar med muggsopp ble så skjært ut med en skalpell og overført til cryorør (VWR, Canada) med 1 ml 85 % glyserol (Merck, Darmstadt, Tyskland). Isolatene ble lagret ved -20 °C frem til forsøk.

Alt arbeid har foregått med sterilteknikk og i sterilbenk.

## 2.3 Medier

Alle medier ble tillaget etter oppskrift (Vedlegg 6.2). Mediene ble laget etter behov, og ble oppbevart innpakket ved 4 °C inntil bruk.

## 2.4 FT-IR

For FT-IR-analysen i dette forsøket ble det benyttet en protokoll «Moulds industrial FUST protocol» som er beskrevet i artiklene til Shapaval et al. (2010) og Shapaval et al. (2013).

For hvert isolat ble det gjort tre gjentak på tre ulike dager. Isolatene fra 2016-året hadde ett gjentak. FT-IR analysen ble utført på Nofima, Ås.

### 2.4.1 Dyrking av mycel

Før hvert forsøk ble 1 µl prøvemateriale fra cryorørene overført til tre punker på Yeast Extract Agar (YE, Oxoid). Skålene ble deretter inkubert i tre døgn ved 25 °C.

Det ble fylt 800 µl Malt Extract Broth, (MEB, Fluka, Sigma-aldrich, India) i «high-throughput» 96 brønns mikrotiterplater type CR1496 (EnzyScreen.com u.å.). Deretter ble det fra hver koloni på YE-skålene tatt ca. 1 µl av mycelet og overført til brønner i mikrotiterplaten. Det ble unngått å ta med sporer. For hvert forsøk ble det brukt to mikrotiterplater og totalt seks replikater per isolat. For negativ kontroll ble noen brønner ikke inokulert.

Platene ble dekket med et universal lokk type CR1396 (EnzyScreen.com u.å.). Mikrotiterplatene ble festet til en risteinkubator (Innova 40R, New Brunswick Scientific, Edison, New jersey,

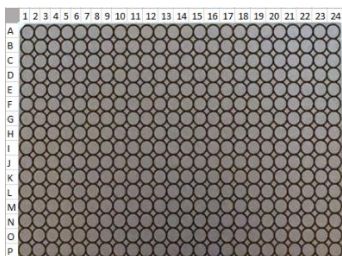
USA) med et festesystem CR1801 (Enzyscreen.com u.å.) og inkubert  $48 \pm 2$  timer ved  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ved 180 o/min.

#### 2.4.2 Preparering av prøvematerialet

Platene ble sentrifugert 20 min. på 4000 o/min. (Centrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) og overskuddsmedium ble fjernet. 800  $\mu\text{l}$  destillert og autoklavert  $\text{H}_2\text{O}$  ble tilsatt og vaskeprosedyren ble gjentatt tre ganger. For å homogenisere mycelet ble det tilsatt 60  $\mu\text{l}$  med  $\text{H}_2\text{O}$  etter tredje vask. Der det ikke var mulig å fjerne all overskuddsvæske ble det etterlatt ca. 60  $\mu\text{l}$  væske fra siste vasking. Prøvene ble sonikert med en «tip-sonikator» (Qsonica Q55, USA) i 10-20 sek. med en effekt på 50 %.

Fra hver brønn i platene ble det overført 8  $\mu\text{l}$  homogen celleduspensjon til en «IR-light-transparent silicon» 384 - mikrotiterplate (Bruker Optik, GmbH, Tyskland), Figur6.

Det ble benyttet annenhver rekke og rad på IR-platen, som B2, D2, B4, D4 osv. Ytterste rad og kolonne ble ikke benyttet. Prøvene ble tørket over natt i romtemperatur før FT-IR analysen. Platene ble vasket mellom hvert forsøk med 0,5 % «sodium dodecyl sulfat» (SDS) (Bio-Rad, Hercules, USA) og isopropanol.



Figur6. «IR-light-transparent Silicon» 384-mikrotiterplate (Bruker Optik GmbH, Tyskland) benyttet til FT-IR analysene.

FT-IR målingene ble utført ved bruk av en «High Throughput Screening eXTension» (HTS-XT) enhet koplet til en Tensor 27 spektrometer (begge Bruker Optik GmbH, Tyskland).

#### 2.4.3 Dataanalyse

Programvaren Opus 6 ble benyttet. Spektrene ble tatt opp i en region mellom 4000 og  $500\text{ cm}^{-1}$  med en spektral oppløsning av  $6\text{ cm}^{-1}$  og en blenderåpning av 5,0 mm. For hvert spektrum ble 64 skanninger utført. Mellom hvert spektrum ble det tatt en referansemåling av en ren brønn på mikrotiterplaten.



## 2.4.4 Statistikk

Statistikken ble utført ved Nofima av Kristian Hovde Liland, og utførelsen er gjengitt under.

Det ble først utført en forbehandling av spektrene ved hjelp Savitzky-Golay-filtrering. Forbehandlingen bestod av en modellbasert korleksjon av grunnlinje og intensitetsforskjeller ved «Extended Multiplicativ Signal Correction», videre ble ikke-informative områder fjernet, som vil si at regionene mellom 3000-2800 og 1800-800 ble beholdt.

Videre ble det beregnet kvadratavvik mellom gjennomsnittsspektrum og alle enkeltspektre, og alle verdier høyere enn 0,001 ble fjernet. Dette er hovedsakelig spektre som har så svakt signal at de blir veldig «rare» etter forbehandling. Det måtte være minst tre replikater av minst to gjentak for å være med i klassifiseringen.

Selve klassifikasjonen er utført med HotPLS-metoden, beskrevet i artikkelen til Liland et al. (2014). Metoden tar utgangspunkt i et fylogenetisk tre og lager en klassifikasjonsmodell hver gang treet deler seg fra toppen og nedover. Den er delt inn i divisjon, klasse, orden, familie, slekt, under-slekt, seksjon og art, Tabell 4. Det fylogenetiske treet er videreutviklet fra artikkelen til Liland et al. (2014).

Tabell 4: Fylogenetisk tre benyttet til klassifikasjon av isolater for FT-IR analysen.

Divisjon	Klasse	Orden	Familie	Slekt	Under-slekt	Seksjon	Art	
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Circundati</i>	<i>Nigri</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
						<i>Flavi</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	
					<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
					<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium chevalerii</i>	<i>Eurotium chevalerii</i>
							<i>Eurotium herbariorum</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>
							<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>
				<i>Penicillium</i>			<i>Penicillioides</i>	<i>Coronata</i>
				<i>Penicillium olsonii</i>				
				<i>Roquesforti</i>	<i>Penicillium roquesforti</i>			
				<i>Exilicaulis</i>	<i>Penicillium decumbens</i>			
					<i>Penicillium corylophilus</i>			
				<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium expansum</i>			
				<i>Chrysogena</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>			
				<i>Viridicata</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>			
	<i>Penicillium nordicum</i>							
	<i>Penicillium commune</i>							
	<i>Paecilomyces</i>	-	-	<i>Penicillium solitum</i>				
	<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	<i>Paecilomyces crustosum</i>				
	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	-	-	<i>Paecilomyces variotii</i>				
	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	-	-	<i>Fusarium langsethiae</i>	
<i>Fusarium garminearum</i>								
Hypocreaceae		<i>Acremonium</i>	-	-	<i>Acremonium hyalinum</i>			
<i>Acremonium</i>		-	-	<i>Acremonium</i>				
Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	-	-	<i>Alternaria alternata</i>		
		Incertae sedis	<i>Phoma</i>	-	-	<i>Phoma glomerata</i>		
	Dothideales	Dothioraceae	<i>Aureobasidium</i>	-	-	<i>Aureobasidium</i>		
Saccharomycetes	Saccharomycetales	Endomycetaceae	<i>Geotrichum</i>	-	-	<i>Geotrichum candidum</i>		
		Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	-	-	<i>Cladosporium</i>	
	Zygomycota	Mucomycotina	Mucorales	Mucoraceae	<i>Mucor</i>	-	-	<i>Mucor hiemalis</i>
<i>Mucor plumbeus</i>								
<i>Mucor circinelloides</i>								
<i>Rhizopus</i>	-	-	<i>Rhizopus</i>	-	-	<i>Rhizopus oryzae</i>		

## 2.5 MALDI-TOF MS

For MALDI-TOF MS ble det benyttet en prosedyre fra Veterinærinstituttet, denne er ikke kommersiell tilgjengelig og er beskrevet under.

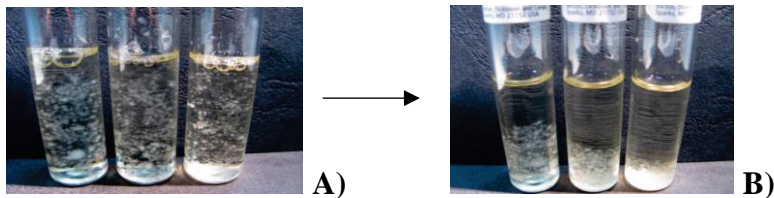
Analysen ble utført på Veterinærinstituttet. Det ble utført et gjentak på isolatene.

### 2.5.1 Dyrking av mycel

Isolatene ble dyrket på MEA skåler i fem døgn ved 25 °C. Deretter ble de inokulert i 5 ml rør (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) med Sabouraud Dextrose buljong (SDB, Medieproduksjonen VI). Det ble benyttet parafilm (Bemis, USA) rundt rørene.

Eppendorf-rørene ble dyrket i  $48 \pm 1$  time i en rotator (Heidolf, Type Reax 2, Tyskland), med hastighet 1 ved temperatur  $20 \pm 3$  °C.

Etter dyrking stod rørene i minst 10 min. til muggsoppen sedimenterte i bunnen av røret, Figur 7.



Figur 7: Muggsoppsedimentering i flytende medium. A, Før sedimentering - B, etter sedimentering (ca. 10 minutter) (Bruker 2013).

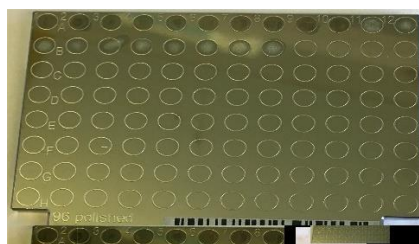
### 2.5.2 Preparering av prøvematerialet

Sabouraud Dextrose buljong ble pipettert fra rørene og prøvematerialet ble overført til nye 2 ml rør (Eppendorf). Rørene ble sentrifugert (Eppendorf, Centrifuge 5415R, Hamburg, Tyskland) ved 13,200 o/min. i to minutter, og resten av væsken ble fjernet. Det ble unngått å ta med mørke sporer. Rørene ble tilsatt 1,5 ml milliQ-vann, blandet på en vortexer (VWR, USA) i ett minutt og sentrifugert to minutter på 13,200 o/min. Så mye som mulig av væsken ble fjernet, og prosessen ble gjentatt til prøvematerialet og overskuddsvæsken hadde en klar farge.

Deretter ble 300  $\mu$ l sigmavann (LC-MS Chromasolv®, Honeywell, Sigma-Aldrich) og 900  $\mu$ l 96 % etanol tilsatt. Rørene ble blandet og sentrifugert to minutter på 13,200 o/min. Deretter ble overskuddsvæsken fjernet. Rørene ble satt i varmeblokk (Eppendorf thermomixer comfort, Hamburg, Tyskland) ved 37 °C i ½ - 1 time. Prøvematerialet ble dekket med 20-60  $\mu$ l 70 % maursyre (Sigma-Aldrich) avhengig av størrelsen på pelleten, og satt på benken i to minutter. Acetonitril (LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich) ble tilsatt i samme mengde og blandet forsiktig. Til slutt ble rørene sentrifugert i to minutter på 13,200 o/min.

### 2.5.3 Dataanalyse

Supernatanten (1 $\mu$ l) ble overført til en sirkel på en 96 brønns-polert stålplate, Figur 8 (Bruker Daltonik GmbH, Tyskland). Etter at prøvematerialet hadde tørket ble 1  $\mu$ l matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamicacid, CHCA, Bruker) tilsatt, og plata ble analysert innen en time etter at matrixen hadde tørket. Programvaren MALDI biotyper software (Bruker) ble benyttet.



Figur 8: Pipettering av supernatant (1  $\mu$ l) på en 96-brønns stålplate. Bilde: eget

Platen er gjenbrukbar og ble vasket med 70 % etanol, 99 % «trifluoroacetic acid» (TFA, ReagentPlus®, Sigma-Aldrich) og isopropanol.

## 2.6 Vekstforsøk

Tre forskjellige parametere ble undersøkt i vekstforsøkene: seks forskjellige NaCl-konsentrasjoner (8,5-11 %), frysing med ulike innfrysningstidspunkt og -varighet og ulik fuktighet.

Det ble utført et innledende forsøk med salt og frysing med to gjentak, som ble utført på Nofima, Ås. Hovedforsøket ble utført med tre gjentak, og utført på Veterinærinstituttet, Adamstuen. For fuktighet ble det utført et forforsøk og ett forsøk med isolater. Alle forsøkene hadde tre paralleller av isolatene i hvert gjentak. For fryseforsøket ble det målt radius av koloniene på bildene i etterkant av forsøket.

### 2.6.1 Muggsoppisolater

Det ble benyttet to isolater av *P. solitum*, to isolater av *P. chrysogenum* og to isolater av *P. nordicum* i vekstforsøkene, Tabell 5. Før hvert forsøk ble isolatene dyrket på MEA (Oxoid) i tre døgn ved 25 °C.

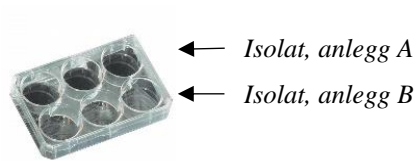
Tabell 5. Isolatene benyttet i vekstforsøkene, som er fra to forskjellige anlegg, A og B, samt fra mykologikartoteket på VI.

Art	Kilde	Opprinnelse	Sted i produksjonen	Nummer på isolat
<i>Penicillium solitum</i>	Anlegg A (2015)	Luft	Røykerom	8-12
<i>Penicillium solitum</i>	Anlegg B (2015)	Luft	Klimarom	8-64
<i>Penicillium nordicum</i>	Mykologikartoteket VI (2014)	-	Pinnekjøtt	6-1-2
<i>Penicillium nordicum</i>	Anlegg B (2015)	Luft	Kjølerom	8-74
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Anlegg A (2015)	Luft	Modningsrom	8-41
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Anlegg B (2015)	Luft	Varemottak	9-36

### 2.6.2 Innledende forsøk med salt (NaCl)

Seks brønners plater (Nunc, Thermo Scientific, Roskilde, Danmark), Figur 9, ble laget med 8 ± 0,5 ml MEA med de ønskede saltkonsentrasjonene (8,5 – 9 – 9,5 – 10 – 10,5 – 11 % NaCl (Merck)). Som kontroll ble det benyttet MEA uten tilsatt salt. Se Vedlegg 6.2 og 6.3 for tillaging og beregning av saltinnhold i MEA. Til vekstforsøkene ble det benyttet en annen MEA formulering enn benyttet til FT-IR og MALDI-TOF (Vedlegg 6.2). For hver saltkonsentrasjon ble det benyttet tre seks brønners plater. Plate 1 ble inokulert med *P. solitum* (isolat A=isolat

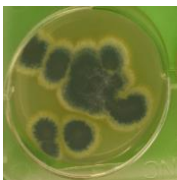
fra anlegg A, i brønner A1-A3, isolat B=isolat fra anlegg B, i brønner B1-B3), tilsvarende plate 2 med *P. nordicum* osv. Til sammen ble det 21 plater for ett gjentak. Mediet i hver brønn ble podet med en steril nål fra en koloni på MEA.



Figur 9: Seks brønners plate til inokulering av isolatene.

Platene ble inkubert åtte dager på 20 °C. Temperatur ble logget med en temperaturlogger Kooltrak (Celsius-Systems Ltd, London, England) med 30 minutters mellomrom og lest av med dataprogrammet Kooltrak Standard V1.14.23.

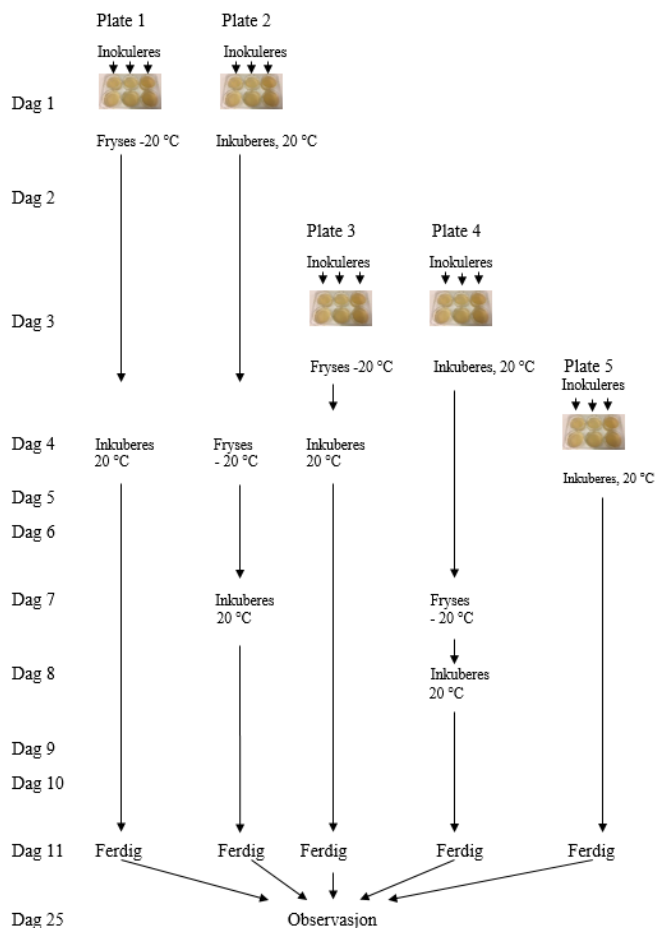
Diameter av en og en koloni ble målt på tvers med en linjal på baksiden av plata, og areal ble beregnet. Det ble samtidig tatt bilder av koloniene. Avlesningen ble utført på samme tid hver dag med 24 timers mellomrom. Ujevne kolonier og kolonier med mye «strøvekst» som vist i Figur 10 ble utelatt. På første gjentak ble det målt fra dag tre mens det ble målt fra dag to på andre gjentak. For alle isolatene ble det ikke utført målinger på dag fem på andre gjentak.



Figur 10. *Penicillium solitum* med mye strøvekst. Ble vanskelig å måle og ble utelatt.

### 2.6.3 Innledende forsøk med frysing

Det ble undersøkt effekten av frysing i ett og tre døgn. Platene ble enten fryst rett etter inokulering eller etter tre døgn med inkubasjon på 20 °C (Figur 11). Alle platene hadde til sammen syv dager på 20 °C hver. Fryseforsøket ble inokulert på samme måte som i saltforsøket og ble temperaturlogget (Kooltrack) med 30 minutters mellomrom.



Figur 11. Fryseforsøket med fire ulike innfrysningmønstre. Plate 1 og 2 med tre døgn frysing er fryst i begynnelsen av prosessen og midt i prosessen. Plate 3 og 4 med ett døgn innfrysning er fryst i starten av prosessen og midt i prosessen. Plate 5 er kontroll. Alle platene hadde like mange døgn ved 20 °C.

### 2.7 Hovedforsøk vekst med salt (NaCl) og frysing

Ble utført på samme måte som det innledende forsøket med unntak av inokuleringen. For å redusere strøvekst ble det overført en "loop" av kolonien med 1 µl podøse (Nunc, Thermo Scientific) og blandet i 10 % glyserol i 2 ml rør (Nalgene, Sigma-Aldrich). Rørene ble vortexet (VWR) i ti sekunder før 1µl prøvematerialet ble pipettert på platene.

### 2.7.1 Statistikk salt (NaCl)

Statistikken for hovedforsøket for salt ble utført av Kristian Hovde Liland med programmet R versjon 3.3.3. Arealet av muggsoppene ble gjort om til prosentvis reduksjon i areal i forhold til kontrollprøvene. En regresjon for muggvekst ble tilpasset med forklaringsvariablene tid, saltkonsentrasjon og isolat. Signifikansnivå på 5 % ble benyttet ( $p < 0,05$ ).

## 2.8 Fuktighet og temperatur

Det ble utført to innledende forsøk for fuktighet og temperatur. Først ble det utført en test uten isolater. Det ble benyttet 3,5 l bokser med klips og gummikant (Sistema, New Zealand). For å oppnå en ønsket fuktighet ble det brukt mettede løsninger av saltene kaliumklorid, CAS: 546-89-4 (Merck) og litiumacetat, CAS: 7447-40-7 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland), som henholdsvis skal gi 85 % relativ fuktighet og 70 % relativ fuktighet. Forsøk med ulik temperatur og fuktighet har tidligere blitt utført i studier av Moretro et al. (2010) og Kim et al. (2008).

Deretter ble det utført et forsøk med isolater. Det ble benyttet samme metode for inokulering som i hovedforsøket. De mettede løsningene ble fylt i et 100 ml kar (VWR, Mexico) og plassert i hver sin boks. En boks uten løsning ble brukt som kontroll. Deretter ble tre plater (en plate for hver art med to isolater på platene) plassert i boksen. Mellom lokket og underdelen på platene ble det brukt formbar gummi (tack-it, Faber-Castell) for å sikre ønsket fuktighet. Det ble benyttet fuktighets- og temperatur- loggere, type SL54TH-A (Signatrol Ltd, Twekesbury, Gloucestershire, England), og programvaren Tempit, versjon 4.1.45 (Singatrol Ltd) for avlesning.

## 3 Resultater

### 3.1 FT-IR

Til FT-IR analysen ble det benyttet 11 arter isolert fra spekematindustrien. Artene var fra produksjonsanleggene i 2015 og fra mykologikartoteket på Veterinærinstituttet. Klassifiseringen av muggsopp med FT-IR metoden viste 92,2 - 100 % samsvar mellom FT-IR og tidligere identifisering med tradisjonell metode og/eller sekvensering ( $\beta$ -tubulin og ITS), Tabell 6.

Tabell 6. Prosentandel samsvar mellom FT-IR-metoden og tradisjonell metode og/eller sekvensering.

Klassifiseringsnivå	Andel (%) samsvar mellom FT-IR-metoden og tradisjonell metode og/eller sekvensering*
Divisjon	100
Klasse	100
Slekt	99,5
Seksjon	94,9
Art	92,2

\*  $\beta$ -tubulin og ITS

Til klassifiseringen med FT-IR ble det benyttet 101 isolater (Vedlegg 6.1) av muggsopp tilhørende *Aspergillus* spp. og *Penicillium* spp. Resultatene for muggsopp isolatene klassifisert med FT-IR og med tradisjonell metode og/eller sekvensering er vist i Tabell 7.

Venstre kolonne i Tabell 7 viser den tradisjonelle identifiseringen av muggsopp isolatene. FT-IR klassifiseringen er vist i de høyre kolonnene. Diagonalen i tabellen viser antall prøver der klassifiseringen med FT-IR samsvarer med tradisjonell klassifisering. De fargede rubrikkene er muggsopp isolater innenfor samme seksjon. Prøver på venstre eller høyre side for diagonalen har fått ulik identifisering/klassifisering for de to metodene.

Totalt ble 288 prøver av problemmuggen *P. solitum* (n=15) analysert med FT-IR metoden. Av disse 288 prøvene ble 277 klassifisert som *P. solitum*. Tre av de 288 *P. solitum* isolatene ble klassifisert som *P. nordicum*, en som *P. crustosum*, en som *P. brevicompactum* og seks som *P. chrysogenum*. Tilsvarende ble det for *P. nordicum* (n=10) analysert totalt 71 prøver, av disse ble 55 klassifisert som *P. nordicum* med FT-IR metoden. 11 av de 71 *P. nordicum* isolatene ble klassifisert som *P. commune*, en som *P. olsonii*, en som *P. brevicompactum* og tre som *P. chrysogenum*.



Tabell 7. Muggsopp isolater klassifisert med FT-IR metoden og identifisert med tradisjonell metode og/eller sekvensering. Isolatene benyttet er fra mykologikartoteket på Veterinærinstituttet og fra anleggene i 2015. Tabellen viser muggsopp isolater identifisert med tradisjonell metode (og sekvensering) i kolonnen lengst til venstre og kolonnene til høyre viser hvilke arter de ble klassifisert som med FT-IR metoden. De fargede rubrikkene er arter innenfor samme seksjon. Prøver på venstre eller høyre side for diagonalen har fått ulik identifisering/klassifisering for de to metodene.

		Klassifisert med FT-IR												
		Antall isolat	Antall prøver	<i>Asp</i>	<i>P. chr</i>	<i>P. bre</i>	<i>P. ols</i>	<i>P. cory</i>	<i>P. dec</i>	<i>P. exp</i>	<i>P. com</i>	<i>P. cru</i>	<i>P. nor</i>	<i>P. sol</i>
Identifisert med tradisjonell metode o.a.	<i>Aspergillus spp.</i>	(n=25)	205	199	2	0	0	1	0	0	0	3	0	0
	<i>P. chrysogenum</i>	(n=10)	163	1	160	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	<i>P. brevicompactum</i>	(n=10)	168	0	0	150	12	0	0	0	1	0	1	4
	<i>P. olsonii</i>	(n=5)	85	0	0	11	65	0	0	1	6	2	0	0
	<i>P. corylophilum</i>	(n=5)	116	0	0	0	0	115	0	0	1	0	0	0
	<i>P. decumbens</i>	(n=6)	119	0	0	0	0	0	119	0	0	0	0	0
	<i>P. expansum</i>	(n=5)	113	0	0	0	0	0	0	90	22	1	0	0
	<i>P. commune</i>	(n=5)	85	0	0	0	3	0	0	1	80	1	0	0
	<i>P. crustosum</i>	(n=5)	120	0	0	1	0	6	0	8	0	104	0	1
	<i>P. nordicum</i>	(n=10)	71	0	3	1	1	0	0	0	11	0	55	0
	<i>P. solitum</i>	(n=15)	288	0	6	1	0	0	0	0	0	1	3	277

### 3.2 Isolater fra 2016

Muggsopp isolatene (n=44) (Vedlegg 6.1) fra 2016 ble analysert med FT-IR metoden, Tabell 8. Disse var «ukjente» for systemet, men artene var kjente. Klassifiseringen med FT-IR metoden viste 88,3 % samsvar på seksjon og 62,2 % samsvar på art mellom FT-IR metoden og tidligere identifisering med tradisjonell metode og/eller sekvensering ( $\beta$ -tubulin og ITS).

Det ble totalt analysert 59 prøver av *P. solitum*. Av de 59 prøvene ble 48 klassifisert som *P. solitum* med FT-IR metoden, men 11 ble klassifisert som *P. nordicum*. De fleste som ikke samsvarte mellom metodene ligger innenfor samme seksjonsnivå.

Tabell 8. Muggsopp isolater fra 2016 identifisert med tradisjonell metode og klassifisert med FT-IR metoden. Tabellen viser muggsopp isolater identifisert med tradisjonell metode (og sekvensering) i kolonnen lengst til venstre og kolonnene til høyre viser hvilke arter de ble klassifisert som med FT-IR metoden.

Identifisert med tradisjonell metode o.a.	Antall isolat	Antall prøver	Klassifisert med FT-IR											
			Asp	<i>P. chr</i>	<i>P. bre</i>	<i>P. ols</i>	<i>P. cory</i>	<i>P. dec</i>	<i>P. exp</i>	<i>P. com</i>	<i>P. cru</i>	<i>P. nor</i>	<i>P. sol</i>	
<i>Aspergillus spp.</i>	(n=6)	18	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. chrysogenum</i>	(n=2)	11	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. brevicompactum</i>	(n=8)	43	0	0	16	17	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>P. olsonii</i>	(n=5)	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>P. corylophilum</i>	(n=2)	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. decumbens</i>	(n=1)	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
<i>P. expansum</i>	(n=1)	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
<i>P. commune</i>	(n=2)	7	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
<i>P. crustosum</i>	(n=1)	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
<i>P. nordicum</i>	(n=6)	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0
<i>P. solitum</i>	(n=10)	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	48	0

### 3.3 MALDI-TOF MS

Til analysen med MALDI-TOF ble det benyttet 59 muggsopp isolater, Tabell 9 (Vedlegg 6.1). Resultatene viste at 36 isolater ble klassifisert med høy grad av sikkerhet med MALDI-TOF. Ni av disse samsvarte med identifiseringen med tradisjonell metode og/eller sekvensering (hele raden er grønn). *Penicillium nordicum* og *P. solitum* ble analysert selv om de ikke eksisterte i databasen, men ble likevel til dels identifisert med høy grad av sikkerhet som en annen art.

Tabell 9. Muggsopp isolater identifisert med tradisjonell metode og/eller sekvensering og identifisert med MALDI-TOF. Området for poengverdi: 2,00-3,00 = høy grad av sikker identifikasjon (grønn). 1,70-1,99 = lav grad av sikker identifikasjon (gul). 0,00-1,69 = Ingen identifikasjon mulig (rød) (Bruker 2014).

Prøvenummer*	Identifisert med tradisjonelle metode og/eller sekvensering	Identifisert med MALDI-TOF	Poengverdi MALDI-TOF
8-6	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. niger</i>	2.277
8-14	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. versicolor</i>	2.348
8-35	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. versicolor</i>	2.277
8-45	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	1.765
8-46	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. versicolor</i>	2.178
8-48	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Paecilomyces farinosus</i>	1.799
8-49	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. versicolor</i>	2.143
8-50	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	1.792
8-52	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	2.076
8-53	<i>Aspergillus</i> spp.	Ingen pålitelig identifikasjon	1.448
8-54	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	1.843
8-55	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	2.138
8-56	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	1.869
8-57	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	1.848
8-73	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. versicolor</i>	2.281
9-47	<i>Aspergillus</i> spp.	Ingen pålitelig identifikasjon	1.442
9-49	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. fumigatus</i>	2.519
9-50	<i>Aspergillus</i> spp.	Ingen pålitelig identifikasjon	1.214
9-51	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	2.338
9-52	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. glaucus</i>	1.832
9-53	<i>Aspergillus</i> spp.	Ingen pålitelig identifikasjon	<0
9-54	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. niger</i>	2.574
9-55	<i>Aspergillus</i> spp.	Ingen pålitelig identifikasjon	1.568
9-30	<i>Aspergillus</i> spp.	Ingen pålitelig identifikasjon	1.508
8-11	<i>P. chrysogenum/lanosum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.540
8-41	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.100
8-42	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.140
9-65	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.370
9-36	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.240
9-41	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	1.930
9-46	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.220
5-9-1	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.400
2-9-63	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.280
3-5-56	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	2.330

8-34	<i>P. nordicum</i>	Ingen pålitelig identifikasjon	1.690
8-60	<i>P. nordicum</i>	<i>P. commune/verrucosum</i>	2.480
8-72	<i>P. nordicum</i>	<i>P. commune/commune</i>	2.580
8-74	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum/commune</i>	2.490
8-76	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum/commune</i>	2.520
3-1-28	<i>P. nordicum</i>	<i>P. crustosum/expansum</i>	2.360
3-2-81	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum/commune</i>	2.610
6-1-2	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum/</i>	2.270
6-1-3	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum/commune</i>	2.400
6-1-7	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum</i>	2.050
8-1	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	1.823
8-2	<i>P. solitum</i>	<i>P. expansum</i>	2.184
8-12	<i>P. solitum</i>	<i>P. expansum</i>	1.964
8-38	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	1.752
8-63	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	1.808
8-64	<i>P. solitum</i>	<i>P. verrucosum</i>	2.135
8-65	<i>P. solitum</i>	Ingen pålitelig identifikasjon	1.657
8-66	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	2.356
8-67	<i>P. solitum</i>	Ingen pålitelig identifikasjon	<0
8-68	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	2.498
8-69	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	2.445
8-70	<i>P. solitum</i>	Ingen pålitelig identifikasjon	1.622
8-72	<i>P. solitum</i>	<i>P. expansum</i>	1.734
9-58	<i>P. solitum</i>	<i>P. roquefortii</i>	2.151
9-68	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	2.082

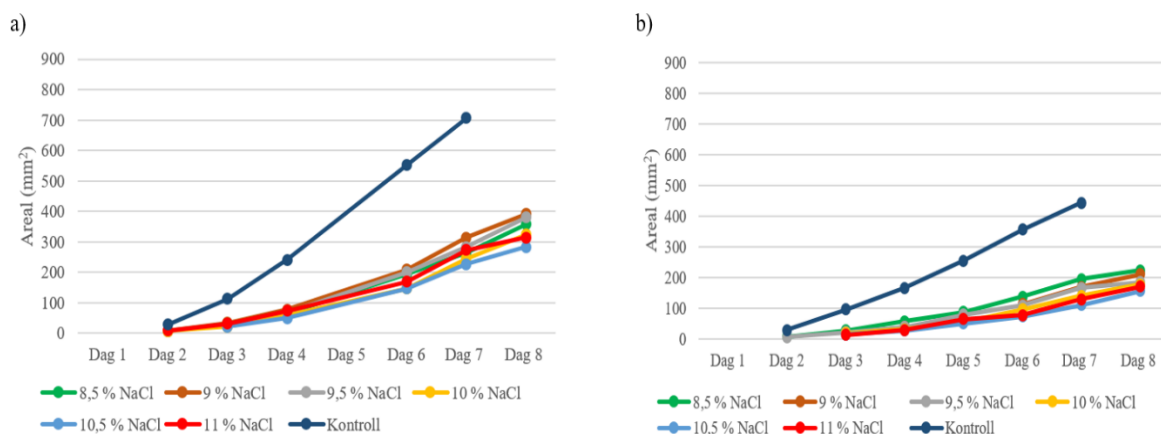
\*Identifiseringsnummer brukt av VI

### 3.4 Vekstforsøk - Effekt av ulike saltkonsentrasjoner (NaCl)

#### 3.4.1 Innledende forsøk

Veksten for *P. solitum*, *P. chrysogenum* og *P. nordicum* isolater ved ulike saltkonsentrasjoner ble målt over en tidsperiode. Grunnlaget for kurvene er et gjennomsnitt av to gjentak (Vedlegg 6.5). Temperaturloggingen viste  $20 \pm 2$  °C.

I Figur 12 er vekstkurvene for *P. solitum* isolatene vist. Resultatene viste at begge isolatene vokste best uten salt (kontroll). Det var liten forskjell på veksten mellom de ulike saltkonsentrasjonene, men høyere saltkonsentrasjon ga mindre vekst. På dag åtte var det vanskelig å få målt kontrollene, så disse dataene ble utelatt. Det ble kun utført ett gjentak for isolat a) grunnet kontaminasjon.

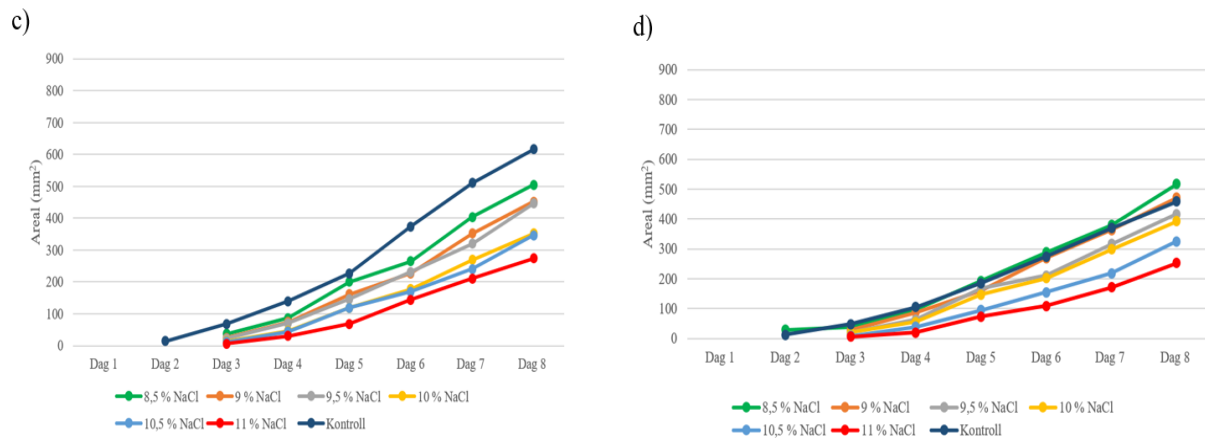


Figur 12. Vekstkurve for *P. solitum* isolatene a) 8-12 og b) 8-64 ved seks forskjellige saltkonsentrasjoner (8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 % og 11 % NaCl), og kontroll (uten NaCl). Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

For b) ble det observert synlig vekst på 9,5 og 8,5 % salt fra dag to, men ikke før dag tre for de andre saltkonsentrasjonene. Det ble observert en forskjell i vekst mellom isolatene. For isolat a) lå arealet på koloniene som vokste med salt mellom 280-400 mm<sup>2</sup> på dag åtte, og kontrollen 710 mm<sup>2</sup> på dag sju. For b) lå arealet på koloniene som vokste med salt mellom 120-250 mm<sup>2</sup> på dag åtte, og kontrollen på 450 mm<sup>2</sup>.

Resultatene for veksten av *P. nordicum* isolatene er vist i Figur 13. For begge isolatene var det mindre forskjell i vekst med og uten salt. Sammenlignet med *P. solitum* isolatene. 11 % NaCl

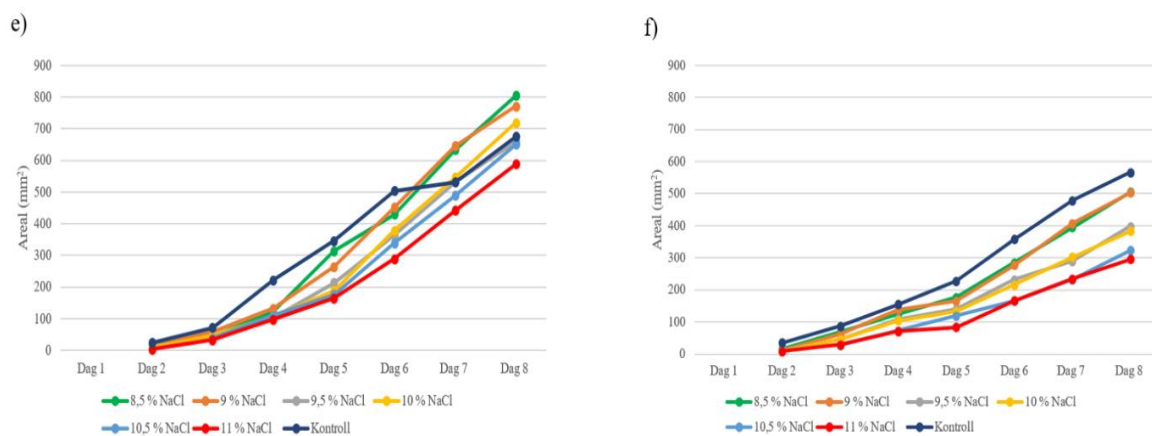
ga minst vekst for begge isolatene. Det ble også observert en forskjell i vekst mellom isolatene ut fra areal i området 380-610 mm<sup>2</sup> og 350-510 mm<sup>2</sup> for henholdsvis c) og d).



Figur 13. Vekstkurvene for *P. nordicum* isolat c) 6-1-2 og d) 8-74 ved seks ulike saltkonsentrasjoner (8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 % og 11 % NaCl), og kontroll (uten NaCl). Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

Isolat c) hadde synlig vekst på kontrollen fra dag to, og fra dag tre var det synlig vekst for isolatene på de andre saltkonsentrasjonene. For isolat d) var det synlig vekst på kontrollen og 8,5 % NaCl fra dag to, og fra dag tre var det synlig vekst for isolatet på de andre saltkonsentrasjonene. På dag åtte hadde ikke isolatet (d) best vekst på kontrollen.

I Figur 14 er vekstkurvene for *P. chrysogenum* isolatene vist. Resultatene viste liten forskjell i vekst med og uten salt. Isolat e) hadde bedre vekst enn isolat f). Etter dag seks hadde ikke isolat e) best vekst på kontrollen og på dag åtte hadde e) best vekst på 8,5, 9 og 10 % salt. Isolat e) hadde et areal på dag åtte i området mellom 590-810 mm<sup>2</sup> og f) hadde mellom 300-580 mm<sup>2</sup>.



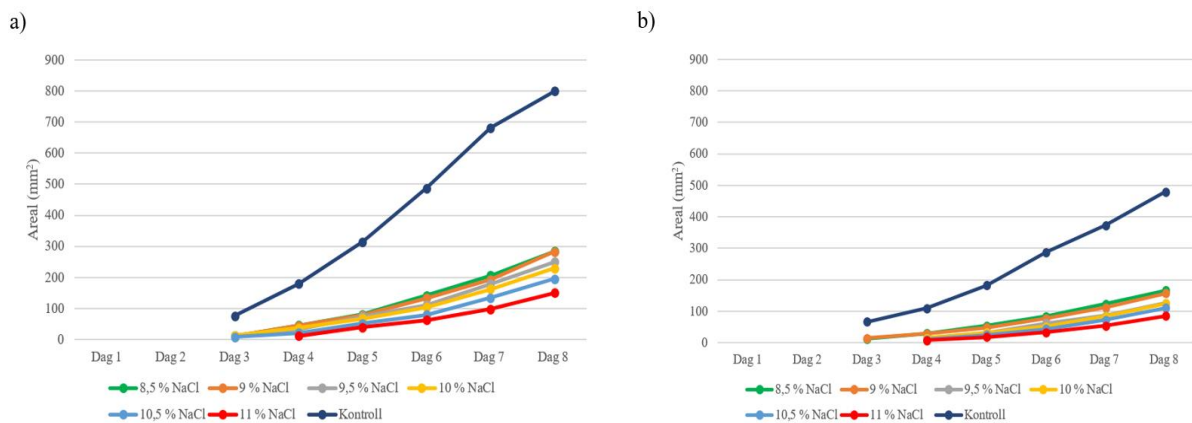
Figur 14. Vekstkurvene for *P. chrysogenum* isolat e) 9-36 og f) 8-41 ved seks ulike saltkonsentrasjoner (8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 % og 11 % NaCl), samt kontrollen (uten NaCl). Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

### 3.4.2 Hovedforsøk

Den statistiske analysen med hensyn til muggvekst viste at effekten av salt generelt minket med tiden. Veksten for de forskjellige isolatene ble hemmet i ulik grad for de valgte nivåene av salt og tid. Saltinnholdet reduserte arealet signifikant ( $p=0,05$ ) (Vedlegg 6.4), og artene ble påvirket ulikt av salt. Det var også forskjeller mellom isolater av samme art.

Vekstkurvene for isolatene i hovedforsøket viste den samme trenden som i de innledende forsøkene. Grunnlaget for kurvene er et beregnet gjennomsnitt av arealene med tre gjentak (Vedlegg 6.6). Temperaturloggingen viste  $20 \pm 2$  °C.

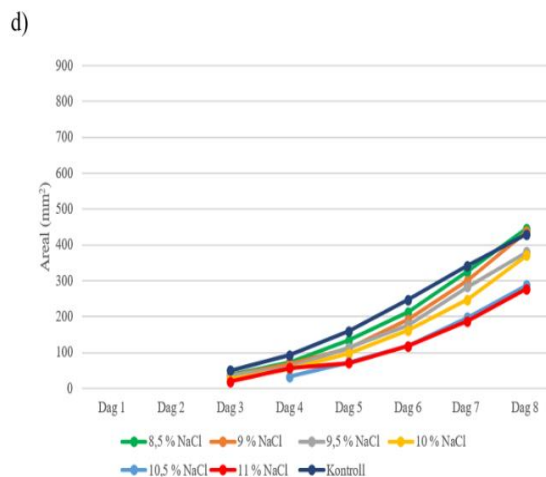
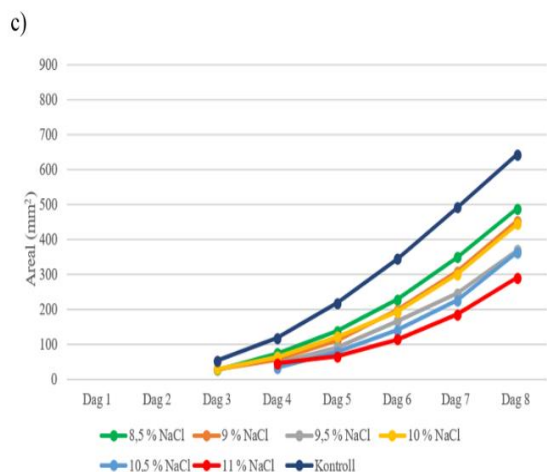
Vekstkurvene for *P. solitum* isolatene er vist i Figur 15. For isolat a) lå arealet for saltkonsentrasjonene mellom 130-300 mm<sup>2</sup> på dag åtte og kontrollen lå på 800 mm<sup>2</sup>. Isolat b) lå arealet for saltkonsentrasjonene mellom 90-180 mm<sup>2</sup> på dag åtte og kontrollen lå på 490 mm<sup>2</sup>.



Figur 15. Vekstkurvene for *P. solitum* isolatene a) 8-12 og b) 8-64 ved seks forskjellige saltkonsentrasjoner (8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 % og 11 % NaCl), og kontroll (uten NaCl). Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

For isolat a) var det ikke synlig vekst før dag fire på 11 % NaCl, men for de andre saltkonsentrasjonene var det synlig vekst fra dag tre. Isolat b) hadde ikke synlig vekst på saltkonsentrasjonene 9,5-10-10,5 og 11 % før dag fire, men det var synlig vekst på 8,5 og 9 % NaCl, og kontrollen fra dag tre.

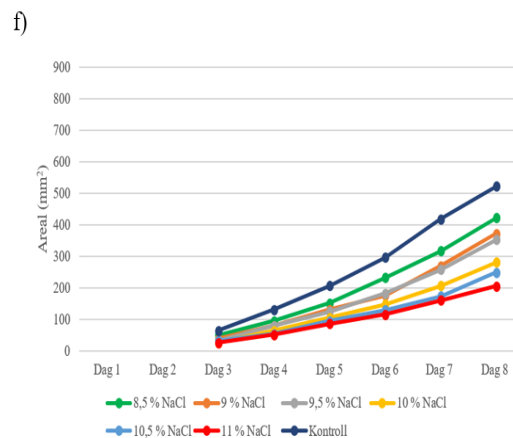
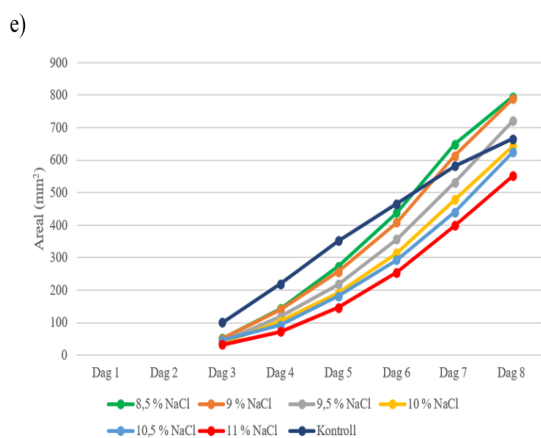
I Figur 16 er vekstkurvene for *P. nordicum* isolatene. Isolat c) viste noe forskjell i vekst mellom variantene med og uten salt. Arealet for saltkonsentrasjonene lå i området mellom 290-490 mm<sup>2</sup> og kontrollen lå på 630 mm<sup>2</sup>.



Figur 16. Vekstkurvene for *P. nordicum* isolatene c) 6-1-2 og d) 8-74 ved seks forskjellige saltkonsentrasjoner (8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 % og 11 % NaCl), og kontroll (uten NaCl). Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

For isolat d) var det liten forskjell i vekst mellom variantene med og uten salt. Arealet for saltkonsentrasjonene og kontrollen lå i område mellom 280-430 mm<sup>2</sup>. Isolat d) hadde ikke best vekst på kontrollen på dag åtte, og det var bedre vekst på 8,5 og 9 % NaCl. Isolatet hadde ikke synlig vekst på 10,5 % NaCl før dag fire. For begge isolatene var det minst vekst på 11 % NaCl.

Vekstkurvene for *P. chrysogenum* isolatene er vist i Figur 17. For isolat e) var det liten forskjell i vekst mellom variantene med og uten salt, som lå i arealområdet mellom 550-800 mm<sup>2</sup>. Isolat e) på kontrollen hadde ikke høyest vekst etter dag seks, og viste det samme kurvforløp som i det innledende forsøket. På dag åtte hadde isolatet bedre vekst på 8,5, 9 og 9,5 % NaCl enn kontrollen. Isolatet hadde høyest vekst på kontrollen fra dag tre (over 100 mm<sup>2</sup>) i forhold til alle de andre isolatene.



Figur 17. Vekstkurvene for *P. chrysogenum* isolatene e) 9-36 og f) 8-41 ved seks forskjellige saltkonsentrasjoner (8,5 %, 9 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 % og 11 % NaCl), og kontroll (uten NaCl). Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

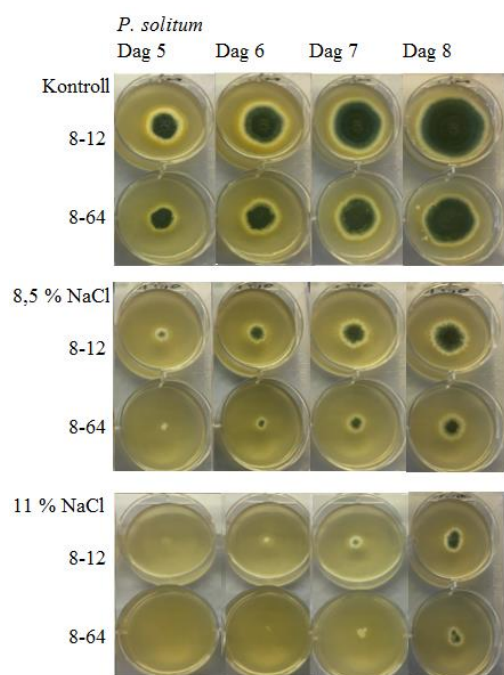


Arealene for saltkonsentrasjonen for isolat f) lå mellom 200-410 mm<sup>2</sup> og kontrollen lå på 510 mm<sup>2</sup>. Vekstkurven for isolat f) var mindre enn isolat e). For begge isolatene var det synlig vekst på alle saltkonsentrasjonene og kontrollen fra dag tre. Begge isolatene hadde minst vekst på 11 % NaCl.

### 3.4.3 Sporedannelse

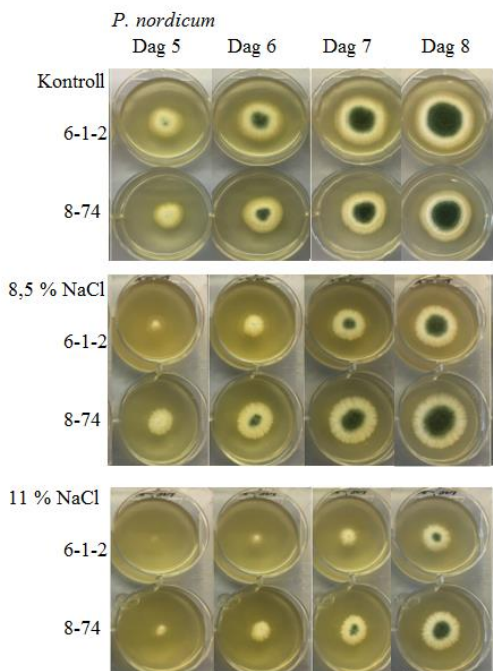
Det ble observert utvikling i sporedannelse for isolatene *P. solitum* (Figur 18), *P. nordicum* (Figur 19) og *P. chrysogenum* (Figur 20) på 8,5 % NaCl, 11 % NaCl og kontroll. Bildene er fra samme koloni men på forskjellige dager. Det ble observert lik utviklingen i sporedannelse for de tre gjentakene (Vedlegg 6.7).

Sporedannelse for *P. solitum* er vist i Figur 18 ved lav saltkonsentrasjon (8,5 % NaCl), ved høy saltkonsentrasjon (11 % NaCl) og i kontroll uten NaCl. For isolat 8-12 og 8-64 kan det observeres mindre sporedannelse på varianten med høyere saltkonsentrasjon enn den med lavere saltkonsentrasjon og kontroll. Isolatene begynte å produsere sporer på ulik tid. På 11 % NaCl begynte isolat 8-12 ikke sporeproduksjonen før dag sju, og isolat 8-64 begynte ikke før dag åtte.



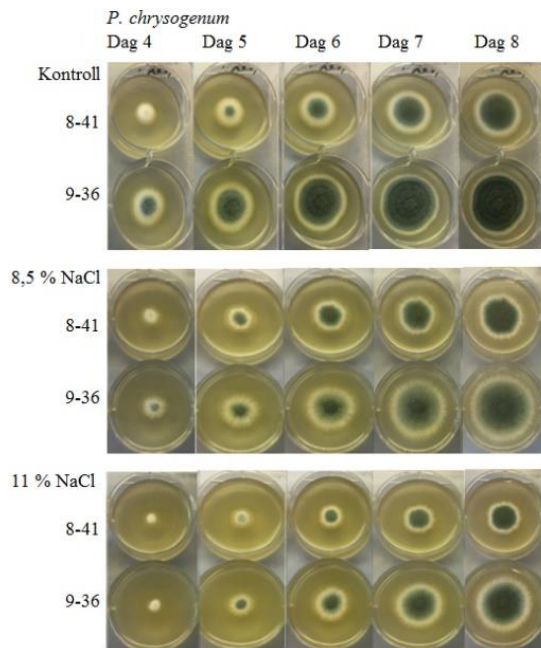
Figur 18. Kolonier av *P. solitum* isolater på malt ekstrakt agar. De øverste radene på hver plate er isolat 8-12, nederste radene er isolat 8-64. Kontrollen er øverst i bilde, 8,5 % NaCl i midten og 11 % NaCl nederst. Fra venstre i figuren er dag fem til dag åtte til høyre.

Sporedannelse for *P. nordicum* isolatene er vist i Figur 19. Resultatene viste at det var mindre sporedannelse ved høy saltkonsentrasjon enn for lav saltkonsentrasjon og kontroll. Kontrollen hadde synlig sporedannelse allerede ved dag fem, og for 11 % NaCl var det først synlig sporedannelse ved dag sju for isolat 8-74 og dag åtte for isolat 6-1-2.



Figur 19. Kolonier av *P. nordicum* isolater på malt ekstrakt agar. De øverste radene på hver plate er isolatet 6-1-2, nederste radene er isolat 8-74. Referansen er øverst i bilde, 8,5 % NaCl i midten og 11 % NaCl nederst. Fra venstre i figuren er dag fem til dag åtte til høyre.

Sporedannelse for *P. chrysogenum* isolatene 8-41 og 9-36 er vist i Figur 20. Det er også her mindre sporedannelse på høy saltkonsentrasjon enn det er på lav saltkonsentrasjon og kontroll. *Penicillium chrysogenum* begynte å produsere synlige sporer tidligere enn *P. solitum* og *P. nordicum* isolatene. For kontroll og 8,5 % NaCl var det synlig sporedannelse for begge isolatene fra dag fire. Allerede etter dag fem var det synlig sporedannelse for begge isolatene på 11 % NaCl.



Figur 20. Kolonier av *P. chrysogenum* isolater på malt ekstrakt agar. De øverste radene på hvert er isolatet 8-41, nederste radene er isolat 9-36. Kontrollen øverst i bilde, 8,5 % NaCl i midten og 11 % NaCl nederst. Fra venstre i figuren er dag fire til dag åtte til høyre.

### 3.5 Vekstforsøk - Effekt av frysing

Resultatene for *P. solitum*, *P. nordicum* og *P. chrysogenum* isolatene i det innledende forsøket (1-2 gjentak) og hovedforsøket (3-5 gjentak) er vist i figur 21-23. Platene er nummerert fra 1 til 5, tilsvarende som beskrevet i materialer og metode delen. Alle platene i figurene er fra dag 11.

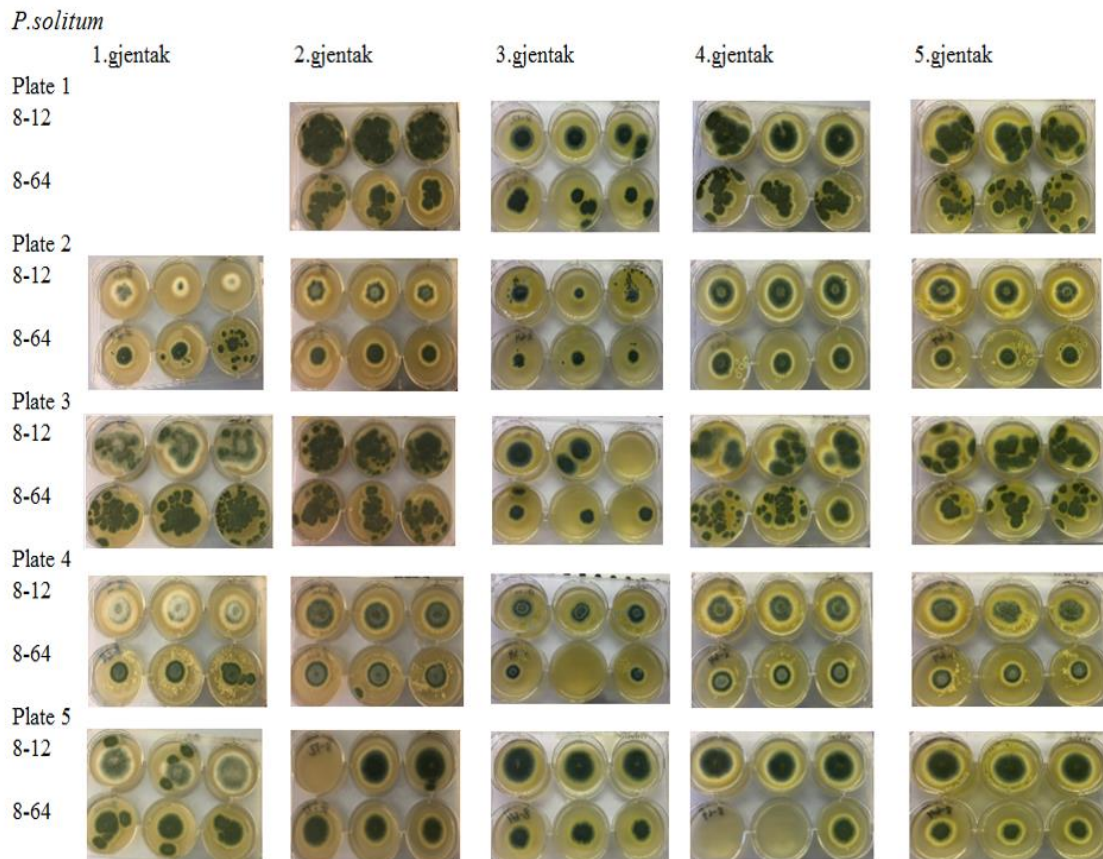
Temperaturloggingen for det innledende forsøket viste  $20 \pm 2$  °C og  $-20 \pm 2$  °C.

Temperaturloggingen for hovedforsøket viste  $20 \pm 2$  °C og  $-23 \pm 2$  °C.

Platene som ble fryst rett etter inokulering (1 og 3) hadde mer «strøvekst» enn platene som ble fryst tre dager etter inokulering (2 og 4), spesielt platene fra gjentak to viste mye «strøvekst»

Plate 5 er kontrollen (ikke fryst), og viste lite «strøvekst». Det ble observert at plate 2 og 4 hadde mindre vekst enn plate 1 og 3.

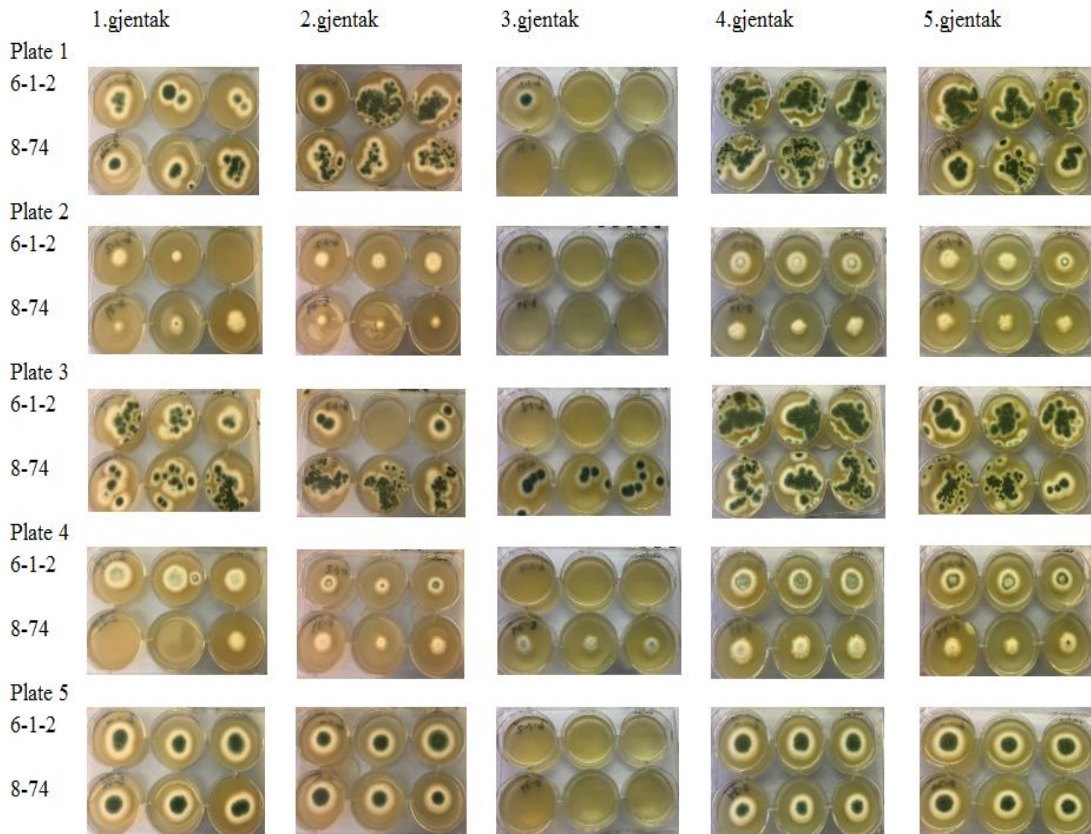
Det kan observeres en forskjell i farge på koloniene mellom vekstplatene for *P. solitum* i Figur 21. Spesielt plate 4 viste gulere kolonier på 4-5 gjentak. Isolat 8-12 på 1. gjentak er kontaminert, så denne utelates.



Figur 21. *P. solitum* isolat 8-12 og 8-64 ved de ulike innfrysningstilstandene på dag 11. Platene som ble fryst rett etter inokulering er merket plate 1 og 3. Platene fryst tre dager etter inokulering er merket plate 2 og 4 og plate 5 er kontrollen. Gjentak 1 og 2 det innledende forsøket og gjentak 3 – 5 gjentak er fra hovedforsøket.

Resultatene for *P. nordicum* isolatene 6-1-2 og 8-74 ved ulike innfrysning er vist i Figur 22. Platene som ble fryst rett etter inokulering (1 og 3) viste mer «strøvekst» enn platene som ble fryst tre dager etter inokulering (2 og 4). For gjentak 2, 4 og 5 var det mer «strøvekst enn på de andre gjentakene. Det ble observert at plate 2 og 4 hadde mindre vekst enn plate 1 og 3.

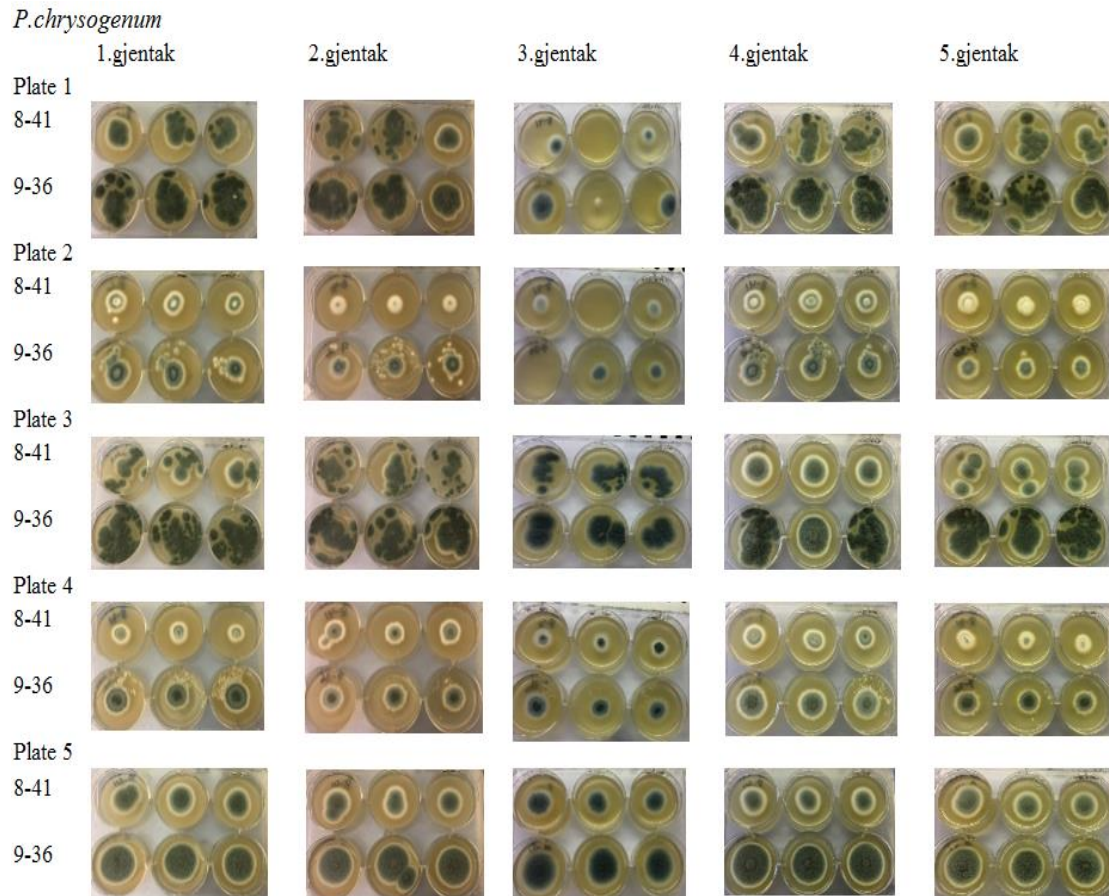
*P. nordicum*



Figur 22. *Penicillium nordicum* isolat 6-1-2 og 8-74 ved de ulike innfrysningensbetingelsene på dag 11. Platene som ble fryst rett etter inokulering er merket plate 1 og 3. Platene fryst tre dager etter inokulering er merket plate 2 og 4 og plate 5 er kontrollen. Gjentak 1 og 2 det innledende forsøket og gjentak 3 – 5 gjentak er fra hovedforsøket.

Det kan også observeres en forskjell i koloniutseende og sporedannelse. Plate 2 og 4 viste mest hyfevekst og mindre sporeproduksjon enn plate 1 og 3. Isolat 8-74 ble hemmet mer enn 6-1-2 av innfrysningen på plate 2 og 4.

I Figur 23 er resultatene for *P. chrysogenum* isolatene 8-41 og 9-36 vist. Plate 1 og 3 som ble fryst rett etter inokulering viste mer «strøvekst» enn plate 2 og 4 som ble fryst tre dager etter inokulering.



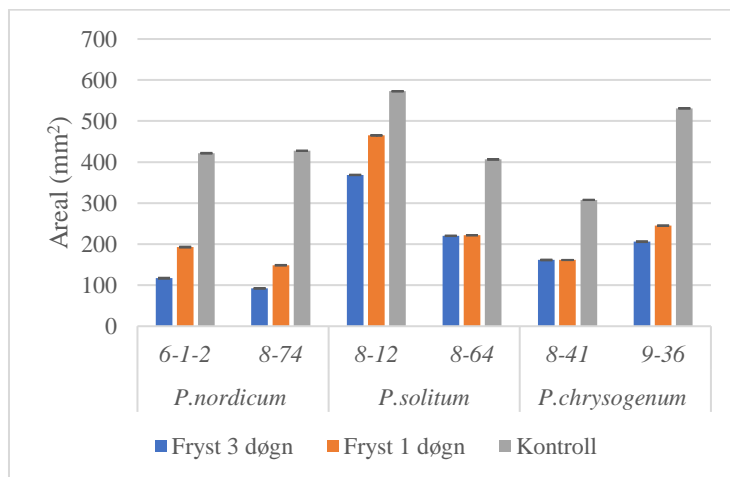
Figur 23. *Penicillium chrysogenum* isolat 8-41 og 9-36 ved ulike innfrysingsbetingelsene på dag 11. Platene som ble fryst rett etter inokulering er merket plate 1 og 3. Platene fryst tre dager etter inokulering er merket plate 2 og 4 og plate 5 er kontrollen. Gjentak 1 og 2 det innledende forsøket og gjentak 3 – 5 gjentak er fra hovedforsøket.

Spesielt 9-36 viste mer «strøvekst» enn 8-41 på plate 1 og 3, og betydelig sporedannelse i alle gjentak. Det ble observert mindre synlig sporeproduksjon på plate 2 og 4 som ble fryst tre dager etter inokulering, men 9-36 viste mer sporeproduksjon enn 8-41. Kontrollen viste lite «strøvekst» men hadde god vekst på dag 11. Også her ble det observert at plate 2 og 4 hadde mindre vekst enn 1 og 3.

### 3.5.1 Kolonistørrelse etter frysing

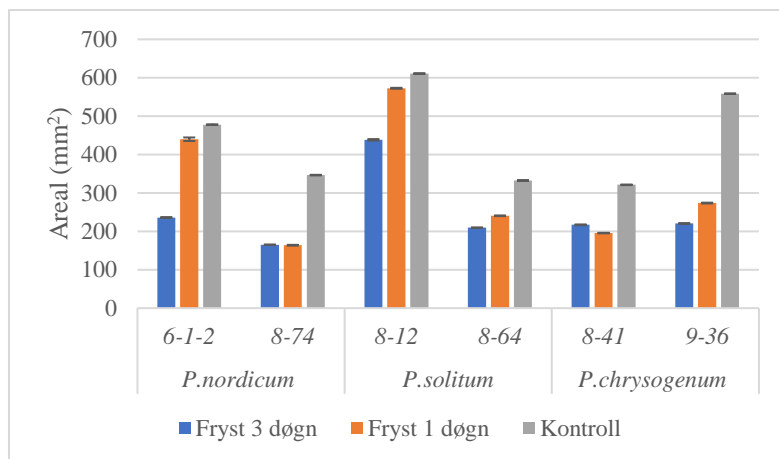
Størrelsen på koloniene for *P. solitum*, *P. nordicum* og *P. chrysogenum* isolatene (plate 2 og 4) er vist i Figur 24 i det innledende forsøket og i hovedforsøket (Figur 25), etter frysing i ett og tre døgn. Forskjellen i utførelsen mellom det innledende forsøket og hovedforsøket er inokuleringen. Grunnlaget for diagrammene er et beregnet gjennomsnitt av to gjentak fra det innledende forsøket og tre gjentak fra hovedforsøket. Standardavviket ble beregnet, men viste ingen store forskjeller (Vedlegg 6.8).

I det innledende forsøket (Figur 24) ble det observert at isolatene vokste bedre uten frysing (kontroll) enn på forsøksvariantene som hadde vært fryst i 1 og 3 døgn. *Penicillium nordicum* isolatene 6-1-2 og 8-74 ble hemmet mest av frysing i 1 og 3 døgn, og 3 døgn hemmet mest. For isolat 8-64 og 8-41 var det ingen forskjell mellom isolatene fryst i tre døgn og ett døgn.



Figur 24. Areal av koloniene på dag 11 i innledende forsøk. Isolatene ble fryst tre døgn etter inokulering i henholdsvis tre døgn (blå søyle), ett døgn (rød søyle) og kontrollen som ikke ble frosset. De vertikale linjene indikerer  $\pm$  standardavviket. Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

I Figur 25 er resultatene for isolatene fryst i 1 døgn og 3 døgn i hovedforsøket. Isolatene som ikke ble fryst (kontroll) hadde best vekst. For isolat 8-74 var det ingen forskjell mellom 1 og 3 døgn frysing, og det var liten forskjell mellom innfrysningen i 1 døgn og 3 døgn for 8-64, 8-41 og 9-36.



Figur 25. Areal av koloniene på dag 11 i hovedforsøk. Isolatene ble fryst tre døgn etter inokulering i henholdsvis tre døgn (blå søyle), ett døgn (rød søyle) og kontrollen som ikke ble frosset. De vertikale linjene indikerer  $\pm$  standardavviket. Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

### 3.6 Vekstforsøk - Effekt av ulik fuktighet

#### 3.6.1 Innledende forsøk

Det ble utført et innledende forsøk for å teste ulike løsninger med hensyn til relativ fuktighet uten isolater. Resultatene viste lite forskjell i relativ fuktighet mellom løsningene (Tabell 10). Det ble gjort flere innledende forsøk uten hell, disse er ikke vist.

Tabell 10. Temperatur og fuktighet for varianten med litiumacetat, kaliumklorid og kontroll (uten løsning).

Type løsning	Temperatur $\pm 2$ °C	Relativ fuktighet (RF) $\pm 2$ %
Litiumacetat	20	84
Kaliumklorid	20	88
Kontroll	20	85

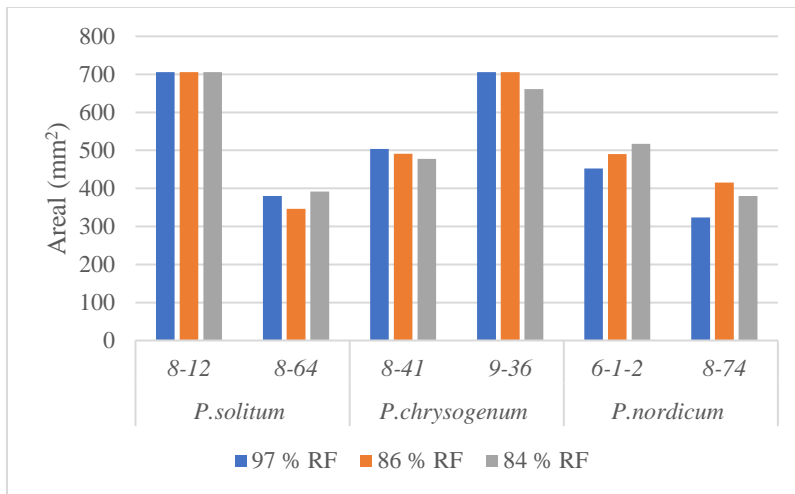
#### 3.6.2 Hovedforsøk

Hovedforsøket ble utført på samme måte som det innledende forsøket, men med isolater. Det ble utført et gjentak (Vedlegg 6.9). I Figur 26 er størrelsen av koloniene for *P. solitum*, *P. chrysogenum* og *P. nordicum* på dag sju vist, etter å ha vært dyrket i lukkede beholdere med løsning av kaliumklorid, litiumacetat og kontroll (uten løsning). Det var liten forskjell i relativ fuktighet mellom litiumacetat (84 % RF), kaliumklorid (86 % RF) og kontrollen (97 % RF).

Temperaturloggingen ved dyrking var  $20 \pm 2$  °C for alle variantene.



Det ble observert liten forskjell i vekst blant isolatene med henhold til de ulike relative fuktighetene. Siden det ikke ble oppnådd de ønskede fuktighetene i boksene ble det ikke gjennomført flere gjentak.



Figur 26. Muggsopp isolatene dyrket ved de forskjellige løsningene for å gi ulik relativ fuktighet. Blå søyle er 97 % RH, rød søyle er 86 % RH og grå søyle er 84 % RH. Vekst er angitt som areal beregnet ut fra målt radius.

## 4 Diskusjon

I denne studien har det blitt undersøkt hvor sensitive metodene FT-IR og MALDI-TOF MS er for identifisering av problemmugg. I tidligere studier har det blitt utført identifisering av muggsopp med FT-IR (Lecellier et al. 2014; Lecellier et al. 2015; Shapaval et al. 2010; Shapaval et al. 2013) og MALDI-TOF (Chalupova et al. 2014; Lima & Santos 2017; Panda et al. 2015) med lovende resultater. Det har ikke tidligere vært utført studier som identifiserer de samme artene med begge metodene (så vidt vi vet). Det ble valgt ut hyppige forekommende muggsopp isolater fra prøvetakingen foretatt på spekemat anleggene i 2015 og 2016. Det er viktig at metodene kan skille problemmugg fra annen hyppig forekommende mugg. I denne studien ble derfor nært beslektede muggsopparter klassifisert med FT-IR for å se om metoden kunne skille disse fra hverandre.

Det blir lagt mer vekt på FT-IR resultatene i diskusjonen, ettersom databasen for MALDI-TOF ikke inneholdt de artene som var mest relevante å identifisere for studien, siden MALDI-TOF har blitt benyttet mest i klinisk sammenheng (Angeletti 2016; Carbonnelle et al. 2011; Panda et al. 2015). Det betyr at databasen til MALDI-TOF er mest basert på mikroorganismer isolert fra sykehus etc. og ikke muggsopp og gjær fra næringsmiddelindustrien.

Det kan også benyttes sporer til FT-IR analysen, som blant annet har blitt utført i studien til Fischer et al. (2006). Sporer er metabolske inaktive og må behandles med for eksempel etanol før en analyse (Lecellier et al. 2014). Bruk av sporer i en analyse kan derfor være mindre egnet enn bruk av mycel. I denne studien ble det noen ganger produsert sporer i platene, disse ble som regel «fisket» opp, men hvis det ikke var mulig ble de med i prøvematerialet. Dette kan ha ført til forstyrrelser på IR-spektrene og gitt dårligere identifikasjon.

## 4.1 FT-IR

Totalt 101 isolater fra 2015 og fra mykologikartoteket på VI ble klassifisert med FT-IR metoden. Resultatene viste et samsvar på 99,5 % på slektsnivå og 92,2 % på artsnivå mellom FT-IR metoden og tradisjonell metode og/eller sekvensering (Tabell 6). Hvis man antar at den tradisjonelle metoden for identifisering er korrekt vil det si at over 90 % av isolatene ble klassifisert riktig på artsnivå med FT-IR metoden. For FT-IR analysen ble den tradisjonelle metoden og/eller sekvenseringen for identifisering av muggsopp benyttet som fasit, så feil i den tradisjonelle metoden vil også gi feil identifisering med FT-IR.

Fordelen med å bruke FT-IR er at man ikke trenger spesiell kunnskap om muggsopp, men det kreves en viss forståelse for teknikk og laboratoriearbeid. Det ble observert at spektre ble bedre på de siste gjentakene enn for de første gjentakene (resultater ikke vist), og isolatene som ble utelatt var hovedsakelig fra de første gjentakene. I de første gjentakene med FT-IR ble det ikke alltid brukt 48 timer inkuberingstid, men det kunne variere  $\pm$  to timer. I den senere tid har det vist seg at dette kan ha påvirket informasjonen av spektrene, ettersom muggsopp produserer forskjellige komponenter til ulik tid avhengig av vekststadiet (Lecellier et al. 2014). I en studie av Shapaval et al. (2010) ble det vist at antall dager før «høsting» (1, 3, 4 eller 5) ga forskjell i informasjon for spektrene. I denne studien kan det tyde på at så lite eller mye som  $\pm$  to timer kan ha hatt en innvirkning på spektrene.

Klassifisering av muggsopp med FT-IR baserer seg på en sammenligning av spektrene til arter som ligger i en database. Det er laget en egen database med spektre fra muggsopp identifisert med tradisjonell metodikk og/eller sekvensering (Tabell 4). Det betyr at hvis man er interessert i å identifisere en art som ikke finnes i databasen vil det bli feil identifisering. Metoden kan derfor være mindre egnet til bruk i andre næringsmiddelprosjekter der muggsoppene ikke har blitt identifisert på forhånd, og ikke ligger i databasen. *Aspergillus* spp. ble ikke identifisert på artsnivå med tradisjonell metode, og dermed ble den ikke identifisert på artsnivå med FT-IR metoden. Dette kan også bety at databasen for FT-IR ikke er god nok. Uansett så er forebygging av kvalitetsødeleggende muggsopp kun vellykket hvis arten som faktisk ødelegger produktet er kjent (Filtenborg et al. 1996). Dette vil si at man på forhånd må vite hvilke muggsopper man skal se etter.

Ved første øyekast kan det se ut som de fleste prøvene som ble klassifisert feil med FT-IR metoden (Tabell 7) ligger innenfor samme seksjonsområdet (fargede rubrikkene), mens noen

feilklassifiserte prøver faller utenfor seksjonsområdet. De feilklassifiserte innenfor samme seksjon gjelder artene *P. nordicum*, *P. brevicompactum* og *P. olsonii*. Dette viser at gjentatte analyser av samme isolat kan gi ulik identifisering på grunn av støy og avvik. En database med høy kvalitet og god variasjon vil gjøre identifiseringen mer robust og tilpasningsdyktig for naturlig variasjon i prøvemateriale og analyse.

Det ble totalt analysert 288 prøver av 15 *P. solitum* isolater (Tabell 7). Det var samsvar mellom metodene for 277 prøver, og det var ikke samsvar for 11 prøver. I forhold til prøveantallet er det likevel få prøver som ble feilklassifisert. Disse resultatene indikere at FT-IR klarer å klassifisere de fleste prøvene riktig.

*Penicillium brevicompactum* var også en av de artene som ble hyppigst isolert fra anleggene i 2015 og 2016, og er nært beslektet med *P. olsonii* (Frisvad & Samson 2004). *Penicillium olsonii* ble valgt ut for å kunne se om FT-IR metoden kunne skille den fra nært beslektet *P. brevicompactum*. Det var 12 av 168 prøver av *P. brevicompactum* som ble klassifisert som *P. olsonii* med FT-IR metoden, og av *P. olsonii* ble 11 prøver av 85 prøver klassifisert som *P. brevicompactum* med FT-IR metoden. Det kan tyde på at FT-IR på dette tidspunkt er mer følsom for disse artene. Likevel samsvarte de fleste prøvene mellom FT-IR metoden og den tradisjonelle metoden. I forsøkene kan en krysskontaminasjon mellom arter ha vært mulig, selv om det ble benyttet tomme brønner mellom artene for kontroll, kan det likevel ikke utelukkes.

Selv om FT-IR er ansett som en rask metode for identifisering av muggsopp (Fischer et al. 2006) ble det fortsatt benyttet en viss tid på analysen. Det må først dyrkes fram rene isolater til hver analyse. Isolatene ble dyrket fram på agariskål i tre døgn før de ble inokulert over i buljong for dyrking i to døgn. Fra man har et rent isolat så vil det ta minimum fem døgn før man får et resultat. Shapaval et al. (2013) antydte at det tar 10 dager til man har en identifisering klar med FT-IR, som betyr at FT-IR er raskere enn tradisjonell metode men tregere enn genetisk metode. En analyse med FT-IR er likevel billigere enn molekylære metoder (Lecellier et al. 2015).

For spekemat industrien kan FT-IR bli en god metode for identifisering av problemmugg på et tidlig stadium i produksjonen. Metoden egner seg til å ta mange prøver på en gang, vil man kunne få en indikasjon på hvilke muggsopper som finnes. Blir en FT-IR analyse utført før en eventuell problemmugg får vokse, kan bedriften sette inn tiltak for å forhindre videre muggvekst og spare tid og penger. Etter hvert som databasen til FT-IR blir bedre kan den også identifisere flere arter.

#### 4.1.1 Isolater fra 2016

Et utvalg av muggsopp isolater fra 2016 året ble analysert med FT-IR. Isolatene hadde tidligere blitt tradisjonelt identifisert og/eller sekvensert på forhånd. For å teste FT-IR metoden ble isolatene holdt «ukjente» for systemet, men artene fantes i databasen.

Resultatene for de ukjente isolatene viste et samsvar mellom tradisjonell metode og FT-IR metode med 88,3 % på seksjonsnivå og 62,2 % på artsnivå. Dette er en lavere prosentandel enn for de tidligere analysene utført i studien. For de «ukjente» isolatene ble det kun utført et gjentak, som kan bety at metoden trenger flere gjentak for å kunne bli mer robust. Det kan også være feil identifisering i den tradisjonelle metoden, som vil gi feil med FT-IR metoden.

Det ble totalt analysert 59 prøver av 10 *P. solitum* isolater (Tabell 8). Mellom tradisjonell identifisering og FT-IR metoden samsvarte 48 av prøvene, men 11 prøver samsvarte ikke. Prøvene som ikke samsvarte lå innenfor samme seksjon, som kan indikere at metoden har vanskeligheter med å skille disse artene. Imidlertid er det få prøver som ikke samsvarer mellom metodene. Resultatene for isolatene fra 2016 gir en god indikasjon på hvilke arter som klassifiseres riktig med FT-IR metoden, til tross for at det kun ble utført et gjentak. Resultatene gir en slags verifisering av isolatene for de foregående analysene som ble utført, ettersom dette kan være andre stammer fra 2016 enn fra 2015.

#### 4.2 MALDI-TOF

Det ble benyttet mycel til identifisering av muggsoppene med FT-IR og MALDI-TOF. Mycel kan gi unike spektre med informasjon om fettsyre-, protein-, karbohydrat- og fingeravtrykkregioner i en FT-IR analyse (Shapaval et al. 2010). Det kan også genereres unike fingeravtrykk med MALDI-TOF, men med MALDI-TOF er det proteinene og peptidene i en prøve som blir analysert (Bruker 2014). Basert på disse opplysningene kan det tyde på at FT-IR kan gi mer informasjon om muggsoppen enn MALDI-TOF. I en tidligere studie av Shapaval et al. (2010) ble det vist at karbohydratregionen var mest reproduserbar, og denne ble derfor valgt som hovedmarkør for muggsoppen. Innholdet av karbohydrater endres med veksten av muggsoppen og det er derfor viktig at analysene er standardisert. Det betyr at spektrene kan gi ulik informasjon avhengig av når mycelet blir «høstet». De ulike regionene (protein,

karbohydrat etc.) er artsspesifikke (Lecellier et al. 2014) og i senere studier vil det være nyttig å vite hvilke komponenter som er av betydning for de ulike artene.

Som tidligere nevnt ble det utført mindre antall analyser med MALDI-TOF. Selv om noen av artene som ble analysert med metoden ikke fantes i databasen, er de tatt med i resultatdelen. Det ble generert en rapport etter at en analyse ble utført med MALDI-TOF, som gjør at metoden fungerte på en litt annen måte enn det FT-IR gjør. Det kan være at MALDI-TOF muligens er bedre egnet til bruk i industriell sammenheng enn FT-IR er på dette tidspunktet, som foreløpig trenger statistikk ekspertise. Rapporten med MALDI-TOF resultatene sa noe om artene er identifisert med høy, lav eller ingen identifikasjon mulig. Resultatene viste at 36 isolater ble identifisert med høy grad og 14 av isolatene ga MALDI-TOF samme klassifisering som tradisjonell metode.

Med tradisjonell metode ble ikke *Aspergillus* spp. identifisert på artsnivå, men med MALDI-TOF ble 11 *Aspergillus* arter identifisert med høy grad på artsnivå, og sju ble identifisert med lav sikker identifikasjon. Selv om *Aspergillus* spp. ikke ble identifisert på artsnivå med den tradisjonelle metoden så kan de likevel bli identifisert med MALDI-TOF, og metoden kan indikere hvilken art den kan være eller er nært beslektet til. Det ble benyttet en ekstern database til MALDI-TOF, som også gjør at den samme databasen er tilgjengelig for flere aktører.

*Penicillium nordicum* lå ikke i databasen til MALDI-TOF, og kan derfor ikke bli identifisert som *P. nordicum*. Likevel ble flere av *P. nordicum* analysert med høy grad av sikkerhet med MALDI-TOF, men som en annen art enn tradisjonell metode tilsa. Hvis det er feil i identifiseringen med den tradisjonelle metoden, kan identifiseringen med MALDI-TOF være korrekt. Blant annet ble *P. nordicum* klassifisert som *P. verrucosum* med MALDI-TOF. Disse er nært beslektet med hverandre og begge kan produsere okratoksin A (Sonjak et al. 2011b). Så det kan det være av interesse hvis *P. nordicum* konsekvent klassifiseres som *P. verrucosum*, for eventuelt å kunne utelukke OTA-produserende arter. Utfra resultatene ble tre *P. nordicum* identifisert som to *P. commune* og en *P. crustosum*. Dette kan være negativt hvis de likevel kan være OTA-produserende *P. nordicum*.

*Penicillium chrysogenum* lå i databasen til MALDI-TOF, og for begge metodene blir isolatene identifisert som *P. chrysogenum*. Dette tyder på at så lenge referansespektrene for artene ligger i databasen, er MALDI-TOF en god metode. Det ble benyttet bare et replikat fra hvert isolat i analyserundene med MALDI-TOF, men for FT-IR ble det benyttet seks replikater. Det trenger nødvendigvis ikke å bety at databasen for MALDI-TOF er bedre, men at det er variasjoner

innad i artene. Hvis det hadde blitt utført flere replikater for MALDI-TOF kan det hende prøvene hadde gitt ulik identifisering.

### 4.3 Vekstforsøkene

Til vekstforsøkene ble muggsoppisolatene valgt ut etter relevans. Fra spekemataneleggene var *P. solitum* en av de artene som ble hyppigst isolert, og ble påvist mest fra pinnekjøtt. *Penicillium solitum* er ikke kjent for å produsere giftstoffer (Asefa et al. 2009; Pitt & Hocking 1999). *Penicillium nordicum* ble isolert mest fra spekeskinke, og kan utgjøre en risiko ved at den potensielt kan danne okratoksin A (Schmidt-Heydt et al. 2012). *Penicillium chrysogenum* ble valgt ut fordi den kan danne penicillium, som er et allergen, (Frisvad & Samson 2004). Faktorer som frysing, saltkonsentrasjoner og fuktighet er alle betingelser som kan påvirke veksten til muggsoppisolatene. Det må tas i betraktning at alle forsøkene ble utført i labskala, og under utvalgte betingelser. Under andre betingelser kan muggsoppene få en annen vekst.

Det ble benyttet Malt Extract Agar basert på Blakeslee (Samson et al. 2004b) som er et generelt dyrkningsmedium for muggsopp. Veterinærinstituttet benyttet denne typen, mens Nofima benyttet en annen type MEA (Oxoid). Disse inneholder litt forskjellige næringsstoffer, og de ga forskjellig koloniutseende. Til vekstforsøkene ble det bestemt at MEA fra Veterinærinstituttet skulle benyttes. I vekstmediene var det glukose, som ikke er i pinnekjøtt eller spekemat. Muggsoppene vil mest sannsynlig ha en annen vekst på et reelt produkt.

20 °C ble valgt som dyrkningstemperatur for muggsoppene. Typisk tørketemperatur for spekeskinke er i området fra 16 °C til 25 °C, avhengig av hvor lenge det skal tørke og når i prosessen det er. Tørketemperaturen kan variere fra land til land, og type produkt (Toldrá & Aristoy 2010). I et produksjonsanlegg vil derfor temperaturene varierer avhengig av når i prosessen produktet er, som igjen kan påvirke veksten av muggsoppene. Generelt kan muggsopper vokse godt i området fra 16 °C til 25 °C.

Det ble inokulert direkte fra agarplate i innledende forsøk dette viste seg å være en mindre god metode, ettersom det ga mye «strøvekst» på prøveplatene. Metoden var basert på å måle veksten av kolonien, og for flere replikat på det innledende forsøket var det vanskelig å utføre en måling. Det gjaldt spesielt isolatene til *P. solitum* men også for de to andre artene. Det ble derfor byttet til å inokulere med glyserol for å hindre «strøvekst», som også førte til mindre «strøvekst» på

platene. Hovedforsøket inneholdt flere godkjente replikater enn det innledende forsøket. Imidlertid viste grafene for vekst den samme utviklingen for begge forsøkene.

I en studie av Schmidt-Heydt et al. (2012) ble det tillaget en sporesuspensjon med kjent celleantall før inokuleringen. I denne studien ble dette ikke utført, som kan være en svakhet. Det var derfor umulig å vite hvor mye prøvemateriale som ble tilsatt prøveplaten for hvert gjentak, likevel viste isolatene samme trend i vekst.

Radius av soppkolonien og beregning av areal ble valgt for å bestemme vekst. Det er selvfølgelig begrensninger med metoden. For å forstå veksten av muggsopp må det skilles mellom «vekst» og «ekstensjon». Veksten skjer gjennom hyfer som resulterer i en økning av biomasse, mens en forlengelse skjer ved hyfespissen. I utgangspunktet kan ikke veksten av muggsoppen forklares alene med måling av radius (Moore et al. 2011). Dette er en svakhet med metoden, men på en annen side kan en måling av radius være en god metode for å kunne se effekten for eksempel av de ulike saltkonsentrasjonene på et fast medium.

#### 4.4 Vekstforsøk - Effekt av ulike saltkonsentrasjoner (NaCl)

Det var samme utvikling i vekst i det innledende forsøket som i hovedforsøket for isolatene i de ulike saltkonsentrasjonene. Det vil derfor legges vekt på hovedforsøket i diskusjonen. I det innledende forsøket ble det for *P. solitum* isolat 8-12 kun gjennomført et gjentak på grunn av forurensning på andre gjentak, og flere av replikatene ble utelatt på grunn av «strøvekst». Kontaminasjonen var synlig med det blotte øyet ettersom kontaminanten skilte seg i utseende fra det andre isolatet av samme art. For å utelukke en videre kontaminasjon ble det tatt opp nytt materiale av isolatet på Veterinærinstituttet som ble benyttet videre.

Det har blitt utført få studier som viser vekst av *Penicillium* spp. på ulike saltkonsentrasjoner, spesielt ved høyere saltkonsentrasjoner som er benyttet i denne studien. *Penicillium solitum*, *P. nordicum* og *P. chrysogenum* viste alle at de ble påvirket forskjellig av de ulike saltkonsentrasjonene, selv innenfor art. Den statistiske analysen viste også en gjennomsnittlig reduksjon av vekst var ulikt for de forskjellige isolatene, som også ble observert i vekstkurvene.

At salt kan hemme muggvekst kan være opplagt, men flere av artene er halofile som vil si at de kan vokse godt i produkter med salt. Saltinnholdet kan kontrollere vannaktiviteten i et produkt, i tillegg til tørking, og ødeleggende muggsopp er ofte forbundet med lav vannaktivitet (Rosso



& Robinson 2001). Spekemat er karakterisert av lav vannaktivitet og høye saltkonsentrasjoner (Sonjak et al. 2011a). Men det er flere faktorer som spiller inn som man må i betraktning. Som for eksempel når i en prosess kontaminasjon av muggsopp er mest sannsynlig. Ettersom noen forhold kan være spesielt gunstige for muggsopper og som kan bestemme tilstedeværelsen av den dominerende arten (Sonjak et al. 2011a). Det er derfor vesentlig å vite hvilke muggsopper som finnes i anleggene, og nyttig å vite hvilke faktorer som kan fremme veksten. I denne studien ble det benyttet saltkonsentrasjonene 8,5 – 11 %, men for pinnekjøtt er dette som regel i sluttproduktet. Dette kan bety at muggveksten kan være høyere på en lavere saltkonsentrasjon for eksempel hvis kontaminasjon oppstår på et tidligere punkt i produksjon prosessen, når det er mindre salt i produktet. Det vil også være en forskjell i næringsstoffer avhengig av når i en prosess produktet er. Når et produkt tørker vil innhold av blant annet salt, protein og fett øke som kan gi gunstig vekstvilkår til muggsoppen.

Likevel kan det være nyttig for bedriften å vite i hvilken grad de hyppigst isolerte muggsoppene blir hemmet. Spesielt for pinnekjøtt som kan inneholde ganske mye salt i slutten av en tørkeprosess. *Penicillium solitum* er en kjent kontaminant for ost, kjøttprodukter og tørket fisk (Sorensen et al. 2008), og en muggsopp som kan leve godt ved lav vannaktivitet og trives i miljøer med høyt saltinnhold (Samson et al. 2010). Resultatene viste at *P. solitum* ble hemmet mer av salt enn *P. nordicum* og *P. chrysogenum*. På de ulike saltkonsentrasjonene med *Penicillium solitum* isolatene kan det også se ut som salt er av mindre betydning. Om det blir benyttet 8,5 % eller 11 % salt kan ikke se ut til å ha så stor betydning på veksten.

Begge isolatene for *P. solitum* hadde ikke synlig vekst på 11 % salt før dag fire, som vil si at høy saltkonsentrasjon hemmer veksten fra start, ettersom for isolat 8-12 var det synlig vekst på alle saltkonsentrasjonene fra dag tre. Dette indikere at en høyere saltkonsentrasjon kan forsinke muggveksten etter kontaminasjon, og hvis en kontaminasjon oppstår tidlig i produksjonsprosessen, for eksempel når saltinnholdet ikke er så høyt kan det gi gunstig vekstvilkår for *P. solitum*. Selv om *P. solitum* var av de isolatene som så ut til å ha dårligst vekst på saltkonsentrasjonene i forhold til kontrollen var det fortsatt vekst på saltkonsentrasjonene. Så lenge *P. solitum* får anledning kan den også vokse på høyere saltkonsentrasjoner, men tregere.

*Penicillium nordicum* og *P. chrysogenum* viste mindre forskjell i vekst mellom saltholdige medier og kontrollen enn *P. solitum* isolatene. Imidlertid var det minst vekst på de høyeste saltkonsentrasjonene for isolatene. Resultatene indikerer at forskjellen mellom 11 % NaCl og 8,5 % NaCl har større betydning for *P. nordicum* og *P. chrysogenum* enn for *P. solitum*

isolatene. Både *P. nordicum* og *P. chrysogenum* er psykro- og halotolerante, det vil si at de kan vokse ved lave temperaturer og ved høye saltkonsentrasjoner (Samson et al. 2010).

Det ble observert at flere av *P. nordicum* hadde en tregere vekst enn de andre artene, og flere av disse var isolert fra kjølerom, som kan antyde at *P. nordicum* trives i kaldere klima. Det har også vært vist at *P. nordicum* trives ved lavere temperaturer og vokser dårlig ved 30 °C (Samson et al. 2010). Hadde isolatene blitt dyrket på en lavere temperatur (< 20 °C) kunne de kanskje hatt bedre vekst, som kun er antagelser. *Penicillium nordicum* er en art som kan tolerer lav vannaktivitet (Samson et al. 2010), som vil si at den kan vokse på spekematprodukter.

*Penicillium chrysogenum* finnes vanligvis i tempererte klima, men arten vokser godt mellom 5 - 30 °C (Samson et al. 2010), og kan vokse og være dominerende i næringsmidler med lav vannaktivitet (Comi et al. 2004). Veksten av *P. chrysogenum* isolat 9-36 på kontrollen i både det innledende og hovedforsøket hadde god vekst fra dag tre, men så ut til å flate ut etter ca. dag seks. Etter dag seks hadde det ikke lengre best vekst. Hva som er grunnen til dette er uvisst, men en mulighet er at det kan begynne å mangle næringsstoffer i mediet mot slutten av vekstperioden. Det var synlig vekst på kontrollen og saltkonsentrasjonene for begge isolatene av *P. chrysogenum* fra dag tre. Dette indikere at ulike saltkonsentrasjonene betyr mindre for den synlige veksten av *P. chrysogenum* i en tidlig fase. En svakhet med metoden er at saltet kan ha vært ujevnt fordelt i agar ved tillaging, som kan ha påvirket veksten for de ulike muggsoppene.

#### 4.4.1 Vekstforsøk - Sporedannelse

Ulike saltkonsentrasjoner påvirket sporedannelse for de forskjellige isolatene. *Penicillium solitum* og *P. nordicum* dannet ikke synlig sporer før dag seks på 11 % NaCl, mens *P. chrysogenum* dannet synlig sporer allerede ved dag fem. *Penicillium chrysogenum* var også den arten som viste tidligst vekst på 11 % NaCl, som tyder på muggsoppen kan etablere seg godt ved høy saltkonsentrasjon og at sporer kan spres på et tidligere stadium. *Penicillium chrysogenum* er blant de mest xerofile artene innen *Penicillium* spp., og har vist spiring helt ned i 0,78  $a_w$  (Pitt & Hocking 1999).

Sporer er primære komponenter for spredning av muggsoppen, og står de ovenfor ugunstige forhold som for eksempel mangel på næringsstoffer, lav temperatur, ugunstig pH etc. kan en spore forbli inaktiv lenge og forsinke spiring (Moore et al. 2011). Resultatene indikerer at salt

kan forsinke sporedannelse av artene, men ikke forhindre dem. På dag åtte har alle artene begynt å produsere sporer, derimot er det forskjell i mengde sporedannelse mellom og innad i artene.

Det har kun blitt utført en visuell bedømming av sporedannelsen, noe som kan være en svakhet for metoden. Likevel viste gjentakene den samme utviklingen i sporedannelse for artene. Sporer som er dyrket i et laboratorium kan ha andre fysiologiske tilstander enn de som spres i miljøet (Dantigny & Nanguy 2009). Mulig sporene hadde oppført seg annerledes under andre forhold som for eksempel i et produksjonsanlegg. Imidlertid er det arter som er isolert fra industrien som gir en indikasjon på hvordan sporedannelsen blir påvirket av saltkonsentrasjonene over en begrenset tid.

#### 4.5 Vekstforsøk - Effekt av Frysing

Innfrysingsbetingelsene påvirket også muggsopp isolatene forskjellig. Selv om temperaturen var forskjellig i det innledende forsøket (- 20 °C) og hovedforsøket (- 23 °C) viste isolatene samme vekstutviklingen i begge forsøkene.

Det finnes også lite litteratur på hvordan de ulike arter blir påvirket av frysing. I denne studien kan resultatene tyde på at sporene spres mer når de blir fryst rett etter inokulering, sammenlignet med de som har vært dyrket i tre døgn og så fryst. Den samme utviklingen for «strøvekst» kunne observeres for *P. solitum*, *P. chrysogenum* og *P. nordicum*. En mulig forklaring kan være at isolatene er på ulike stadier i vekst når de blir innfryst. Isolatene som har vært dyrket i tre døgn før de fryses har dannet mycel, mens isolatene som fryses rett etter inokulering er fortsatt sporer. Det har vært vist at mycel generelt er mer sensitiv for frysing enn det sporer er (Mazur 1968). Det ble observert at veksten for isolatene er mindre når de ble fryst tre dager etter inokulering enn de som ble fryst rett etter inokulering. Det støtter teorien om at mycel er mer sensitiv for frysing enn sporer. Sporer er også utviklet for å spre muggsoppen (Deacon 1984). Noen sporer kan spre seg ved eksponering av høye (+ 40 °C) eller lave temperaturer (- 50 °C), fordi temperatursjokket kan fungere som trigger til aktivering av sporene (Isaac 1998). Det kan forklare at isolatene hadde mer «strøvekst» når de ble fryst rett etter at de ble inokulert, og også at de viste mer vekst generelt. Selv om det ikke var mulig å måle radius av disse koloniene, var det en synlig tendens at det var raskere vekst og større sporeproduksjon på platene som ble fryst umiddelbart etter inokulering enn i prøvene som ble fryst tre dager etter inokulering.

Beregningene av kolonistørrelsen for platene fryst tre døgn etter inokulering viste forskjell mellom det innledende forsøket og hovedforsøket, som kan være en målefeil eller tilfeldigheter. I hovedforsøket for *P. chrysogenum* isolat 8-41 ga frysing i ett døgn mindre vekst enn frysing i tre døgn, mens for isolat 9-36 var det omvendt, selv om disse er fra samme art. Man kan også se en forskjell i vekst mellom isolatene for *P. nordicum* og *P. chrysogenum*. Det var for eksempel ingen forskjell i innfrysning i tre døgn eller ett døgn for *P. nordicum* isolat 8-74, men for isolat 6-1-2 ble veksten redusert mer av innfrysningen i tre døgn enn ett døgn.

Innfrysningen må også ses i sammenheng med produksjon av spekemat. Hvis det er råvaren som er kilden til kontaminasjonen, som for eksempel har vært fryst på forhånd, vil råvaren mest sannsynlig utvikle muggvekst under produksjonen, men dette vil da kunne oppdages før det kommer ut til forbruker. Derimot hvis en kontaminasjon skjer under produksjon, og produktet blir fryst før det kommer ut til forbruker, kan det være vanskeligere å oppdage en muggvekst tidlig og det kan gi større konsekvenser for bedriften, som for eksempel tilbakekalling av et produkt. Et annet aspekt er hvis spekemat blir tørket på den riktige måten trenger de i utgangspunktet ikke å bli fryst. Lavere lagringstemperatur gir lavere mikrobiell vekst, og en tregere ødeleggelse av matvaren (Madigan et al. 2010). Dette vil si at når muggsoppene er fryst kan de bli forhindret i å vokse, men derimot kan muggveksten begynne når forholdene blir gunstige igjen. Til tross for at det har blitt rapportert om muggvekst på lavere temperaturer, antydes det at næringsmidler som er fryst under  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  eller lavere er mikrobiologisk stabile (Pitt & Hocking 1999).

Det må også presisere her at hvis det hadde blitt benyttet lavere temperaturer eller lengre innfrysningstid, så er det en mulighet at isolatene hadde vokst annerledes etter frysing. De var alle dyrket like lenge ved  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  og det var innfrysningstiden og innfrysningens lengden som varierte. Isolatene ble også observert på dag 25 etter å ha stått på  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , som viste at alle platene var overgrodd, men at det var noe forskjell i koloniutseende (disse resultatene er ikke vist). Dette tyder på at artene vokser godt hvis de får mulighet selv etter at de har vært fryst.

#### 4.6 Vekstforsøk - Effekt av ulik fuktighet

I en studie av Comi et al. (2004) ble *Penicillium* spp. hyppig funnet på overflaten av spekeskinke der den relative luftfuktigheten var høyere enn 80-85 % RF. Dette indikerer at muggsoppene kan trives ved høy relativ fuktighet, men det er ikke noe som motsier at de også

kan vokse ved lavere relativ fuktighet. I et produksjonsanlegg for spekemat kan den relative fuktigheten variere, for noen steder kan den være mellom 65 % og 80 % RF. Det er også avhengig når i prosessen det er produksjonen er. Speketiden og modningstrinnene har en sammenheng med fuktighetsnivået og vannaktiviteten som direkte påvirker sammensetningen av muggsoppene (Castellari et al. 2010).

Forsøkene med ulik fuktighet ble ikke som ønsket fordi det viste seg å være utfordrende å oppnå de ønskede fuktighetene i boksene. På grunn av dette ble det bare utført et gjentak. Det var tegn til forskjeller i vekst mellom isolatene men ikke nok til å konkludere noe med sikkerhet.

#### 4.7 Konklusjon

Denne studien viste at identifisering av muggsopp med FT-IR og MALDI-TOF kan bli lovende, men utilstrekkelige databaser gjør metodene foreløpig begrenset. Det var i hovedsak samsvar mellom klassifisering av isolatene ved FT-IR metoden og tradisjonell metodikk/sekvensering. Derfor kan metoden brukes til å gi en indikasjon på hvilke muggsopper som dominerer i anleggene. Dette kan være nyttig informasjon til bedriftene slik at kan sette inn tiltak for å forhindre videre kontaminasjon eller vekst av problem muggsopp.

Vekstforsøkene ga mer kunnskap om hvordan utvalgte muggsopp vokste under de forskjellige betingelsene. Ligger miljøbetingelsene til rette kan det fremme veksten av problemmugg, men med endringer i betingelsene er det mulig å redusere eller forsinke veksten.

## 5 Referanser

- Aish, J., Rippon, E., Barlow, T. & Hattersley, S. (2004). Ochratoxin A. *Mycotoxins in food: detection and control*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p: 307-38.
- Angeletti, S. (2016). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiol Methods*.
- Animalia, landsforbund, K.-o. f. & Nortura. (2007). Trygge spekevarer. *Den norske kjøttbransjes retningslinje av 22.10.2014 for trygg produksjon av spekevarer*: 1-22.
- Animalia. (2009). Muggproblemer og spekemat. *Go`mørning* 5 12-13 (lest 18.04.2017).
- Asefa, D. T., Gjerde, R. O., Sidhu, M. S., Langsrud, S., Kure, C. F., Nesbakken, T. & Skaar, I. (2009). Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (3): 435-9.
- Asefa, D. T., Kure, C. F., Gjerde, R. O., Omer, M. K., Langsrud, S., Nesbakken, T. & Skaar, I. (2010). Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2-3): 131-5.
- Aune, T. (2007). *Næringsmiddel toksikologi Tilsetningsstoffer, miljøgifter og naturlige toksiner*: Høyskoleforlaget AS.
- Bondegaard, P. W. (2016). *Svampe og deres sekundære metabolitter*: Biotech Academy Tilgjengelig fra: <http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/Svampe/Teori/Svampe-og-deres-sekundaere-metabolitter> (lest 18.04.2017).
- Bruker. (2013). *MALDI Biotyper Cultivation and Sample preparation for filamentous Fungi*: Bruker Daltonik GmbH.
- Bruker. (2014). MBT Compass, Software for microorganism identification and classification *Brukerhåndbok*.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*: Tetra Pak Processing Systems AB Lund.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Ferroni, A., Gutmann, L. & Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry*, 44 (1): 104-109.
- Castellari, C., Quadrelli, A. M. & Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 142 (1-2): 149-55.
- Chalupova, J., Raus, M., Sedlarova, M. & Sebel, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv*, 32 (1): 230-41.

- Chen, H. Y. & Chen, Y. C. (2005). Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19 (23): 3564-8.
- 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 (1): 29-34.
- Dantigny, P. & Nanguy, S. P.-M. (2009). Significance of the physiological state of fungal spores. *International journal of food microbiology*, 134 (1): 16-20.
- Deacon, J. (1984). *Introduction to modern mycology. Basic microbiology. Vol. 7*: Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology* 4utg. Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, UK: Blackwell Publishing
- Del Chierico, F., Masotti, A., Onori, M., Fiscarelli, E., Mancinelli, L., Ricciotti, G., Alghisi, F., Dimiziani, L., Manetti, C., Urbani, A., et al. (2012). MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *Journal Proteomics*, 75 (11): 3314-30.
- Enzyscreen.com. (u.å.). "System duetz". Tilgjengelig fra: <http://enzyscreen.com/home.htm> (lest 10.10.2016).
- Ferrara, M., Magista, D., Epifani, F., Cervellieri, S., Lippolis, V., Gallo, A., Perrone, G. & Susca, A. (2016). Study of gene expression and OTA production by *Penicillium nordicum* during a small-scale seasoning process of salami. *International Journal of Food Microbiol*, 227: 51-5.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C. & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International journal of food microbiology*, 33 (1): 85-102.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (2000). Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors I: Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. (red.) b. 6th edition *Introduction to food- and airborne fungi* s. 306-320. Utrecht, Netherlands Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Fischer, G. & Dott, W. (2003). Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Arch Microbiol*, 179 (2): 75-82.
- Fischer, G., Braun, S., Thissen, R. & Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 64 (1): 63-77.
- Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology*, 49 (1): 1-174.

- Frisvad, J. C. & Thrane, U. (2004). Mycotoxin production by common filamentous fungi I: Samson R.A, H. E. S., Frisvad J.C (red.) b. Seventh edition *Introduction to food- and airborne fungi*, s. 321-331: Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht.
- Gilde.no. (u.å.-a). *Pinnekjøtt* Tilgjengelig fra: <http://www.gilde.no/sesong/jul/pinnekjott/> (lest 31.03.2017).
- Gilde.no. (u.å.-b). *Spekeskinke* Tilgjengelig fra: <http://www.gilde.no/sok/?q=spekeskinke> (lest 01.04.17).
- Gori, K., Cantor, M. D., Jakobsen, M. & Jespersen, L. (2011). Production of bread, cheese and meat. I: *Industrial applications*, s. 3-27: Springer.
- Gravesen, S., Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (1994). *Microfungi*: Munksgaard International Publishers Ltd.
- Høberg, E. N. (2016). *Pinnekjøtt* Store norske leksikon Tilgjengelig fra: <https://snl.no/pinnekj%C3%B8tt> (lest 31.03.2017).
- Håseth, T. T. (2012). *Mugg og spekemat* Animalia. Tilgjengelig fra: <http://animalia.no/Slakt--kjott--og-eggkvalitet/Spekematproduksjon/Aktuelt-og-fagstoff/Mugg-og-spekemat/> (lest 18.04.2017).
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S. & Comi, G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiol*, 26 (1): 65-70.
- Iacumin, L., Manzano, M., Andyanto, D. & Comi, G. (2017). Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production. *Food Microbiol*, 62: 188-195.
- Isaac, S. (1998). What factors influence the germination and outgrowth of fungal spores. *Mycologist*, 12: 91-92.
- Jay, J. M. (1987). Meats, poultry and seafoods. I: Beuchat, L. R. (red.) *Food and beverage mycology*, s. 155-175: Springer Science & Business Media.
- Kim, H., Bang, J., Beuchat, L. R. & Ryu, J.-H. (2008). Fate of *Enterobacter sakazakii* attached to or in biofilms on stainless steel upon exposure to various temperatures or relative humidities. *Journal of food protection*, 71 (5): 940-945.
- Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Toubas, D. & Sockalingum, G. D. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of Food Microbiol*, 168-169: 32-41.
- Lecellier, A., Gaydou, V., Mounier, J., Hermet, A., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Toubas, D. & Sockalingum, G. (2015). Implementation of an FTIR



- spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food microbiology*, 45: 126-134.
- Liland, K. H., Kohler, A. & Shapaval, V. (2014). Hot PLS—a framework for hierarchically ordered taxonomic classification by partial least squares. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 138: 41-47.
- Lima, N. & Santos, C. (2017). MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. *Current Opinion in Food Science*, 13: 26-30.
- Lippolis, V., Ferrara, M., Cervellieri, S., Damascelli, A., Epifani, F., Pascale, M. & Perrone, G. (2016). Rapid prediction of ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* on dry-cured meat by MOS-based electronic nose. *International Journal of Food Microbiology*, 218: 71-7.
- Liu, S., Liu, W. & Niu, H. (2015). Supercontinuum Generation With Photonic Crystal Fibers and Its Application in Nano-imaging. I: *Photonic Crystals: InTech*.
- López-Díaz, T.-M. a., Santos, J.-A., García-López, M. a.-L. & Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 68 (1): 69-74.
- López Díaz, T. M., González, C. J., Moreno, B. & Otero, A. (2002). Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiology*, 19 (1): 1-7.
- Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D. & Martinko, J. M. (2010). *Brock Biology of Microorganisms 13th edition*: Benjamin Cummings.
- Mariey, L., Signolle, J., Amiel, C. & Travert, J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational spectroscopy*, 26 (2): 151-159.
- Mazur, P. (1968). Survival of Fungi after freezing and desiccation. I: Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. (red.) b. 3 *The Fungal Population: An Advanced Treatise*, s. 325-385: Academic press
- Moore, D., Robson, G. D. & Trinci, A. P. (2011). *21st century guidebook to fungi with CD*: Cambridge University Press.
- Moretro, T., Heir, E., Mo, K. R., Habimana, O., Abdelgani, A. & Langsrud, S. (2010). Factors affecting survival of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 138 (1-2): 71-7.
- Moss, M. O. (1987). Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. I: *Penicillium and Acremonium*, s. 37-71: Springer.
- Nawrocka, A. & Lamorsk, J. (2013). Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods. I: *Advances in Agrophysical Research*, s. s. 347-367: Intech

- Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Coroller, L., Dantigny, P., Le Panse, S., Weill, A., Mounier, J. & Rigalma, K. (2017). Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 151-160.
- Panda, A., Ghosh, A. K., Mirdha, B. R., Xess, I., Paul, S., Samantaray, J. C., Srinivasan, A., Khalil, S., Rastogi, N. & Dabas, Y. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *J Microbiol Methods*, 109: 93-105.
- Papagianni, M., Ambrosiadis, I. & Filiouis, G. (2007). Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Sci*, 76 (4): 653-7.
- Pitt, J. & Hocking, A. (1999). *Fungi and food spoilage* Second edition utg.: Aspen Publishers, Inc. .
- Riddervold, A. (1993). *Konservering av mat* Teknologisk forlag.
- Rizzato, C., Lombardi, L., Zoppo, M., Lupetti, A. & Tavanti, A. (2015). Pushing the Limits of MALDI-TOF Mass Spectrometry: Beyond Fungal Species Identification. *Journal of Fungi*, 1 (3): 367-383
- Rodriguez, A., Medina, A., Cordoba, J. J. & Magan, N. (2014). The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 178: 113-9.
- Rosso, L. & Robinson, T. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 63 (3): 265-273.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Frisvad, J. C. (2004a). Identification of the common food-borne fungi. I: Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Frisvad, J. C. (red.) b. Seventh edition *Introduction to food- and airborne fungi*, s. 1-279: Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Frisvad, J. C. (2004b). Mycological media. I: b. Seventh edition *Introduction to food- and airborne fungi*, s. 378-382. Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O. & Frisvad, J. C. (2004c). Methods for the detection, isolation and characterization of food-borne fungi. I: R.A., S., E.S., H. & J.C., F. (red.) *Introduction to food- and airborne fungi* s. 283-298. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. & Andersen, B. (2010). *Food and indoor fungi*. Utrecht, the Netherland: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre

- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z. & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Res Microbiol*, 161 (2): 168-75.
- Scaramuzza, N., Diaferia, C. & Berni, E. (2015). Monitoring the mycobiota of three plants manufacturing Culatello (a typical Italian meat product). *International Journal Food Microbiol*, 203: 78-85.
- Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D. & Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiol*, 29 (2): 233-41.
- Shapaval, V., Møretrø, T., Suso, H. P., Åsli, A. W., Schmitt, J., Lillehaug, D., Martens, H., Böcker, U. & Kohler, A. (2010). A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *Journal of biophotonics*, 3 (8-9): 512-521.
- Shapaval, V., Schmitt, J., Møretrø, T., Suso, H., Skaar, I., Åsli, A., Lillehaug, D. & Kohler, A. (2013). Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *Journal of applied microbiology*, 114 (3): 788-796.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, 6: 791.
- snl.no. (2017). *Penicillium*: Store norske leksikon Tilgjengelig fra: <https://snl.no/Penicillium> (lest 27.03.2017).
- Sonjak, S., Licen, M., Frisvad, J. C. & Gunde-Cimerman, N. (2011a). The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiol*, 28 (3): 373-6.
- Sonjak, S., Licen, M., Frisvad, J. C. & Gunde-Cimerman, N. (2011b). Salting of dry-cured meat - A potential cause of contamination with the ochratoxin A-producing species *Penicillium nordicum*. *Food Microbiol*, 28 (6): 1111-6.
- Sorensen, L. M., Jacobsen, T., Nielsen, P. V., Frisvad, J. C. & Koch, A. G. (2008). Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal Food Microbiol*, 124 (1): 58-64.
- Stuart, B. (1997). *Biological applications of infrared spectroscopy*: John Wiley & Sons.
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sunesen, L. O. & Stahnke, L. H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages—selection, application and effects. *Meat Science*, 65 (3): 935-948.
- Tabuc, C., Bailly, J., Bailly, S., Querin, A. & Guerre, P. (2004). Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue de medecine veterinaire*, 155 (5): 287-291.

Toldrá, F. & Aristoy, M., Concepción (2010). Dry-Cured Ham I: Toldrá, F. (red.) *Handbook of meat processing*, s. 351-363: John Wiley & Sons.

UiO.no, I. f. b. (2011). *Sopp* Tilgjengelig fra:

<http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sopp.html> (lest 05.10.2016).

Van Egmond, H. P. (2004). Mycotoxins: Detection, reference materials and regulation I: Samson R.A, H. E. S., Frisvad J.C (red.) b. Seventh edition *Introduction to food- and airborne fungi* s. 332-338. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht

Veterinærinstituttet.no. (2015). *Effektiv produksjon av muggfritt pinnekjøtt og spekemat* Elin Reitehaug Tilgjengelig fra: <http://www.vetinst.no/forskning-innovasjon/p%C3%A5gaende-forskningsprosjekter/effektiv-produksjon-av-muggfritt-pinnekjtt-og-spekemat> (lest 05.10.2016).

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol*, 78: 343-71.

Webster, J. & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*: Cambridge University Press.

## 6 Vedlegg

### 6.1 Muggsoppisolater

Tabell 11. Detaljert oversikt over muggsoppisolater benyttet til forsøkene. Alle isolatene ble benyttet til FT-IR. \*Ett gjentak på FT-IR (isolater fra 2016). \*\*Benyttet til MALDI-TOF. \*\*\*Benyttet til vekstforsøk.

Isolat	Kilde	Opprinnelse	Sted i produksjonen	Uttaks dato	Nummer benyttet på isolat
<i>P. solitum</i> **	A	Luftprøve	Salterom	17.09.2015	8-1
<i>P. solitum</i> **	A	Luftprøve	Klimarom	17.09.2015	8-2
<i>P. solitum</i> ** ***	A	Luftprøve	Røykerom	24.09.2015	8-12
<i>P. solitum</i> **	A	Luftprøve	Salterom	01.10.2015	8-38
<i>P. solitum</i> **	A	Luftprøve	Salterom	12.11.2015	9-58
<i>P. solitum</i> **	A	Luftprøve	Klimarom	26.11.2015	9-68
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Klimarom	10.11.2015	8-63
<i>P. solitum</i> ** ***	B	Luftprøve	Klimarom	10.11.2015	8-64
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Avsaltningsrom	10.11.2015	8-65
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Gang ved klimarom	10.11.2015	8-66
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Klimarom	10.11.2015	8-67
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Spylerom	10.11.2015	8-68
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Varemottak	10.11.2015	8-69
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Varemottak	10.11.2015	8-70
<i>P. solitum</i> **	B	Luftprøve	Pakkerom	10.11.2015	8-75
<i>P. solitum</i> *	A	Luftprøve	Garderobe	30.08.2016	3-1
<i>P. solitum</i> *	A	Luftprøve	Røykerom	30.08.2016	25-1
<i>P. solitum</i> *	A	Luftprøve	Sagerom	30.08.2016	43-1
<i>P. solitum</i> *	A	Sliceravfall	Pakkerom	30.08.2016	61-1
<i>P. solitum</i> *	B	Luftprøve	Kjølerom	28.09.2016	25-2
<i>P. solitum</i> *	B	Svaber/skinke	Kjølerom	28.09.2016	54-1
<i>P. solitum</i> *	B	Luftprøve	Modningsrom	28.09.2016	83-3
<i>P. solitum</i> *	A	Luftprøve	Klimasone	30.08.2016	51-2
<i>P. solitum</i> *	B	Luftprøve	Varemottak	28.09.2016	3-3
<i>P. solitum</i> *	B	Svaber/skinke	Klimarom	28.09.2016	74-1
<i>Penicillium chrysogenum</i> **	A	Luftprøve	Røykerom	24.09.2015	8-11
<i>P. chrysogenum</i> ** ***	A	Luftprøve	Modningsrom	01.10.2015	8-41
<i>P. chrysogenum</i> **	A	Luftprøve	Klimarom	01.10.2015	8-42
<i>P. chrysogenum</i> **	A	Luftprøve	Røykerom	12.11.2015	9-65
<i>P. chrysogenum</i> ** ***	B	Luftprøve	Varemottak	10.11.2015	9-36
<i>P. chrysogenum</i> **	B	Luftprøve	Avsaltningsrom	10.11.2015	9-41
<i>P. chrysogenum</i> **	B	Luftprøve	Gang	10.11.2015	9-46
<i>P. chrysogenum</i> **	VI		Pinnekjøtt	28.05.2014	05/09/01
<i>P. chrysogenum</i> **	C		Spekeskinke	15.12.2006	02/09/63
<i>P. chrysogenum</i> **	Oppland		Ingen info	31.10.2007	03/05/56
<i>P. chrysogenum</i> *	B	Svaber/ventilasjon	Modningsrom	28.09.2016	40-3

<i>P. chrysogenum</i> *	A	Støv	Klimasone	30.08.2016	53-2
<i>P. nordicum</i> **	A	Luftprøve	Kjølerom	01.10.2015	8-34
<i>P. nordicum</i> **	B	Luftprøve	Kjølerom	10.11.2015	8-60
<i>P. nordicum</i> **	B	Luftprøve	Gang	10.11.2015	8-72
<i>P. nordicum</i> ** ***	B	Luftprøve	Kjølerom	10.11.2015	8-74
<i>P. nordicum</i> **	B	Luftprøve	Kjølerom	10.11.2015	8-76
<i>P. nordicum</i> **	C		Spekemat	16.01.2007	03/01/28
<i>P. nordicum</i> **	C		Spekemat	05.07.2007	03/02/81
<i>P. nordicum</i> ** ***	VI		Pinnekjøtt	29.08.2014	06/01/02
<i>P. nordicum</i> **	VI		Pinnekjøtt	29.08.2014	06/01/03
<i>P. nordicum</i> **	VI		Pinnekjøtt	30.09.2014	06/01/07
<i>P. nordicum</i> *	B	Luftprøve	Avsaltingsrom	28.09.2016	15-4
<i>P. nordicum</i> *	B	Luftprøve	Kjølerom	28.09.2016	25-1
<i>P. nordicum</i> *	B	Svaber/vifte	Kjølerom	28.09.2016	37-2
<i>P. nordicum</i> *	B	Svaber/vegg	Kjølerom	28.09.2016	48-1
<i>P. nordicum</i> *	B	Luftprøve	Modningsrom	28.09.2016	82-2
<i>P. nordicum</i> *	B	Luftprøve	Modningsrom	28.09.2016	83-1
<i>P. brevicompactum</i>	A	Luftprøve	Pinnekjøttrom	17.09.2015	8-4
<i>P. brevicompactum</i>	A	Luftprøve	Salterom	24.09.2015	8-10
<i>P. brevicompactum</i>	A	Luftprøve	Røykerom	01.10.2015	8-17
<i>P. brevicompactum</i>	A	Luftprøve	Salterom	12.11.2015	9-63
<i>P. brevicompactum</i>	A	Luftprøve	Røykerom	26.11.2015	9-70
<i>P. brevicompactum</i>	B	Luftprøve	Klimaom	10.11.2015	8-61
<i>P. brevicompactum</i>	B	Luftprøve	Røykerom	10.11.2015	8-71
<i>P. brevicompactum</i>	B	Luftprøve	Varemottak	10.11.2015	8-79
<i>P. brevicompactum</i>	B	Luftprøve	Varemottak	10.11.2015	9-33
<i>P. brevicompactum</i>	B	Luftprøve	Sagerom	10.11.2015	9-37
<i>P. brevicompactum/bialowiezense</i> *	A	Luftprøve	Gang ved modningsrom	30.08.2016	23-2
<i>P. brevicompactum/bialowiezense</i> *	A	Luftprøve	Røykerom	30.08.2016	40-4
<i>P. brevicompactum</i> *	A	Luftprøve	Sagerom	30.08.2016	42-3
<i>P. brevicompactum/bialowiezense</i> *	B	Luftprøve	Avsaltningsrom	28.09.2016	15-2
<i>P. brevicompactum/bialowiezense</i> *	B	Luftprøve	Røykerom	28.09.2016	8-2
<i>P. brevicompactum</i> *	B	Luftprøve	Varemottak	28.09.2016	3-1
<i>P. brevicompactum</i> *	B	Svaber/pinnekjøtt	Modningsrom	28.09.2016	23-1
<i>P. brevicompactum</i> *	B	Luftprøve	Sagerom	28.09.2016	61-2
<i>P. olsonii</i>	VI	Luftprøve	Salterom		8-3
<i>P. olsonii</i>	VI	Luftprøve	Røykerom		8-23
<i>P. olsonii</i>	VI	Luftprøve	Salterom		9-61
<i>P. olsonii</i>	VI	Spekeskinke			2-9-53
<i>P. olsonii</i>	VI	Miljøprøve?			4-9-48
<i>P. olsonii</i> *	A	Luftprøve	Røykerom	30.08.2016	28-2
<i>P. commune</i>	VI	Svaber/skinke	Modningsrom		9-35
<i>P. commune</i>	VI	Luftprøve	Sagerom		8-27
<i>P. commune</i>	VI	Luftprøve	Røykerom		8-81
<i>P. commune</i>	VI	Spekeskinke			3-8-55

<i>P. commune</i>	VI	Spekemat			3-2-45
<i>P. commune</i> *	A	Luftprøve	Sagerom	30.08.2016	43-2
<i>P. commune</i> *	B	Pinnekjøtt	Modningsrom	28.09.2016	24-1
<i>P. corylophilum</i>	VI	Luftprøve	Produksjonsrom		8-8
<i>P. corylophilum</i>	VI	Luftprøve	Klimasone		8-22
<i>P. corylophilum</i>	VI	Luftprøve	Klimarom		9-39
<i>P. corylophilum</i>	VI	Spekemat			3-2-3
<i>P. corylophilum</i>	VI	Luftprøve	Grisehus		6-3-38
<i>P. corylophilum</i> *	A	Luftprøve	Modningsrom	30.08.2016	19-2
<i>P. corylophilum</i> *	A	Svaber/salami	Klimasone	30.08.2016	59-2
<i>P. crustosum</i>	VI	Luftprøve	Pinnekjøttrom		8-9
<i>P. crustosum</i>	VI	Luftprøve	Varemottak		9-32
<i>P. crustosum</i>	VI	Luftprøve	Salterom		9-59
<i>P. crustosum</i>	VI	Spekeskinke			3-1-32
<i>P. crustosum</i>	VI	Luftprøve	Grisehus		6-3-36
<i>P. crustosum</i> *	A	Luftprøve	Sagerom	30.08.2016	42-2
<i>P. expansum</i>	VI	Luftprøve	Røykerom		8-16
<i>P. expansum</i>	VI	Luftprøve	Røykerom		8-24
<i>P. expansum</i>	VI	Luftprøve	Pinnekjøttrom		9-60
<i>P. expansum</i>	VI	Spekeskinke			2-8-44
<i>P. expansum</i>	VI	Spekemat			3-3-46
<i>P. expansum</i> *	A	Luftprøve	Sagerom	30.08.2016	42-4
<i>P. decumbens</i>	VI	Støv	Klimarom		8-21
<i>P. decumbens</i>	VI	Luftprøve	Kjølerom		8-25
<i>P. decumbens</i>	VI	Støv	Klimarom		8-28
<i>P. decumbens</i>	VI	Luftprøve	Røykerom		Y-22
<i>P. decumbens</i>	VI	Neseprøve	Hund		5-7-79
<i>P. decumbens</i>	VI	Luftprøve	Grisehus		6-3-60
<i>P. decumbens</i> *	A	Svaber/vegg	Kjølerom	30.08.2016	70-1
<i>A. niger</i> . **	A	Luftprøve	Salterom	17.09.2015	8-6
<i>A. versicolor</i> **	A	Luftprøve	Røykerom	24.09.2015	8-14
<i>A. versicolor</i> **	A	Svaber/Vegg	Pakkerom	01.10.2015	8-35
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Luftprøve	Røykerom	01.10.2015	8-45
<i>A. versicolor</i> **	A	Svaber/gulv	Pakkerom	01.10.2015	8-46
<i>Aspergillus</i> spp.	A	Luftprøve	Røykerom	01.10.2015	8-47
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Luftprøve	Ute	01.10.2015	8-48
<i>A. versicolor</i> **	A	Svaber/gulv	Pakkerom	01.10.2015	8-49
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Luftprøve	Røykerom	01.10.2015	8-50
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Røykespon	Røykerom	01.10.2015	8-52
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Røykespon	Røykerom	01.10.2015	8-53
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Støv	Røykerom	01.10.2015	8-54
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Støv	Røykerom	01.10.2015	8-55
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Luftprøve	Røykerom	01.10.2015	8-56
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Luftprøve	Trapperom	01.10.2015	8-57
<i>A. creber/versicolor</i> **	B	Luftprøve	Røykerom	10.11.2015	8-73

<i>Aspergillus</i> spp. **	B	Luftprøve	Ute	10.11.2015	9-47
<i>A. fumigatus</i> **	B	Luftprøve	Ute	10.11.2015	9-49
<i>A. penicilloides</i> **	B	Luftprøve	Avsaltningsrom	10.11.2015	9-50
<i>A. eurotium</i> **	B	Luftprøve	Ute	10.11.2015	9-51
<i>Aspergillus</i> spp. **	B	Luftprøve	Gang	10.11.2015	9-52
<i>Aspergillus</i> spp. **	B	Luftprøve	Varemottak	10.11.2015	9-53
<i>Aspergillus</i> spp. **	B	Luftprøve	Klimarom	10.11.2015	9-54
<i>Aspergillus</i> spp. **	B	Luftprøve	Ute	10.11.2015	9-55
<i>Aspergillus</i> spp. **	A	Tarm		28.01.2016	9-30
<i>Aspergillus</i> spp.*	A	Tarm	Råvare	30.08.2016	85-1
<i>Aspergillus</i> spp.*	A	Luftprøve	Garderobe	30.08.2016	3-3
<i>Aspergillus</i> spp.*	A	Luftprøve	Røykerom	30.08.2016	30-3
<i>Aspergillus</i> spp.*	B	Luftprøve	Røykerom	28.09.2016	31-3
<i>Aspergillus</i> spp.*	B	Luftprøve	Ute	28.09.2016	1-1
<i>Aspergillus</i> spp.*	B	Svaber/pinnekjøtt	Klimasone	28.09.2016	72-1



## 6.2 Tillaging av medier

Tabell 12. Tillaging av vekstmedier benyttet til FT-IR og MALDI-TOF.

Vekstmedier	Produsent	Tillaging	Bruk
Yeast Extract Agar	Oxoid, Basingstoke, England	23g til 1l destillert vann. Autoklavert 121 °C i 15 minutter.	FT-IR
Malt Extract Broth	Fluka, Sigma-aldrich, India	20g til 1l destillert vann. Autoklavert 115 °C i 10 minutter.	FT-IR
Malt Extract Agar	Oxoid, Basingstoke, England	50g til 1l destillert vann. Autoklavert 115 °C i 10 minutter.	MALDI-TOF
Sabouraud dextrose broth	Medieproduksjonen VI	Medieproduksjonen VI	MALDI-TOF

Tabell 13. Oppskrift og tillaging av Malt Extract Agar benyttet til de ulike vekstforsøkene som salt, frysing og fuktighet.

Produktnavn	Produsent	Innveid mengde	Tillaging	Bruk
Maltekstrakt	Oxoid, Basingstoke, England	8 g	Innveid mengde ble tilsatt destillert vann og blandet godt. Autoklavert 121°C i 15 minutter	Vekstforsøk
Bakteriologisk pepton	Oxoid, Basingstoke, England	0,4 g		
Glukose*	Sigma-aldrich	8 g		
Bakteriologisk agar	Oxoid, Basingstoke, England	8 g		
Destillert H <sub>2</sub> O		400 ml		
NaCl	Merck, Darmstadt, Tyskland	- 8,5 % - 9 % - 9,5 % - 10 % - 10,5 % - 11 %	Blandet med MEA og autoklavert	Vekstforsøk med NaCl

\*D-(+)-Glucose monohydrate

Mediene ble sterilisert i en autoklav (CertoClav Sterilizer GmbH, Traun, Østerrike).

### 6.3 Beregninger

Formel benyttet til beregning av salt (NaCl):

$$\% \text{ NaCl} \times \frac{\text{Totale mengden}}{100} = \text{Mengde tilsatt NaCl}$$

Eksempel: 9 % NaCl = 36 gram NaCl tilsatt mediet

Beregning av areal:

Arealet ble beregnet i excel med formelen:

$$3,1416 * \text{radius}^2 = \text{arealet}$$

### 6.4 Statistikk hovedforsøk salt (NaCl)

Tabell 14. Rådata for statistikk analysen viser at alle P-verdier ( $Pr(>F)$ ) er mindre enn 0,004, altså høyst signifikante.

Anova Table (Type II tests)

Response: areal

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
tid	12210	1	528.5116	< 2.2e-16	***
salt	19634	1	849.9023	< 2.2e-16	***
isolat	86177	5	746.0599	< 2.2e-16	***
tid:salt	197	1	8.5165	0.003951	**
tid:isolat	8431	5	72.9931	< 2.2e-16	***
salt:isolat	2018	5	17.4725	3.501e-14	***
Residuals	4320	187			

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

## 6.5 Rådata innledende forsøk med salt (NaCl)

Tabell 15. Rådata for *P. solitum* isolat 8-12. 1. gjentak var kontaminert. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne.

	<i>P. solitum</i> 8-12					
	1. gjentak		2.gjentak		Gj. radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl						
Dag 2			0	0	0	0,00
Dag 3			2,5	3	3	2,83
Dag 4			4,5	4,5	4,5	4,50
Dag 5						
Dag 6			7,5	8	8	7,83
Dag 7			9	9,5	9	9,17
Dag 8			10,5	11	10,5	10,67
9 % NaCl						
Dag 2			1,5	1	2	1,50
Dag 3			3,5	3	3,5	3,33
Dag 4			5	5	5	5,00
Dag 5						
Dag 6			8,5	7	9	8,17
Dag 7			10	10	10	10,00
Dag 8			11,5	11	11	11,17
9,5 % NaCl						
Dag 2			1,5	1,5	1,5	1,50
Dag 3			3	3	3	3,00
Dag 4			5	4,5	4,5	4,67
Dag 5						
Dag 6			8	8	8	8,00
Dag 7			10	9	9,5	9,50
Dag 8			11	11	11	11,00
10 % NaCl						
Dag 2			1,5			1,50
Dag 3			2	3	3	2,67
Dag 4			3,5	4,5	5	4,33
Dag 5						
Dag 6			6,5	7	7	6,83
Dag 7			8,5	9	9	8,83
Dag 8			10	10	10,5	10,17
10,5 % NaCl						
Dag 2			0	0	0	0,00
Dag 3			2,5	2,5	3	2,67
Dag 4			4	4	4	4,00
Dag 5						
Dag 6			7	6,5	7	6,83
Dag 7			8,5	8,5	8,5	8,50
Dag 8			9	9,5	10	9,50
11 % NaCl						
Dag 2			2	1,5		1,75
Dag 3			3,5	3,5	2,5	3,17
Dag 4			5	5	4,5	4,83
Dag 5						
Dag 6			7,5	7,5	7	7,33
Dag 7			9,5	10	8,5	9,33
Dag 8			10	10	10	10,00
Kontroll						
Dag 2			3	3	3	3,00
Dag 3			6	6	6	6,00
Dag 4			8,5	9	8,5	8,67
Dag 5						
Dag 6			13	13,5	13	13,17
Dag 7			15	15	15	15,00
Dag 8						

Tabell 16. Rådata for *P. solitum* 8-64 i det innledende forsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for to gjentak.

<i>P. solitum</i> 8-64								
	1. gjentak			2. gjentak			Gj. radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl								
Dag 2	1,5	1,5	1,5				1,50	7,07
Dag 3	3	3	2,5	3	3	3	2,92	26,73
Dag 4	4	4	4	4,5		4,5	4,20	55,42
Dag 5				5		5,5	5,25	86,59
Dag 6	7,5	7	7	6		6	6,70	141,03
Dag 7	8,5	8	7,5	7,5		8	7,90	196,07
Dag 8	9	9	8,5	7,5		8,5	8,50	226,98
9 % NaCl								
Dag 2	0	0	0				0,00	
Dag 3	1,5	1,5	2	3	3	3	2,33	17,10
Dag 4	3,5	3	3,5	3,5	4	3,5	3,50	38,48
Dag 5				5			5,00	78,54
Dag 6	6,5	5,5	6	6			6,00	113,10
Dag 7	7,5	7	7,5	7,5			7,38	170,87
Dag 8	8,5	8	8	8			8,13	207,39
9,5 % NaCl								
Dag 2	1	1,5					1,25	4,91
Dag 3	2	2,25		3	2	3	2,45	18,86
Dag 4	3,5	3,5		3,5	3	3,5	3,40	36,32
Dag 5				5,5	4	5	4,83	73,39
Dag 6	6	6,5		6	5	5,5	5,80	105,68
Dag 7	7	8		7,5	6	7	7,10	158,37
Dag 8	8	8,5		8	7	7	7,70	186,27
10 % NaCl								
Dag 2	0	0	0				0,00	0,00
Dag 3	2	1,5	1,5	3	3	3	2,33	17,10
Dag 4	3,5	3	2,5	3,5	3	3,5	3,17	31,50
Dag 5				4	4	4,5	4,17	54,54
Dag 6	5,5	5,5	5,5				5,50	95,03
Dag 7	7	6,5	6,5				6,67	139,63
Dag 8	7,5	7,5	7,5				7,50	176,72
10,5 % NaCl								
Dag 2	0	0	0				0,00	0,00
Dag 3	2	1,5	1	3	2,5	2,5	2,08	13,64
Dag 4	3	2,5	2,5	3	3	3,5	2,92	26,73
Dag 5				4,5	3,5	4	4,00	50,27
Dag 6		5	4,5	5	4,5	5	4,80	72,38
Dag 7		6	6	6	5,5	6	5,90	109,36
Dag 8		7,5	7	7	6,5	7	7,00	153,94
11 % NaCl								
Dag 2	0	0	0					
Dag 3		1,5	1	2,5	2,5	2,5	2,00	12,57
Dag 4		2,5	2,5		3,5		2,83	25,22
Dag 5				5	4,5	4	4,50	63,62
Dag 6		4,5	5	5,5	5	5	5,00	78,54
Dag 7		6	5,5	7,5	7,5	6	6,50	132,73
Dag 8			7	8	8,5	6,5	7,50	176,72
Kontroll								
Dag 2		3	3				3,00	28,27
Dag 3		5	5		6		5,33	89,36
Dag 4		7	7	7,5	7,5	7,5	7,30	167,42
Dag 5				9	9		9,00	254,47
Dag 6		10	10,5		11		10,50	346,36
Dag 7		11,5	12		12		11,83	439,91
Dag 8								

Tabell 17. Rådata for *P. nordicum* 6-1-2 i det innledende forsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for to gjentak.

<i>P. nordicum</i> 6-1-2								
	1. gjentak			2. gjentak			Gj. radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	4	4	3,5	3	3	3	3,42	36,67
Dag 4	6	5,5	5,5	4,5	5	5	5,25	86,59
Dag 5	8,5	8	7,5				8,00	201,06
Dag 6	9,5	10	9,5	8,5	8,5	9	9,17	263,98
Dag 7	12	11,5	12	10,5	11	11	11,33	403,52
Dag 8	13,5	13	12,5	12	12,5	12,5	12,67	504,05
9 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2,5	3	3,5	3	2	3	2,83	25,22
Dag 4	5,5	5	5	4,5	4	5	4,83	73,39
Dag 5	7,5	7	7				7,17	161,36
Dag 6	9	8,5	8,5	8,5	8	8,5	8,50	226,98
Dag 7	11	11	10,5	10,5	10	10,5	10,58	351,88
Dag 8	12,5	12	11	12,5	11,5	12,5	12,00	452,39
9,5 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	3	3	2,5	2,5	3	2	2,67	22,34
Dag 4	5	5	4,5	5	5	4	4,75	70,88
Dag 5	7	7	6,5				6,83	146,70
Dag 6	9	9	8,5	8	9	8	8,58	231,45
Dag 7	10,5	10,5	10	10	10,5	9	10,08	319,42
Dag 8	12	12	11,5	12	12,5	11,5	11,92	446,13
10 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	3	2,5	2,5	0	1,5	2,5	2,00	12,57
Dag 4	4,5	4	4	2,5	3,5	4,5	3,83	46,16
Dag 5	6,5	6	6				6,17	119,47
Dag 6	8	8	8	6	7	8	7,50	176,72
Dag 7	10	10	9	8	8,5	10	9,25	268,80
Dag 8	11	10,5	10,5	10	10	11,5	10,58	351,88
10,5 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2,5	2	2	1,5	1	2,5	1,92	11,54
Dag 4	4	4	4	3,5	3	4	3,75	44,18
Dag 5	6,5	6	6				6,17	119,47
Dag 6	8	7,5	7	7	6,5	8	7,33	168,95
Dag 7	9,5	8,5	8,5	8,5	8,5	9	8,75	240,53
Dag 8	11	11	10	10	10	11	10,50	346,36
11 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2	0,5	0	1	2	2,5	1,33	5,59
Dag 4	3,5	2,5	1,5	3	3,5	4,5	3,08	29,87
Dag 5	5,5	5	3,5				4,67	68,42
Dag 6	7,5	6	5	7	7	8	6,75	143,14
Dag 7	9	7,5	6	8,5	8,5	9,5	8,17	209,53
Dag 8	10	9	8,5	10,5	9	9	9,33	273,67
Kontroll								
Dag 2				2,5	2,5	1,5	2,17	14,75
Dag 3	5	5	4,5	5	4,5	4	4,67	68,42
Dag 4	6	7	6,5	7	7	6,5	6,67	139,63
Dag 5	8,5	8,5	8,5				8,50	226,98
Dag 6	10,5	11	11	11	11,5	10,5	10,92	374,40
Dag 7	13	13	12,5	12,5	13	12,5	12,75	510,71
Dag 8	13,5	14	13,5	14	15	14	14,00	0,00

Tabell 18. Rådata for *P. nordicum* 8-74 i det innledende forsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for to gjentak.

	<i>P. nordicum</i> 8-74							
	1. gjentak			2. gjentak			Gj. radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl								
Dag 2				3			3,00	28,27
Dag 3	3,5	3,5	4	5,5	2	2,5	3,50	38,48
Dag 4	5,5	5,5	6	7	4,5	5	5,58	97,94
Dag 5	7,5	8	8				7,83	192,77
Dag 6	9,5	9,5	10	11	8,5	9	9,58	288,53
Dag 7	10,5	10,5	11,5	12	10	11,5	11,00	380,13
Dag 8	13	12,5	13,5	13	12,5	12,5	12,83	517,40
9 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2,5	3	3,5	2,5	3,5	3	3,00	28,27
Dag 4	5	5,5	5,5	4,5	5,5	5,5	5,25	86,59
Dag 5	7	7	7,5				7,17	161,36
Dag 6	8,5	9	9,5	8,5	10	10	9,25	268,80
Dag 7	10	11	11,5	10	11	11	10,75	363,05
Dag 8	12	12	12,5	11,5	13	12,5	12,25	471,44
9,5 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2,5	3,5	3,5	2	1,5	1,5	2,42	18,35
Dag 4	4,5	5,5	5,5	4	3,5	3,5	4,42	61,28
Dag 5	6,5	7,5	8				7,33	168,95
Dag 6	8,5	8,5	9,5	8	7	7,5	8,17	209,53
Dag 7	11	10,5	10,5	10	8,5	9,5	10,00	314,16
Dag 8	12	11,5	12,5	12	10	11	11,50	415,48
10 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2,5	3	3,5	1,5	2,5	1,5	2,42	18,35
Dag 4	4	4,5	5	3,5	4,5	3,5	4,17	54,54
Dag 5	6	7	7,5				6,83	146,70
Dag 6	8	8,5	8,5	7,5	8	7,5	8,00	201,06
Dag 7	9,5	10	10,5	9,5	10	9	9,75	298,65
Dag 8	11	11,5	12	10,5	11,5	10,5	11,17	391,74
10,5 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	1,5	1,5	2,5	2	1	1	1,58	7,88
Dag 4	3	3,5	4	4	3,5	3	3,50	38,48
Dag 5	5	5,5	6				5,50	95,03
Dag 6	6,5	7	7,5	7,5	7	6,5	7,00	153,94
Dag 7	8	8,5	8,5	9	8	8	8,33	218,17
Dag 8	10	10	10	11	10	10	10,17	324,72
11 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	0	1,5	2,5	0	0	0	0,67	1,40
Dag 4	2,5	3	4	0	2,5	2,5	2,42	18,35
Dag 5	4,5	4,5	5,5				4,83	73,39
Dag 6	6	7	7	3	6	6	5,83	106,90
Dag 7	8	8	8,5	4,5	7,5	7,5	7,33	168,95
Dag 8	9	10	10,5	6	9	9	8,92	249,78
Kontroll								
Dag 2					2		2,00	12,57
Dag 3	4	4	4,5	3,5	4	3,5	3,92	48,19
Dag 4	6	6	6,5	5	6	5	5,75	103,87
Dag 5	7,5	7,5	8				7,67	184,66
Dag 6	9,5	9,5	10	8,5	9,5	9	9,33	273,67
Dag 7	11	10,5	12	10	11	10,5	10,83	368,70
Dag 8	12	12	12,5	11,5	12,5	12	12,08	458,70

Tabell 19. Rådata for *P. chrysogenum* 8-41 i det innledende forsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for to gjentak.

<i>P. chrysogenum</i> 8-41									
	1. gjentak			2. gjentak			Gj. radius	Areal (mm <sup>2</sup> )	
8,5 % NaCl									
Dag 2				2,5	2,5	2	2,33	17,10	
Dag 3	4,5	4	4,5	5,5	5	4,5	4,67	68,42	
Dag 4	6	5,5	5,5	8	6,5	6	6,25	122,72	
Dag 5	7,5	7,5	7,5				7,50	176,72	
Dag 6	9	8,5	8,5	11	10,5	9,5	9,50	283,53	
Dag 7	10,5	10	10	13	12	11,5	11,17	391,74	
Dag 8	12	12	12	14	13,5	12,5	12,67	504,05	
9 % NaCl									
Dag 2					2	2	2,00	12,57	
Dag 3	4,5	4,5	4		4,5	4,5	4,40	60,82	
Dag 4	6,5	6,5	5		7	7,5	6,50	132,73	
Dag 5		7,5	7				7,25	165,13	
Dag 6		9,5	8		10	10	9,38	276,12	
Dag 7		11,5	10		12	12	11,38	406,49	
Dag 8		12,5	11			13,5	12,33	477,87	
9,5 % NaCl									
Dag 2					2	2	2,00	12,57	
Dag 3	4,5	3,5	3		4	4	3,80	45,36	
Dag 4	6	5,5	5		6,5	6	5,80	105,68	
Dag 5	7,5	6,5	6				6,67	139,63	
Dag 6	9	8	7,5			9	8,38	220,35	
Dag 7	10,5	9	8			10	9,38	276,12	
Dag 8	11,5	11					11,25	397,61	
10 % NaCl									
Dag 2				1,5	2	1,5	1,67	8,73	
Dag 3	3,5	4	3,5	4	4	4	3,83	46,16	
Dag 4	5,5	5,5	5	6	6	6,5	5,75	103,87	
Dag 5	6,5	7	6				6,50	132,73	
Dag 6	7,5	8	7	9	9	9	8,25	213,83	
Dag 7	9	9	8	11	10,5	11	9,75	298,65	
Dag 8	10	10,5	9,5	12	12	12	11,00	380,13	
10,5 % NaCl									
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00	
Dag 3	3,5	3	3	3	2,5	2,5	2,92	26,73	
Dag 4	6	5	4,5	5	4,5	4	4,83	73,39	
Dag 5	7	6	5,5				6,17	119,47	
Dag 6	8	7,5	7	7,5	7	6,5	7,25	165,13	
Dag 7	10	9	8	8,5	8	8	8,58	231,45	
Dag 8	11	10,5		10	9,5	9	10,00	314,16	
11 % NaCl									
Dag 2				1,5	1,5	2	1,67	8,73	
Dag 3	3,5	2,5	2,5	3	3,5	3,5	3,08	29,87	
Dag 4	5	3,5	3	5	5,5	6	4,67	68,42	
Dag 5	6	5	4,5				5,17	83,86	
Dag 6	7,5	6,5	5,5	7,5	8	8,5	7,25	165,13	
Dag 7	8,5	7,5	7	9	9,5	10	8,58	231,45	
Dag 8	9,5	9	8	10	10,5	11	9,67	293,57	
Kontroll									
Dag 2				3	3,5	3,5	3,33	34,91	
Dag 3	5	5	5	5,5	5,5	5,5	5,25	86,59	
Dag 4	6,5	6,5	6,5	7,5	8	7	7,00	153,94	
Dag 5	8,5	8,5	8,5				8,50	226,98	
Dag 6	10,5	10,5	10	10,5	11	11,5	10,67	357,44	
Dag 7	12	12	12	12,5	13	12,5	12,33	477,87	
Dag 8	13	13	13	13,5	14	14	13,42	565,51	

Tabell 20. Rådata for *P. chrysogenum* 9-36 i det innledende forsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for to gjentak.

	<i>P. chrysogenum</i> 9-36						Gj. radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
	1. gjentak			2. gjentak				
8,5 % NaCl								
Dag 2						2,5	2,50	19,64
Dag 3	4	4,5	5,5	2		5	4,20	55,42
Dag 4	7	7	7,5	4,5	3	8	6,17	119,47
Dag 5	9,5	10	10,5				10,00	314,16
Dag 6	12		13	10	9	13,5	11,50	415,48
Dag 7	14,5		15,5	13	11,5	15,5	14,00	615,75
Dag 8	16		17	15,5	15		15,88	791,73
9 % NaCl								
Dag 2				2	2	2	2,00	12,57
Dag 3	3,5	4	5	4,5	4,5	4,5	4,33	58,99
Dag 4	6	6,5	7				6,50	132,73
Dag 5	8,5	9	10				9,17	263,98
Dag 6	11	12	13			12	12,00	452,39
Dag 7	14	15	15			14	14,50	660,52
Dag 8	15,5	15,5	16				15,67	771,09
9,5 % NaCl								
Dag 2				2			2,00	12,57
Dag 3	3,5	3,5	4,5		3,5	3,5	3,70	43,01
Dag 4	5,5	6			6	5,5	5,75	103,87
Dag 5	8	8,5					8,25	213,83
Dag 6	10,5	11			11	10,5	10,75	363,05
Dag 7	12,5	13,5			13	13	13,00	530,93
Dag 8	14	15					14,50	660,52
10 % NaCl								
Dag 2				2	1,5	1,5	1,67	8,73
Dag 3	3	3,5	4	4,5	4	4	3,83	46,16
Dag 4	5	6			6,5	6	5,88	108,43
Dag 5	7,5	8					7,75	188,69
Dag 6	10	10,5		12,5	11	11,5	11,10	387,08
Dag 7	12,5	12,5		14	14	13,5	13,30	555,72
Dag 8	14,5	15		16	15,5	15	15,20	725,84
10,5 % NaCl								
Dag 2				0	0	0	0,00	0,00
Dag 3	2,5	3,5	4	4	3,5	3,5	3,50	38,48
Dag 4	4,5	6	6,5	6,5	6	6	5,92	109,98
Dag 5	7	8					7,50	176,72
Dag 6	9	10,5		11	11	11	10,50	346,36
Dag 7	11	12,5		13,5	13	13	12,60	498,76
Dag 8	13	14,5		15	15	15	14,50	660,52
11 % NaCl								
Dag 2				1	1	1	1,00	3,14
Dag 3	2,5	3,5	3,5	3,5	3	3,5	3,25	33,18
Dag 4	4,5	6	6	6	5	6	5,58	97,94
Dag 5	7	7,5					7,25	165,13
Dag 6	9	9		10	10	10,5	9,70	295,59
Dag 7	11	11		13	12,5	12,5	12,00	452,39
Dag 8	13			14	14	15	14,00	615,75
Kontroll								
Dag 2				3	3	2,5	2,83	25,22
Dag 3	6	6,5	7	6	6	6	6,25	122,72
Dag 4	8	8	8,5	9	8,5	8,5	8,42	222,55
Dag 5	10	10,5	11				10,50	346,36
Dag 6	12	12,5	12,5	13	13	13	12,67	504,05
Dag 7	12,5	13	13,5				13,00	530,93
Dag 8	14	15	15				14,67	675,79



## 6.6 Rådata hovedforsøk med salt (NaCl)

Tabell 21. Rådata *P. solitum* 8-12 i hovedforsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for tre gjentak.

	<i>P. solitum</i> 8-12										Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
	3.gjentak			4.gjentak			5.gjentak					
8,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	1,5	1	1	2	2	3	2	3	2	1,94	11,88	
Dag 4	3	3	2,5	3,5	3,5	4,5	4	5	4	3,67	42,24	
Dag 5	4,5	4,5	4	5	5	5,5	5	5,5	5	4,89	75,09	
Dag 6	5,5	5,5	5,5	6,5	6,5	7,5	7	7,5	7	6,50	132,73	
Dag 7	6,5	7	7	8	8	9	8,5	9	9	8,00	201,06	
Dag 8	8	8	8	9,5	9,5	10	10	10	10,5	9,28	270,42	
9 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	1	1	1	2,5	2,5	2	2,5	2	2,5	1,89	11,21	
Dag 4	3,5	2,5	3	4	4	3,5	4	3,5	4	3,56	39,72	
Dag 5	5	4	5	5	5,5	5	5	5	5,5	5,00	78,54	
Dag 6	6	5	6	6,5	7	6,5	6,5	6	7	6,28	123,81	
Dag 7	7,5	6	6	8	8	8	8	7,5	8,5	7,50	176,72	
Dag 8	8,5	7,5	8,5	10	10	10	10	8,5	10	9,22	267,19	
9,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3				1	2	2	2,5	2	2,5	2,00	12,57	
Dag 4	2,5	3	3	3	3	3,5	4	3,5	4	3,28	33,75	
Dag 5	5	4,5	4	5	5	5	5	5	5,5	4,89	75,09	
Dag 6	5,5	5	5	6	6	6,5	6,5	6	7	5,94	111,01	
Dag 7	7	7	6,5	8	7,5	8	8	7,5	8,5	7,56	179,34	
Dag 8	8	7,5	8	9	9	10	10	8,5	10	8,89	248,23	
10 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3				2,5	2	1,5	2	2	2,5	2,08	13,64	
Dag 4	2,5	2	3	4	4	3	4	3,5	4,5	3,39	36,08	
Dag 5	4	3,5	4	6	5	5	5	4	5	4,61	66,80	
Dag 6	5	4,5	4,5	7	6	6	6	6	6,5	5,72	102,87	
Dag 7	6,5	6	6	8	7,5	7,5	7,5	7,5	8	7,17	161,36	
Dag 8	7	7	7,5	10	9	9	9	9	9	8,50	226,98	
10,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3							2	2	1	1,67	8,73	
Dag 4	3	1,5	2	2,5	3	2,5	3	3	3	2,61	21,42	
Dag 5	4,5	3,5	3,5	5	4,5	3,5	4	4	4	4,06	51,67	
Dag 6	5,5	5	4,5	6	5	4,5	5	5	5	5,06	80,30	
Dag 7	7,5	6	6	7	7	6	6	7	6,5	6,56	135,01	
Dag 8	8,5	7,5	7,5	8	8	7,5	7,5	8,5	8	7,89	195,52	
11 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3												
Dag 4	1,5	1	2	2,5	3	2	2	1,5	1,5	1,89	11,21	
Dag 5	2,5	2,5	3,5	5	4,5	4	3	3	3,5	3,50	38,48	
Dag 6	3,5	3,5	4	5,5	5,5	5	5	4	4	4,44	62,06	
Dag 7	5	5	5	6	7	6	5,5	5	5,5	5,56	96,96	
Dag 8	6	5,5	6	7,5	8	7,5	7,5	6,5	7,5	6,89	149,09	
Kontroll												
Dag 2												
Dag 3	4	5	4,5	5	5	5,5	5	5,5	5	4,94	76,80	
Dag 4	7	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	8	8	7,56	179,34	
Dag 5	9,5	10	10	10	10	10	10	10,5	10	10,00	314,16	
Dag 6	12	12	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	13	12,5	12,44	486,52	
Dag 7	14	14,5	15	14	15	15	15	15	15	14,72	680,92	
Dag 8	15	15	16,5	16	16	16	16	16,5	16,5	15,94	798,67	

Tabell 22.Rådata *P. solitum* 8-64 12 i hovedforsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for tre gjentak.

	<i>P. solitum</i> 8-64										Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
	3.gjentak			4.gjentak			5.gjentak					
8,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	3,5	2,5	2,5	1,5	1	2					2,17	14,75
Dag 4	4	3,5	4	2,5	2,5	2,5	3	2	2	2	2,89	26,22
Dag 5	5	4	4,5	4	4	4,5	4,5	3	2,5	4,00	50,27	
Dag 6	6	5	5,5	5	5	5	5,5	4	4	5,00	78,54	
Dag 7	7	5,5	6,5	6	6	7	6	5	5,5	6,06	115,20	
Dag 8	7,5	6	7	7,5	7,5	7,5	7,5	6,5	6,5	7,06	156,39	
9 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	2,5	2,5		2	1,5	2					2,10	13,85
Dag 4	3,5	4	4	2,5	2,5	3	2	2	1,5	2,78	24,24	
Dag 5	4,5	4,5	4,5	3,5	4	4	2,5	3	2,5	3,67	42,24	
Dag 6	5	5	5,5	5	5	5,5	4	4,5	4	4,83	73,39	
Dag 7	6,5	6	6	6	6	6,5	5	5	5	5,78	104,88	
Dag 8	7	6,5	7	7,5	7,5	7,5	5,5	6	6	6,72	141,96	
9,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	2	2	2,5								2,17	14,75
Dag 4	2,5	2,5	3	2	2	1,5	2	2	1,5	2,11	14,00	
Dag 5	4	3,5	4	3	3		2,5	3	2,5	3,19	31,92	
Dag 6	4,5	5	4,5	4,5	4,5		4	4,5	4	4,44	61,86	
Dag 7	5,5	5,5	6	5	5		5	5	5	5,25	86,59	
Dag 8	6,5	6	6,5	7	6,5		5,5	6	6	6,25	122,72	
10 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	2	2	2								2,00	12,57
Dag 4	2,5	2,5	3	2	2	2,5	1,5	1,5	1,5	2,11	14,00	
Dag 5	3,5	4	4	3,5	3	3,5	2	2	2,5	3,11	30,41	
Dag 6	4	4,5	4,5	4	4,5	4,5	3,5	3,5	3,5	4,06	51,67	
Dag 7	5,5	5,5	5,5	5	5,5	5,5	4	5	5	5,17	83,86	
Dag 8	6	6,5	6	6,5	7	7	5,5	6	6	6,28	123,81	
10,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3	2	2	2								2,00	12,57
Dag 4	3	2,5	2,5			1	1	1,5	1	1,79	10,02	
Dag 5	4	4	3,5		1,5	2,5	2,5	2,5	2	2,81	24,85	
Dag 6	5	5	4,5		2,5	3	3,5	3,5	3	3,75	44,18	
Dag 7	6	6,5	6		3,5	4	4	4,5	4	4,81	72,76	
Dag 8	7	7	6,5		5	5,5	5,5	6	5,5	6,00	113,10	
11 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3												
Dag 4	2	2	2	1	1,5	1	2	1	1	1,50	7,07	
Dag 5	2,5	2,5	2,5	2	3	2,5	2,5	2	2,5	2,44	18,77	
Dag 6	3,5	3,5	3,5	3	3,5	3	3,5	2,5	3	3,22	32,62	
Dag 7	4	4,5	4	4	5	4	4	4	4	4,17	54,54	
Dag 8	5	5	5	5	6	5,5	5,5	5	5	5,22	85,68	
Kontroll												
Dag 2												
Dag 3	4,5	5	5	4,5	5	4,5	4,5	4	4,5	4,61	66,80	
Dag 4	6,5	6	6,5	6	6	5,5	5,5	5	6	5,89	108,95	
Dag 5	8	8	8,5	8	7,5	7,5	7	6,5	7,5	7,61	181,99	
Dag 6	9,5	10	10	10	10	9,5	9	8,5	9,5	9,56	286,86	
Dag 7	11	11		11	11	11	10,5	10	11,5	10,88	371,54	
Dag 8	12	12,5		12,5	12,5	12,5	12,5	12	12,5	12,38	481,11	

Tabell 23. Rådata *P. nordicum* 6-1-2 12 i hovedforsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for tre gjentak.

<i>P. nordicum</i> 6-1-2											
	3.gjentak			4.gjentak			5.gjentak			Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3		2,5		4	4	4	2			3,30	34,21
Dag 4		4,5		6	6	6	4,5	4	3	4,86	74,12
Dag 5		6		8	8	8	6	6	5	6,71	141,63
Dag 6		8		10	10	10	7,5	7,5	7	8,57	230,81
Dag 7		10		11,5	12	12	10	10	9	10,64	355,85
Dag 8		12		13,5	13,5	13,5	12,5	12	11	12,57	496,50
9 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				4	4	4				4,00	50,27
Dag 4		2		6	6	6	3	2	2,5	3,93	48,49
Dag 5		3,5		8	8	8	4	4	4	5,64	100,03
Dag 6		5,5		10	10	10	6	5,5	6	7,57	180,10
Dag 7		7,5		12	12	12	8	7,5	8	9,57	287,81
Dag 8		10		14	14	14	10	9	10	11,57	420,65
9,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				3,5	4	4	2,5	2	2,5	3,08	29,87
Dag 4	1,5		2	6	6	6	4	3,5	4	4,13	53,46
Dag 5	3		3,5	7,5	8	8	5	5	5,5	5,69	101,62
Dag 6	5		5	10	10	10	6,5	6	7	7,44	173,78
Dag 7	7		7	11	11	11,5	8	7,5	8,5	8,94	250,95
Dag 8	8,5		8,5	13,5	13,5	14	10	8,5	10	10,81	367,28
10 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				3,5	4	4	2				0,00
Dag 4				5,5	6	6	4	1,5	2,5	4,25	56,75
Dag 5				7	8	7,5	6	3	5	6,08	116,26
Dag 6				9	9	9	8	5	6,5	7,75	188,69
Dag 7				10	11	11	10	7,5	9	9,75	298,65
Dag 8				13	13	13	12	9	11	11,83	439,91
10,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				2,5	3					2,75	23,76
Dag 4		1		5	5		1,5	2	2,5	2,83	25,22
Dag 5		4		6	7		3	4	4	4,67	68,42
Dag 6		5,5		8,5	8		5	6	6	6,50	132,73
Dag 7		7,5		10	9,5		7	7,5	8	8,25	213,83
Dag 8		9,5		12,5	12,5		9	10	10	10,58	351,88
11 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				3,5	3	3				3,17	31,50
Dag 4				5,5	5	5	2		1	3,70	43,01
Dag 5			2	7,5	6,5	7	4		2,5	4,92	75,94
Dag 6			3,5	9	8,5	8,5	5,5		4	6,50	132,73
Dag 7			5	10,5		10,5	7		6	7,80	191,13
Dag 8			7	12,5		12,5	9		8	9,80	301,72
Kontroll											
Dag 2											
Dag 3			2,5	5		6	4,5	3,5	3,5	4,17	54,54
Dag 4			4,5	7,5		8	6,5	5,5	5	6,17	119,47
Dag 5			6,5	10		10,5	8,5	7,5	7,5	8,42	222,55
Dag 6			8,5	12		12,5	11	10	10	10,67	357,44
Dag 7			11	14		14	13	12	12	12,67	504,05
Dag 8			13,5	16		15	15	13	13,5	14,33	645,42

Tabell 24. Rådata *P. nordicum* 8-74 i hovedforsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for tre gjentak.

		<i>P. nordicum</i> 8-74										
		3.gjentak			4.gjentak			5.gjentak			Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3					4	4	2,5	2,5	3,5	3,30	34,21	
Dag 4		1,5			6,5	6	5	5	6	5,00	78,54	
Dag 5		3,5			8,5	8,5	6	6,5	7,5	6,75	143,14	
Dag 6		5			10	10	8,5	8	10	8,58	231,45	
Dag 7		7,5			12	11,5	10	11	11,5	10,58	351,88	
Dag 8		9,5			13	13,5	12,5	12,5	13	12,33	477,87	
9 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3					4,5	4	4,5	2	2,5	1,5	3,17	31,50
Dag 4		1,5			7	6,5	7	4	4,5	4	4,93	76,31
Dag 5		3			8	8	8,5	5,5	6	5,5	6,36	126,96
Dag 6		5			10	10	10	7,5	8	7,5	8,29	215,68
Dag 7		7,5			12	12	12	9	10	9	10,21	327,77
Dag 8		9,5			14	14	14	11	12,5	11	12,29	474,19
9,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3					4,5	4,5	4,5	2	1,5	2	3,17	31,50
Dag 4		2,5			6	6,5	6	4	3	3,5	4,50	63,62
Dag 5		4,5			7,5	8	8	5,5	5	5	6,21	121,32
Dag 6		6			9	9	9,5	7,5	6,5	7	7,79	190,44
Dag 7		8			11,5	11	11,5	9	8,5	9	9,79	300,84
Dag 8		9,5			12,5	13	13,5	10	10	10,5	11,29	400,14
10 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3					3,5	3,5	4	2	2	2	2,83	25,22
Dag 4		2			6	6	6	3,5	3,5	3,5	4,36	59,64
Dag 5		3,5			7,5	7,5	7,5	5	5	5	5,86	107,78
Dag 6		5			9	9	9	7	7	7	7,57	180,10
Dag 7		7			10	10,5	10,5	9	9	9	9,29	270,88
Dag 8		9			12,5	12,5	12,5	11	11	10,5	11,29	400,14
10,5 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3					3	3,5	3,5					
Dag 4			0,5		5	5	5	2,5	3,5	1,5	3,29	33,92
Dag 5			2,5		6,5	7	7	4	5	3,5	5,07	80,80
Dag 6			4		7,5	8	8	6	7	5	6,50	132,73
Dag 7			6,5		9	10	10	7,5	8	6,5	8,21	211,98
Dag 8			7,5		11	11,5	11,5	10	10	8,5	10,00	314,16
11 % NaCl												
Dag 2												
Dag 3					3	3,5	3	2,5	1	1	2,33	17,10
Dag 4					5	5,5	5	4,5	2,5	2,5	4,17	54,54
Dag 5		1,5			7	7	6,5	5	4	4	5,00	78,54
Dag 6		3			8	8,5	8	7	5,5	6	6,57	135,67
Dag 7		5			9	10	10	8	7,5	8	8,21	211,98
Dag 8		6			11,5	12	11	10,5	9	10	10,00	314,16
Kontroll												
Dag 2												
Dag 3			3,5	2,5	5	5	5	4	3,5	4	4,06	51,85
Dag 4			5	4	7	6	6,5	5,5	5	5	5,50	95,03
Dag 5			6,5	6	8,5	8	8	7	6,5	7	7,19	162,30
Dag 6			8,5	7,5	10	10	10	9	8	8,5	8,94	250,95
Dag 7			10	9,5	11,5	11,5	11,5	10	10	10	10,50	346,36
Dag 8			11,5	10,5	13	13	12,5	11,5	11	11	11,75	433,74

Tabell 25. Rådata *P. chrysogenum* 8-41 i hovedforsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for tre gjentak.

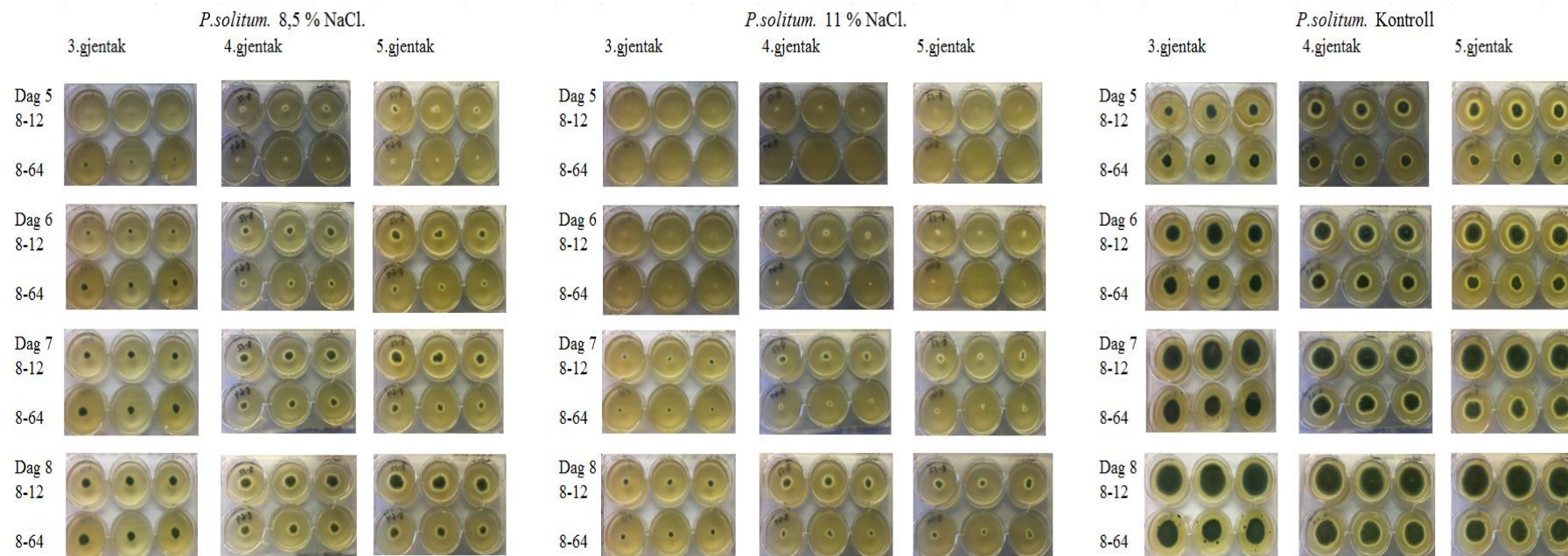
<i>P. chrysogenum</i> 8-41											
	3.gjentak			4.gjentak			5.gjentak			Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	1,5	2	2,5	4,5	4,5	4,5	5	5	5	3,83	46,16
Dag 4	3,5	4	5	6	6	6,5	6	6	6	5,44	93,12
Dag 5	5,5	5,5	6	7	7,5	7,5	8	7,5	7,5	6,89	149,09
Dag 6	6	7	7	9,5	9	9	10	9	10	8,50	226,98
Dag 7	7,5	8	8,5	10	10,5	10,5	12	11	11,5	9,94	310,68
Dag 8	9	9,5	10	12	12	12,5	13	12,5	13	11,50	415,48
9 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3		1,5	2,5	4,5	4	4	4	4	4	3,56	39,87
Dag 4	5	3,5	5	6	5,5	5,5	5	5	5	5,06	80,30
Dag 5	6,5	5	5,5	7	6,5	6,5	7	7	7	6,44	130,47
Dag 6	7	6	6	8,5	8	8	7,5	8	8	7,44	174,11
Dag 7	8,5	7,5	8	10	10	10	9	10	10	9,22	267,19
Dag 8	10	8,5	9,5	12	11,5	11,5	11	11,5	12	10,83	368,70
9,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	2	2	1	4	4	4,5	3,5	3	3,5	3,06	29,33
Dag 4	4	4	4	6	6	6	5	4,5	5,5	5,00	78,54
Dag 5	5,5	5,5	5	7	7	7	6,5	6	7	6,28	123,81
Dag 6	6	6,5	6	8,5	8,5	8,5	7,5		8,5	7,50	176,72
Dag 7	7,5	7,5	7,5	10	10	10	9		10	8,94	250,95
Dag 8	8	8,5	8,5	11,5	11,5	12	11		12	10,38	338,16
10 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	1	2	1	2,5	3	3	4	3,5	4,5	2,72	23,28
Dag 4	2,5	4	3	5	5	5	5	5	5,5	4,44	62,06
Dag 5	5	5,5	5	6	6	6	6,5	6	6	5,78	104,88
Dag 6	6	6	5	7	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	6,83	146,70
Dag 7	6,5	7	6,5	8,5	8,5	8,5	9	9	9	8,06	203,86
Dag 8	7,5	8	7,5	10	10	10	10,5	10,5	10,5	9,39	276,94
10,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				3	3,5	3,5	3,5	3,5	2,5	3,25	33,18
Dag 4	2,5	1	2,5	5	5	5	5	5	4,5	3,94	48,88
Dag 5	5	4	5	6	6	6	6	6	5,5	5,50	95,03
Dag 6	5	5	5,5	7	7,5	7,5	7	7	6	6,39	128,23
Dag 7	6	6	6,5	8	8	8,5	8	8	7,5	7,39	171,52
Dag 8	7	7,5	7	9,5	10	10	9,5	10	9	8,83	245,13
11 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				3	3	3	3	3	2,5	2,92	26,73
Dag 4	2,5	2,5	3	5	5	4,5	4,5	4,5	4	3,94	48,88
Dag 5	4,5	4,5	5	6	6	5,5	5	5,5	5	5,22	85,68
Dag 6	5	5	5,5	7	7,5	6,5	6	6	6	6,06	115,20
Dag 7	6	6	6,5	8	8,5	7,5	7	7,5	7	7,11	158,86
Dag 8	6,5	6	7	10	10	8,5	8	8	8	8,00	201,06
Kontroll											
Dag 2											
Dag 3	4	3,5	4	5	5,5		5		4	4,43	61,61
Dag 4	6	5,5	6	7	7,5		6,5		6	6,36	126,96
Dag 5	8	7,5	8	8,5	9		8		7,5	8,07	204,67
Dag 6	9	8,5	9	10	10,5		10		10	9,57	287,81
Dag 7	11,5	11	11,5	12	12,5		11		11	11,50	415,48
Dag 8	12,5	12,5	13	13,5	13,5		12,5		12,5	12,86	519,33

Tabell 26. Rådata *P. chrysogenum* 9-36 i hovedforsøket. Gjennomsnittsradius og beregnet areal er vist i høyre kolonne for tre gjentak.

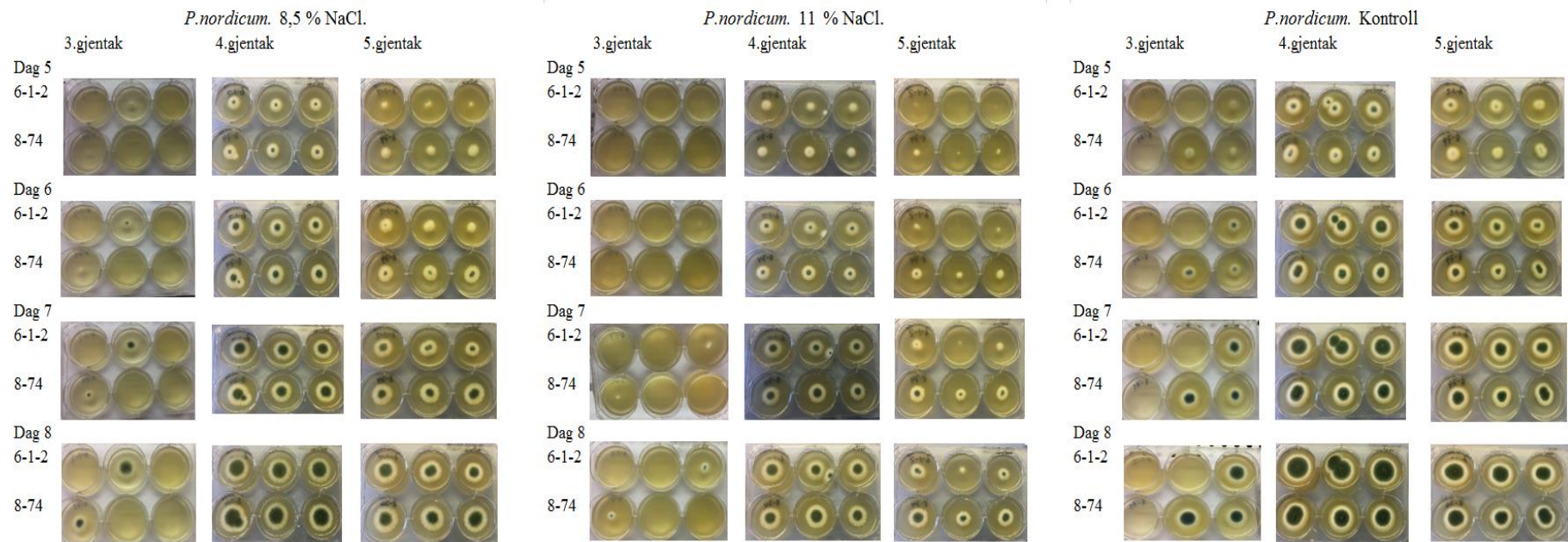
<i>P. chrysogenum</i> 9-36											
	3.gjentak			4.gjentak			5.gjentak			Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )
8,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	3	2,5	2,5	4,5	4,5	5	4,5	4,5	4,5	3,94	48,88
Dag 4	5,5	5	5	7,5	7,5	8	7	7,5	7	6,67	139,63
Dag 5	8,5	7,5	7,5	10	10	10,5	10	10	9,5	9,28	270,42
Dag 6	10,5	9,5	10	12,5		13	12,5	12,5	12,5	11,63	424,56
Dag 7	13	12,5	13	15		16	15	15	14	14,19	632,36
Dag 8	15,5	15	15	16		17	16	16	16	15,81	785,51
9 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	3	2	2	5	5,5	5	4	4	4	3,83	46,16
Dag 4	5,5	4,5	4,5		8,5	7,5	7,5	7	6	6,38	127,68
Dag 5	7,5	7,5	7		10,5	10	10	9,5	8,5	8,81	243,98
Dag 6	10	9	9		13	12,5	12,5	12	11	11,13	388,82
Dag 7	13	12,5	12,5		15	15	15	14	13,5	13,81	599,37
Dag 8	15	15	15		16,5	16,5	16,5	16,5	15	15,75	779,31
9,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	2	2	1	5	5	4	4	4,5	3,5	3,44	37,27
Dag 4	4	4	4,5	7	7,5	7	6	7	7	6,00	113,10
Dag 5	6,5	7	7	9,5	9	9	9	9	8,5	8,28	215,27
Dag 6	8,5	8,5	8,5	12	12	12	11	11,5	11	10,56	350,04
Dag 7	11	11,5	11	14	14	14	13,5	14	13,5	12,94	526,40
Dag 8	13,5	14	13,5	16	16	16	15	16	16	15,11	717,37
10 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3	1	2	1	4	4,5	4,5	4	4	3,5	3,17	31,50
Dag 4	4	4	3,5	7	7	6,5	6	6	6,5	5,61	98,91
Dag 5	6,5	6	6	9	9	9	8	8	8	7,72	187,34
Dag 6	8	8	7,5	11,5	11,5	11,5	10,5	10	10,5	9,89	307,22
Dag 7	10,5	10,5	10,5	13	13,5	14	13	13	12,5	12,28	473,58
Dag 8	12,5	13	13	15	15	15	15	15	15	14,28	640,43
10,5 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				4	4	4	3,5	4	3,5	3,83	46,16
Dag 4	3	3,5	4	6,5	6,5	6	6	6,5	5,5	5,28	87,51
Dag 5	5,5	6	6	9	9	8,5	8	8	7,5	7,50	176,72
Dag 6	7,5	8	7,5	11	11	11	10	10	10	9,56	286,86
Dag 7	10	10,5	10	13	13	12,5	12,5	12,5	12	11,78	435,79
Dag 8	12,5	12,5	12,5	15	15	15	15	15	14	14,06	620,65
11 % NaCl											
Dag 2											
Dag 3				3,5	3,5	3,5	2,5	3	3,5	3,25	33,18
Dag 4	3	3	3	6	6	5,5	5	5	5,5	4,67	68,42
Dag 5	5	5	5	8	8	7,5	7	7,5	7,5	6,72	141,96
Dag 6	7	7	6,5	10	10,5	10	9,5	9,5	10	8,89	248,23
Dag 7	9	9	9	12,5	12,5	12,5	11	12,5	12,5	11,17	391,74
Dag 8	11	11,5	11		15	14	13,5	14	14	13,00	530,93
Kontroll											
Dag 2											
Dag 3	5,5	4	3,5	6,5	6,5	5,5	6,5	6	6,5	5,61	98,91
Dag 4	8	6	6	9	9	8,5	9,5	9	9,5	8,28	215,27
Dag 5	10,5	9	9	11	11	10,5	11,5	11,5	11	10,56	350,04
Dag 6	12	11,5	11	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,17	465,04
Dag 7	13,5	13,5	13	14	13,5	13,5	14	14	13,5	13,61	582,02
Dag 8	14	15	14	15	14	15	15	15	14	14,56	665,59

## 6.7 Sporedannelse hovedforsøket for salt (NaCl)

De kommende bildene viser sporedannelsen for *P. solitum*, *P. nordicum* og *P. chrysogenum* (3-5 gjentak), på kontroll, 8,5 og 11 % NaCl.

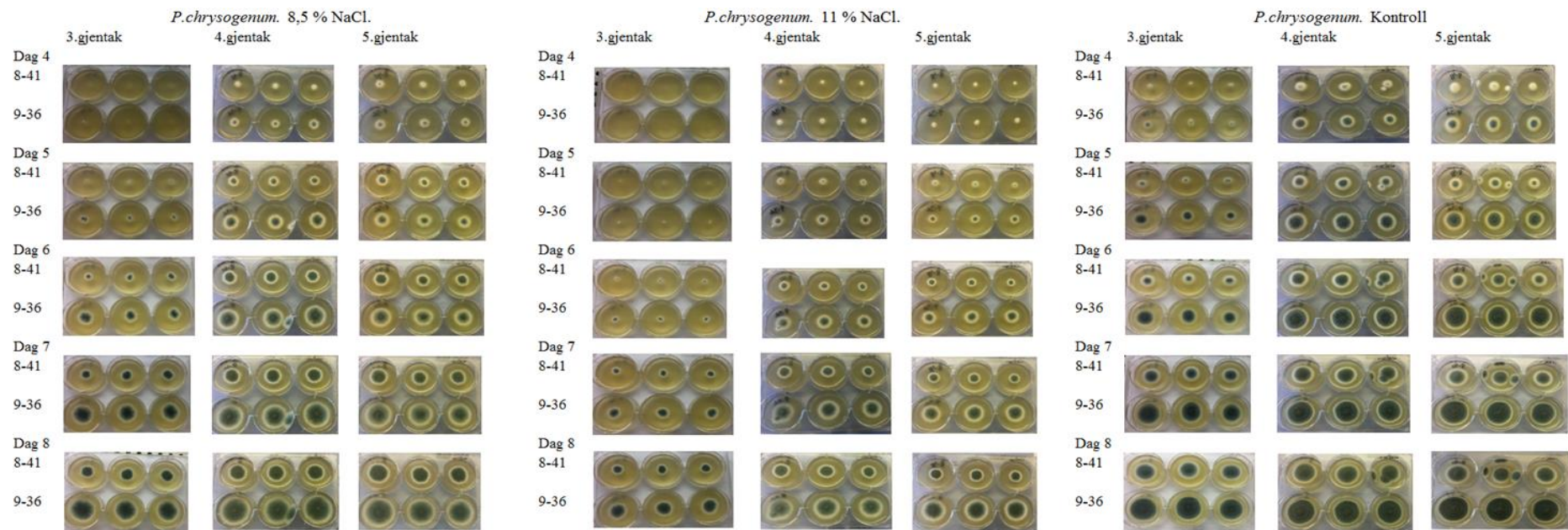


Figur 27. Sporedannelse for *P. solitum* på 8,5 % NaCl (venstre), 11 % NaCl (midten) og kontroll (høyre).



Figur 28. Sporedannelse for *P. nordicum* 8,5 % NaCl (venstre), 11 % NaCl (midten) og kontroll (høyre).





Figur 29. Sporedannelse for *P. nordicum* 8,5 % NaCl (venstre), 11 % NaCl (midten) og kontroll (høyre).

## 6.8 Rådata kolonistørrelse fryseforsøk

Tabell 27. Kolonistørrelse av isolatene i 1-2 gjentak (Innledende forsøk). Gjennomsnitt radius, areal og standardavvik er vist i kolonnene til høyre

Plate 2	1. og 2. gjentak Dag 11									
<i>P.nordicum</i>	Radius (mm)						Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )	Standardavvik	
6-1-2	7,5	4	7	6	6		6,10	116,90	1,20	
8-74	7	6	4,5	5	5	5	5,42	92,18	0,84	
<i>P.solitum</i>										
8-12	10	11,5	11				10,83	368,70	0,62	
8-64	7,5	9	9	8			8,38	220,35	0,65	
<i>P.chrysogenum</i>										
8-41	7,5	8	8,5	6	6	7	7,17	161,36	0,94	
9-36	8,5	10	7,5	7	7,5		8,10	206,12	1,07	
<b>Plate 4</b>										
<i>P.nordicum</i>										
6-1-2	7,5	8,5	10	7	6,5	7,5	7,83	192,77	1,14	
8-74	7	7,5	5,5	7,5			6,88	148,49	0,82	
<i>P.solitum</i>										
8-12	12	12,5	12				12,17	465,04	0,24	
8-64	8	8	9	8	9		8,40	221,67	0,49	
<i>P.chrysogenum</i>										
8-41	7	7	7	7,5	7,5	7	7,17	161,36	0,24	
9-36	10	8,5	9	8	9	8,5	8,83	245,13	0,62	
<b>Plate 5</b>										
<i>P.nordicum</i>										
6-1-2	12	10	11	13	12	11,5	11,58	421,52	0,93	
8-74	12	12	12	11	11,5	11,5	11,67	427,61	0,37	
<i>P.solitum</i>										
8-12	14	13					13,50	572,56	0,50	
8-64	12	10,5	11	12			11,38	406,49	0,65	
<i>P.chrysogenum</i>										
8-41	9,5	10	10	9,5	10,5		9,90	307,91	0,37	
9-36	12	12,5	13,5	13,5	13,5		13,00	530,93	0,63	

Tabell 28. Kolonistørrelse av isolatene i 3-5 gjentak (Hovedforsøk). Gjennomsnitt radius, areal og standardavvik er vist i kolonnene til høyre

Plate 2 dag 11	3.-5. gjentak, Dag 11											
<i>P.nordicum</i>	Radius (mm)						Gj. Radius	Areal (mm <sup>2</sup> )	Standardavvik			
6-1-2	9	9	10	8	8	8		8,67	235,97	0,75		
8-74	7,5	7	8	7	6,5	7,5		7,25	165,13	0,48		
<i>P.solitum</i>												
8-12	10	7,5	12,5	13	13	12,5	12,5	13,5	11,81	438,36	1,90	
8-64	7,5	8	7,5	9,5	9	9	8	7,5	7,5	8,17	209,53	0,75
<i>P.chrysogenum</i>												
8-41	7	7	9	10	8,5	8	8	9	8,31	217,08	0,97	
9-36	6,5	8	9,5	10	10	7,5	7,5	8	8,38	220,35	1,22	
<b>Plate 4 dag 11</b>												
<i>P.nordicum</i>												
6-1-2	9	10	22	9	10	11			11,83	439,91	4,60	
8-74	6	6	6	7,5	7,5	9	8	7	8	7,22	163,87	1,00
<i>P.solitum</i>												
8-12	10,5	13	13,5	13,5	15	15	13,5	13,5	14	13,50	572,56	1,25
8-64	8	8	9,5	10	10	8,5	8	8		8,75	240,53	0,87
<i>P.chrysogenum</i>												
8-41	7,5	7,5	7,5	8	9	9	7	7,5	8	7,89	195,52	0,66
9-36	8	8	10	10	10,5	11	8,5	8,5	9,5	9,33	273,67	1,05
<b>Plate 5 dag 11</b>												
<i>P.nordicum</i>												
6-1-2	12	12,5	13	12	12	12,5				12,33	477,87	0,37
8-74	10	10	11	10	10	12				10,50	346,36	0,76
<i>P.solitum</i>												
8-12	13	13	14	15	15	16	13	13	13,5	13,94	610,88	1,07
8-64	9,5	11	11	12,5	9	9	10			10,29	332,37	1,19
<i>P.chrysogenum</i>												
8-41	9,5	9	10	10	10	10,5	10	10	12	10,11	321,18	0,77
9-36	12,5	12,5	13,5	14	13,5	15	13	12,5	13,5	13,33	558,51	0,78

## 6.9 Rådata kolonistørrelse fuktighetsforsøk

Tabell 29. Kolonistørrelse av isolatene etter sju dager inkubering ved ulike fuktigheter. Høyre kolonne viser gjennomsnitt radius og areal.

<b>Kontroll</b>	<b>Radius (mm)</b>			<b>Gj. Radius (mm)</b>	<b>Areal (mm<sup>2</sup>)</b>
<i>P. solitum</i> 8-12	15	15	15	15,00	706,86
<i>P. solitum</i> 8-64	11,5	11	10,5	11,00	380,13
<i>P. chrysogenum</i> 8-41	13	12,5	12,5	12,67	504,05
<i>P. chrysogenum</i> 9-36	15	15	15	15,00	706,86
<i>P. nordicum</i> 6-1-2	12	12	12	12,00	452,39
<i>P. nordicum</i> 8-74	10	10	10,5	10,17	324,72
<b>Kaliumklorid</b>	<b>Radius (mm)</b>			<b>Gj. Radius (mm)</b>	<b>Areal (mm<sup>2</sup>)</b>
<i>P. solitum</i> 8-12	15	15	15	15,00	706,86
<i>P. solitum</i> 8-64	10	11,5	10	10,50	346,36
<i>P. chrysogenum</i> 8-41	12,5	12,5	12,5	12,50	490,88
<i>P. chrysogenum</i> 9-36	15	15	15	15,00	706,86
<i>P. nordicum</i> 6-1-2	12,5	12,5	12,5	12,50	490,88
<i>P. nordicum</i> 8-74	11,5	11	12	11,50	415,48
<b>Litiumacetat</b>	<b>Radius (mm)</b>			<b>Gj. Radius (mm)</b>	<b>Areal (mm<sup>2</sup>)</b>
<i>P. solitum</i> 8-12	15	15	15	15,00	706,86
<i>P. solitum</i> 8-64	11	11,5	11	11,17	391,74
<i>P. chrysogenum</i> 8-41	12	12,5	12,5	12,33	477,87
<i>P. chrysogenum</i> 9-36	14	14,5	15	14,50	660,52
<i>P. nordicum</i> 6-1-2	12	13,5	13	12,83	517,40
<i>P. nordicum</i> 8-74	11	11	11	11,00	380,13



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway