

Afslutningsrapport

Kortlægning af skimmelsvampepestammers kontamineringsveje i
osterier ved anvendelse af DNA-fingerprinting

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2001-42

Oktober 2001



mejeriforeningen

danish dairy board

Mejeriforeningen

Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:

**Kortlægning af skimmelsvampestemmers
kontamineringsveje i osterier ved anvendelse af DNA
fingerprinting**

Mejarbejdere som har været ansat på projektet:

Lektor, Ph D., Flemming Lund (Projektleder),

BioCentrum-DTU, Søtofts Plads, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet,
2800 Kgs. Lyngby.

Tlf: 45 25 26 22

Fax: 45 88 49 22

E-mail: flemming.lund@biocentrum.dtu.dk

Laborant Anni Bech Nielsen og laboratorietekniker Lisette Knoth Nielsen begge
BioCentrum-DTU.

Cand. brom. Pernille Skouboe og laborant Dorte Lauritsen, Bioteknologisk Institut,
Kogle Allé 2, 2970 Hørsholm.

Øvrige medarbejdere/samarbejdspartnere:

Alle i Mykologigruppen, men specielt i dette projekt:

Lektor Jens C. Frisvad og lektor Thomas Ostenfeld Larsen.

Resumé

I den første fase af undersøgelserne blev der fokuseret på oste, hvor vækst af skimmelsvampen *Penicillium commune* var uønsket. I den anden fase blev der fokuseret på skimmeloste (Danablu), hvor vækst af skimmelsvampen *Penicillium caseifulvum* var uønsket.

Fra 2 danske osterier er der i en længere periode (8 år) blevet indsamlet 321 *Penicillium commune* isolater. Isolaterne er blevet undersøgt for dannelse af sekundære metabolitter, fænotypiske forskelle af kolonier på 2 identifikationssubstrater og DNA profiler ved hjælp af RAPD og AFLP fingerprinting. Resultaterne viste, at sekundær metabolitdannelse og RAPD kunne "grov-opdele" *P. commune* isolaterne, mens en finere opdeling blev opnået ved fænotypning og AFLP profiler. Der blev fundet en generel overensstemmelse mellem resultater fra alle 4 teknikker.

P. commune isolater som var identiske ved brug af alle 4 teknikker blev betragtet som genetisk ens og tilhørende den samme stamme, som dermed måtte have haft en fælles oprindelse. Forskellige fysiske fund af isolater tilhørende samme stamme gav grundlag for at udarbejde en kortlægning af kontamineringsveje i osterierne. På begge osterier blev der fundet mange forskellige *P. commune* stammer både på ostene som kontaminanter og i produktionsmiljøet. Ligeledes på begge osterier kunne nogle stammer genfindes på osteriet i hele undersøgelsesperioden (8 år). Høj forekomst af mange ens stammer kunne på det ene osteri sammenkædes med en bestemt proces i et bestemt lokale. På osteriet blev der fundet 127 *P. commune* isolater tilhørende samme stamme ved en male proces. I det andet osteri blev det vist, at fra et lokale hvor ost med skimmel blev ompakket kunne den samme *P. commune* stamme følges fra ompakningsrummet til lagerrum og til pakningsrummet hvor ostene stod ubeskyttet inden pakning.

Resultater fra begge osterier viser, at uhensigtsmæssig håndtering af oste med skimmelvækst af *P. commune* sandsynligvis er hovedårsagen til problemer med skimmelvækst.

Fra 4 Danablu osterier og fra udenlandske oste blev der indsamlet 122 *Penicillium caseifulvum* isolater. AFLP fingerprinting af isolaterne viste, at der kun findes én

stamme af *P. caseifulvum* i stor mængde på hvert osteri. På 2 osterier har det været muligt at genfinde den samme *P. caseifulvum* stamme i en periode på mindst 6 år. Tilsyneladende har én *P. caseifulvum* stamme på hvert osteri tilpasset sig produktionen gennem flere år. Til gengæld var det muligt at skelne mellem *P. caseifulvum* isolater fra de forskellige osterier.

Résumé

In the first phase cheese with unwanted growth of *Penicillium commune* was investigated. In the second phase unwanted growth of *Penicillium caseifulvum* on fermented blue cheese (Danablu) was investigated.

From two Danish cheese factories 321 *Penicillium commune* isolates were sampled during a longer period (up to 8 years). The isolates were analysed for production of secondary metabolites, their phenotypic appearance as colonies on two identification media, RAPD and AFLP fingerprinting. The results showed that production of secondary metabolites and RAPD could classify the *P. commune* isolates into groups, however phenotyping and AFLP profiles further divided the groups into subgroups. In general all four techniques were in agreement by each other.

P. commune isolates, which were identical using the four techniques, were considered as one strain with a common origin. Different physical presence of isolates found belonging to the same strain were used to establish contamination routes in the cheese factories.

On both cheese factories were found many different *P. commune* strains. Some strain could be found again after 8 years. The cheeses were contaminated with many different *P. commune* strains but some strains could be found in special rooms in a large amount. In one factory were found 127 *P. commune* isolates belonging to the same strain in a room where the cheeses were coated with plastic. In the other factory it was shown that from a room where cheese with mould growth was unpacked and packed, the same *P. commune* strain was traced during a store room to a room where the cheeses were unprotected before packing.

Results from both factories showed that inappropriate handling of cheese with growth of *P. commune* most likely was the cause of problems with mould growth on cheese.

From four Danablu cheese factories and from cheeses from other countries were sampled 122 *Penicillium caseifulvum* isolates. AFLP results showed that only one strain of *P. caseifulvum* could be found in each factory. Apparently, one *P. caseifulvum* strain has been adapted to the production on each cheese factory during several years. It was only possible to divide between isolates from different factories. The same strain has been the same on two factories for at least six years.

1. Formål

Formålet med projektet er at inddele skimmelsvampe i stammer således, at det bliver muligt at analysere forekomsten af skimmelsvampestammer i produktionsmiljøet og sammenligne disse resultater med skimmelsvampestammer, der har vist vækst på ost i osterier.

2. Baggrund

I et tidligere samarbejdsprojekt med Mejeribrugets ForskningsFond er det blevet fastslået, at den hyppigste forekommende skimmelsvamp, der kontaminerer ost er *Penicillium commune*. I samme projekt blev der udviklet et selektivt substrat for *P. commune* samt en filterpapirmetode således at det var muligt at detektere og identificere hurtigt og simpelt den uønskede ostekontaminant.

Men grundlæggende har der været et problem omkring forekomsten af *P. commune* i osterier. De isolater af *P. commune*, der f.eks blev fundet på lageret i et separat rum – har de betydning for væksten af *P. commune* på ostene? Kan få bestemte sporer af *P. commune* i et lagerrum genfindes som voksende kolonier på ostene?

I dag anvendes DNA fingerprinting i retsmedicinske bevisførelser. I princippet kan de samme metoder også bruges på skimmelsvampe (og alle andre organismer med DNA). En simpel og meget populær metode kaldet RAPD fingerprinting kan bruges til at inddele isolater af *P. commune* som er genetisk ens eller forskellige. Princippet i RAPD-teknikken går ud på, at en såkaldt primer binder sig til bestemte steder på DNA strengen og området mellem primerne kan ved en PCR proces opformeres og detekteres på en agarosegel, hvor DNA fragmenterne er adskilt ved elektroforese. Resultatet er et båndmønster kaldet en RAPD profil. Primeren kan vælges tilfældigt eller kan vælges efter en screening af isolater som ønskes opdelt. Afhængigt af formålet kan RAPD teknikken bruges til at skelne mellem forskellige arter af skimmelsvampe, men kan også anvendes indenfor samme art. Dvs. hvis der anvendes en god diskriminatorisk RAPD primer kan *P. commune* inddeles i grupper af stammer som er genetisk ens. Ved RAPD detekteres omkring 10-15 DNA fragmenter, men ved anvendelse af en anden DNA fingerprintingsteknik kaldet AFLP er det muligt at detektere op til 100 forskellige bånd ved en primeropsætning. Derfor er AFLP god til

at confirmere, at de stammer der har ens RAPD profiler også reelt er meget ensartede. I teorien burde hele DNA genomet sekventeres for at være helt sikker på at to isolater er genetisk ens, men det er ikke praktisk muligt og heller ikke nødvendigt.

Mange skimmelsvampe har både en kønnet og ukønnet formeringstype. Hos *P. commune* findes kun den ukønnede formeringstype. Dvs. alle sporer fra et isolate af *P. commune* er fuldstændig genetisk ens. Derfor er det muligt at udføre DNA fingerprinting på *P. commune* og således fastslå om to isolater er genetisk identiske og dermed har en fælles oprindelse. På denne baggrund er det muligt at kortlægge:

- kontamineringsveje for *P. commune* stammer som er genetisk ens
- er det kun én stamme som kontaminerer ostene?
- er der flere stammer på osteriet?
- i hvor lang tid kan en stamme genfindes på osteriet?
- hvordan er en stamme udbredt på osteriet?
- hvor findes en høj koncentration af sporer fra en stamme?
- hvor opformeres stammerne i osteriet?

Opklaring af disse spørgsmål ville kunne give generelle informationer om ”adfærden” af *P. commune* på osterier og ville dermed kunne hjælpe til at forebygge uønsket vækst af *P. commune* på ost.

Alle skimmelsvampe producerer sekundære metabolitter og indenfor en art produceres en kombination af sekundære metabolitter som er meget specifik. Nogle sekundære metabolitter er giftige og kaldes mykotoksiner. Selv om produktionen af sekundære metabolitter er artsspecifik producerer alle isolater indenfor en art ikke nødvendigvis alle sekundære metabolitter som er karakteristiske for arten. Nogle isolater kan måske ikke producere en eller to af disse sekundære metabolitter. Da der skal anvendes ”aktive” gener for at producere sekundære metabolitter vil der i projektet blive registreret om alle *P. commune* isolater kan danne den fulde profil af sekundære metabolitter. Disse forskelle i metabolitprofiler vil blive sammenlignet med resultater fra RAPD og AFLP fingerprintingen.

Når isolater af *P. commune* dyrkes på identifikationssubstrater er de prik-podet og inkuberet i 7 dage ved 25 °C. Nogle *P. commune* isolater kan have større kolonidiameter end andre isolater samt forskellig for og bagside. Disse fænotypiske træk vil også blive registreret og der vil blive undersøgt om der er en sammenhæng mellem fænotyper og DNA fingerprintingen af *P. commune*.

I samme tidligere nævnte samarbejdsprojekt blev der også fundet en hidtil ubeskrevet art som nu er beskrevet som *Penicillium caseifulvum*. Arten blev fundet på overfladen af Danablu oste og dannede i perioder gul/orange misfarvninger af ostene. Ved de samme ovennævnte metoder som ved *P. commune* blev der indsamlet isolater af *P. caseifulvum* og der vil blive undersøgt om der kan kortlægges kontamineringsveje for *P. caseifulvum* i Danablu osterier.

3. Resultater og Diskussion

3.1 Sekundær metabolitproduktion

Fra to osterier blev der indsamlet 321 *P. commune* isolater. Alle isolater blev undersøgt for produktionen af følgende 3 sekundære metabolitter som er karakteristiske for arten, cyclopiazonic acid, rugulovasine A&B og cyclopaldic acid. Det blev fundet, at 94% af isolaterne kunne danne cyclopiazonic acid, 81% kunne danne rugulovasine A & B og 51 % kunne danne cyclopiazonic acid. Kun ca en trediedel af isolaterne kunne danne alle 3 sekundære metabolitter, resten af isolaterne blev registreret som producent og ikke-producent af de tre metabolitter. Fra hvert osteri kunne isolaterne inddeles i 5 grupper som havde samme sekundære metabolitprofil. Den hyppigst fundne profil (50%) hos osteri A blev kun fundet med 5 % hos osteri B og på lignende vis blev den hyppigst fundne profil på osteri B (53%) kun fundet med 10 % hos osteri A.

3.2 Fænotypisk inddeling

Når *P. commune* isolaterne var podet på to identifikationssubstrater CYA og YES kunne man ved direkte sammenligning af kolonierne på petriskålene klart inddele isolater i grupper afhængig af ensartethed. De forskellige isolater kunne genkendes og inddeles ud fra en kombination af kolonidiameter, farver, riller i vækst, form, tekstur, dråbedannelse og mange andre små detaljer ved kolonierne. Desværre blev det hurtigt klart, at resultaterne ikke kunne repeteres uden, at alle isolater var podet samtidig på samme batch af substrat, inkuberet samtidig og aflæst samtidig. Hermed var alle forsøgsbetingelser holdt så konstant som muligt, så de variationer der aflæses primært

var genetisk betinget. Da en sådan aflæsning er subjektiv har vi undersøgt muligheden for at måle kolonierne under standardbetingelser ved en automatisk farvemåling (Videometer udviklet ved Institut for Matematisk Modellering (IMM) ved DTU). Ved samarbejde med IMM fremkom der resultater, der gav samme inddeling som den subjektive inddeling. Der arbejdes i øjeblikket på en artikel med IMM, som beskriver metoden på *P. commune* isolaterne mere indgående.

264 *P. commune* isolater fra fabrik A kunne fænotypisk inddeles i 73 fænotyper. Heraf var 52 fænotyper kun repræsenteret af et isolat hvorimod 212 isolater kunne inddeles i 21 fænotyper. Antallet af isolater i hver fænotype varierede fra 2 til 127. Fra fabrik B blev 57 *P. commune* isolater karakteriseret af 35 fænotyper. Heraf var 24 fænotyper kun repræsenteret med et isolat hvorimod 33 isolater kunne inddeles i 11 fænotyper med 2 til 9 isolater i hver fænotype.

3.3 RAPD inddeling

I alt blev der fremstillet og sammenlignet RAPD profiler for 305 *P. commune* isolater med 2 primere. Fra den ene primer OPB1 blev der produceret 54 forskellige RAPD profiler og fra den anden primer OPB8 blev der produceret 29 forskellige RAPD profiler. Tilsammen gav de to primere en samlet RAPD inddeling af *P. commune* isolaterne.

Fra fabrik A blev 248 isolater inddelt i 37 RAPD grupper og fra fabrik B blev 57 isolater inddelt i 27 RAPD grupper.

3.4 AFLP inddeling

Fra begge fabrikker blev 271 *P. commune* isolater undersøgt for dannelse af forskellige AFLP profiler med 2 forskellige primeropsætninger. Dvs. for hvert isolat er der gennemgået ca 200 DNA bånd for at registrere om isolaterne havde ens bånd eller der manglede bånd. For både AFLP og RAPD er aflæsningen foretaget på samme (agarose)gel inden det blev afgjort om to isolater var ens eller forskellige. Begge AFLP primeropsætninger resulterede i at isolaterne blev inddelt i identiske grupper. Med andre ord havde hver AFLP primer opsætning fuldstændig samme diskriminatoriske effekt på disse *P. commune* isolater.

AFLP inddelingen af *P. commune* isolaterne gav ydermere næsten den samme inddeling som den fænotypiske inddeling.

3.5 Sammenligning af sekundær metabolitprofil, fænotyper, RAPD og AFLP profiler

Resultaterne viste, at der var overensstemmelse med alle inddelingssystemerne – dog havde hver metode forskellig diskriminatorisk effekt. Alle *P. commune* isolaterne kunne inddeles i 6 sekundær metabolit grupper – disse grupper blev yderligere inddelt i 64 RAPD grupper og 14 af disse grupper kunne igen yderligere opdeles i 37 fænotyper som var i overensstemmelse med AFLP grupperne.

Resultaterne fastlagde dermed en praktisk metode når der skal udføres fingerprinting af ukendte isolater. Først udføres analyse for sekundær metabolit produktion og RAPD analyser med gode primere. Hermed fås en god ”grovopdeling” af isolater og gør det senere arbejde med fænotypning og AFLP analyse meget hurtigere og lettere.

3.6 *Penicillium commune* isolater med ens AFLP, RAPD, sekundær metabolit og fænotypisk profil

De *P. commune* isolater som blev grupperet ens ved alle typningsteknikker blev betragtet som genetisk ens og tilhører sandsynligvis samme klon eller stamme som har en fælles oprindelse.

Fra fabrik A blev 18 isolater fra ost inddelt i 9 stammer; 7 isolater tilhørte deres egen stamme. Fra fabrik B tilhørte 7 ud af 9 isolater fra deres egen stamme. Fra fabrik A kunne den stamme stamme genfindes på fabrikken efter 8 år og ligeledes på fabrik B kunne en bestemt stamme genfindes efter 7 år. Resultaterne viser dermed klart, at *P. commune* kontaminerer ost med forskellige stammer og stammerne kan genfindes efter mange år.

På fabrik A blev der en enkelt dag fundet 127 *P. commune* isolater tilhørende den samme stamme i et rum samt 16 tilsvarende isolater i naborummene. Resultaterne viste klart, at i det pågældende rum foregik en proces som gav en stor belastning i miljøet af *P. commune* sporer. I rummet foregik en maleproces hvor ostene påføres en slags plastik coat. En forklaring på resultaterne var, at der på overfladen af ostene var vækst af *P. commune* (kunne netop anes) og maleprocessen speder sporer ud i luften.

Forklaringen blev bekræftet af, at når male processen holdt pause var der 16 gange færre *P. commune* sporer i luften.

På fabrik B brugte personalet et bestemt rum til at ompakke ost med skimmelvækst. Trods ventilation med overtryk og døre med desinfektionsbade kunne den samme stamme følges fra ompakningsrummet til lagerrum og til pakningsrummet hvor ostene stod ubeskyttet inden pakning.

På begge fabrikker blev det dermed vist at ”forkert” håndtering af oste med skimmelvækst kunne være årsagen til problemer med skimmelvækst. Oste med skimmelvækst skal håndteres meget forsigtigt. Det skal i denne forbindelse nævnes, at en *P. commune* spore på en ost på 4 dage kan danne 10.000 sporer i en koloni på ca 1 cm. Uddannelse og information af personale til en korrekt håndtering af oste med skimmel kan dermed være den bedste forebyggelse for problemer med skimmel. Hver lille knap synlig vækst af skimmel på ost må derfor straks forsigtigt pakkes ind og fjernes langs væk fra produktionsmiljøet. Her burde ostene varmebehandles inden ostene går til biologisk affald. Denne metode er sandsynligvis den mest sikre metode til forebyggelse af skimmelvækst på oste og er sikkert også mere økonomisk på lang sigt end at ompakke oste hvor skimmelvæksten er skåret væk.

3.7 *Penicillium caseifulvum* på Danablu oste

Der blev indsamlet 104 *P. caseifulvum* isolater fra 2 osterier som samarbejdede indbyrdes samt 4 isolater fra 2 andre danske osterier. Derudover blev der indsamlet 11 *P. caseifulvum* isolater fra en tysk produceret ost af typen Montagnolo samt 3 isolater fra franske oste. Alle 104 isolater fra de 2 danske osterier som samarbejdede var ens ved undersøgelse af sekundære metabolitter, RAPD og AFLP fingerprinting, men der var tydelig forskel ved AFLP fingerprinting mellem de andre 2 osterier. Yderligere havde de udenlandske isolater en meget forskellig AFLP profil sammenlignet med de danske isolater. Endvidere var de franske isolater forskellig fra de tyske isolater. Fænotypisk var der også forskel mellem de danske og udenlandske isolater. Men overraskende nok kunne der også registreres fænotypiske forskelle blandt de danske isolater fra samme osteri, som ikke kunne detekteres ved AFLP fingerprintingen. En mulig årsag til at der ikke var sammenhæng mellem fænotyper og AFLP typer skal nok ses på baggrund af de store mængder af sporer af *P. caseifulvum* der dagligt produceres i osteriet. Her vil der være mulighed for at cellerne kan give arvelige

fænotypiske variationer uden ændring af genomet. Årsagen er prioner som for nyligt er beskrevet hos gær, *Saccharomyces cerevisiae*. Det er måske muligt, at *P. caseifulvum* har lignende prioner?

En forklaring på at det ikke var muligt at skelne *P. caseifulvum* isolater på de to danske osterier kunne være, at osterierne pakker oste for hinanden. Derved kan det ikke undgås, at isolater fra de to osterier blandes. Gennem daglig produktion gennem mange år har en stamme udkonkurreret alle andre stammer, som var mere tilpasset Danablu osten under produktion.

Luftprøver viste at *P. caseifulvum* sporer findes overalt i osteriet i meget store mængder. Sammenlignet med *P. roqueforti* som bliver tilsat ostemælken var antallet af *P. caseifulvum* sporer i luften altid meget større. Forklaringen skal findes i selve den måde væksten af *P. caseifulvum* på osten foregår. Vækst af *P. caseifulvum* sker kun på overfladen af ostene, mens vækst af *P. roqueforti* også foregår inde i ostene. I modningsrummene ligger nyproducerede oste i samme rum som oste der er færdigmodnet. I samme rum vendes ostene også jævnligt og ved denne håndtering belastes miljøet meget væsentlig med sporer fra *P. caseifulvum*. Ostene bliver dækket af et lag af *P. caseifulvum* vækst. Sporerne kan detekteres helt til starten af produktionen, ostene bliver derfor ”podet” med *P. caseifulvum* gennem den daglige produktion. En stamme har tilsyneladende etableret sig på begge osterier og har været den samme stabile stamme i mindst 6 år. Hvis vækst af *P. caseifulvum* skal undgås – som nok er svært – skal der etableres adskilte modningsrum for nyproducerede oste og for modne oste.

4. Konklusion

Der findes mange forskellige stammer af *P. commune* på osterier. Stammerne er stabile og kan genfindes på samme osteri efter mindst 8 år. Ostene kontamineres med mange forskellige stammer af *P. commune*. U hensigtsmæssig håndtering af oste med vækst af *P. commune* er sandsynligvis hovedårsagen til problemer med skimmelvækst på oste.

P. caseifulvum er tilpasset produktionen af Danablu ost. Kun én bestemt stamme af *P. caseifulvum* kan kun findes på samme osteri. Der var genetiske forskelle på *P. caseifulvum* stammerne mellem de fleste osterier.

Publikationer

F. Lund (1999) Kortlægning af skimmelsvampestemmers kontamineringsveje i osterier. *Mælkeritidende* **1**, 8-9.

F. Lund, A.B. Nielsen and P. Skouboe (200X) Distribution of *Penicillium commune* contaminants in cheese factories traced using secondary metabolite profiles, phenotypes, AFLP and RAPD fingerprinting. To be submitted to International Journal of Food Microbiology

F. Lund, A.B. Nielsen and P. Skouboe (200X) Distribution of *P. caseifulvum* in fermented blue cheese factories traced using AFLP fingerprinting. To be submitted to International Journal of Food Microbiology

M. E. Hansen, F. Lund and J.M. Carstensen (200X) Direct clone identification of *Penicillium commune* isolates using image analysis. To be submitted to Journal of Microbiological Methods

