



# ACTA AGRICULTURAE SLOVENICA

106 • 1  
2015

Acta agriculturae Slovenica • ISSN 1581-9175 • 106 – 1 • Ljubljana, junij 2015

Uredniški odbor – živalska prirreja  
*Editorial Board – animal production*

dr. Drago Babnik (Ljubljana), izr. prof. dr. Tomaž Bartol (Ljubljana),  
dr. Michel Bonneau (Saint Gilles), prof. dr. Tajana Černy (Zagreb),  
prof. dr. Milena Kovač (Ljubljana), prof. dr. Amarendra Narayan Misra  
(Balasore, Orissa, Indija), prof. dr. dr. h. c. Franz Pirchner (Innsbruck),  
prof. dr. Zdenko Puhan (Zürich), prof. dr. Jasna M. A. Stekar (Ljubljana),  
prof. dr. Dejan Škorjanc (Maribor), prof. dr. Jernej Turk (Maribor)

Glavni in odgovorni urednik / *Editor*  
Tehnični urednik / *Technical Editor*

Peter Dovč  
Jože Stopar

Jezikovni pregled / *Proof reading*  
Oblikovanje / *Graphic art and design*  
Prelom / *DTP*

Vanda Šušteršič  
Milojka Žalik Huzjan  
Jože Stopar

Izdajatelj in založnik / *Published by*

Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani  
Biotechnical Faculty University of Ljubljana

Zanjo / *Represented by*

Peter Dovč

Tisk / *Printed by*

ROTOSI d.o.o., Tomačevo 19, SI-1000 Ljubljana,  
v / in 300 izvodih / *copies*

---

Naslov Uredništva / *Editorial Office Address*

ACTA AGRICULTURAE SLOVENICA

Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia

Tel. / *Phone*: +386 (0)1 320 3836; Faks / *Fax*: +386 (0)1 7241 005, E-pošta / *E-mail*: peter.dovc@bf.uni-lj.si;  
<http://aas.bf.uni-lj.si/>; Online: ISSN 1854-1941

Zamenjava / *Exchange*

Centralna knjižnica Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, p. p. 2995,  
SI-1111 Ljubljana, Slovenia

Letna naročnina za letnik / *Annual subscription per volume*: 25 €; posamezna številka / *Single issue*: 17 €  
Naročila sprejema / *Orders should be sent to*: Uredništvo / *Editorial Office*.

Revija izhaja letno v dveh letnikih, vsak z dvema številka.

*The Journal is published in two volumes annually, each with two issues.*

Avtorji v celoti odgovarjajo za vsebino in jezik prispevkov.

*The authors are responsible for the content and for the language of their contributions.*

Na ovitku: Taksoni v deblu Ascomycota (glej str. 7)

*On Cover: Taxa in the phylum Ascomycota (see p. 7)*

---

**ACTA AGRICULTURAE SLOVENICA** je dokumentacijsko obdelana v / *is included into*:

Slovenski nacionalni center AGRIS, INDOK Oddelek za zootehniko, CAB Abstracts, COBISS, FSTA,  
Scopus (Elsevier) in/and CrossRef.

**ACTA AGRICULTURAE SLOVENICA** izhaja s finančno pomočjo / *is published with the financial support*:

Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije / *Slovenian Research Agency*.

---

© 2015, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Vse pravice pridržane. Noben del te izdaje ne sme biti reproduciran, shranjen ali prepisan v kateri koli obliki oz. na kateri koli način, bodisi elektronsko, mehansko, s fotokopiranjem, snemanjem ali kako drugače, brez predhodnega pisnega dovoljenja lastnikov avtorskih pravic (copyrighta). / *All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher.*

# ACTA AGRICULTURAE SLOVENICA

106 • 1  
2015

Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani  
Biotechnical Faculty University of Ljubljana

Acta agriculturae Slovenica • ISSN 1581-9175 • 106 – 1 • Ljubljana, junij 2015



## VSEBINA / CONTENTS

### GENETIKA / GENETICS

- Simon KOREN, Minka KOVAČ, Nataša TOPLAK*  
5 Who lives in our dishwasher? Preliminar results of fungal metagenomic analysis of household dishwashers  
Kdo živi v našem pomivalnem stroju? Preliminarni rezultati metagenomske analize gliv v gospodinjskih pomivalnih strojih
- Neža POGOREVC, Minja ZORC, Tanja KUNEJ*  
13 Raziskave mikro RNA pri govedu, prašičih, ovcah in kokoših  
Micro RNA research in cattle, pig, sheep, and chicken

### BIOTEHNOLOGIJA / BIOTECHNOLOGY

- Romana MARINŠEK LOGAR, Neža NOVAK, Maša VODOVNIK*  
21 Prispevek bioplinskih naprav v Sloveniji k zmanjševanju toplogrednega učinka iz kmetijskega sektorja  
The contribution of Slovenian biogas plants to the reduction of agricultural sector green house emissions

### ŽIVINOREJA / ANIMAL BREEDING

- Andreja KANDOLF BOROVSČAK, Nives OGRINC, Nataša LILEK, Boštjan NOČ, Janko BOŽIČ, Mojca KOROŠEC*  
31 Vpliv krmljenja čebeljih družin na njihovo živalnost in pristnost medu  
Influence of feeding bee colonies on colony strenght and honey authenticity
- Richard POSPIŠIL*  
41 The analysis of costs related to bovine spongiform encephalopathy disease occurrence in the Czech Republic in 2001–2014  
Analiza stroškov, povezanih z bovino spongiformno encefalopatijo v Češki republiki v obdobju 2001–2014
- Andrej ŠALEHAR, Janez GREGORI, Anton KOŽELJ, Peter DOVČ*  
49 Pred odhodom na Dunaj naj bi bil Anton Janša na Koroškem?  
Before going to Vienna could Anton Janša be in Carinthia?

- Tomaž BARTOL*  
53 Subject index by AGROVOC descriptors  
Predmetno kazalo po deskriptorjih AGROVOC
- Nataša SIARD*  
55 Subject index by AGRIS category codes  
Vsebinsko kazalo po predmetnih kategorijah AGRIS
- 57 Abecedno kazalo avtorjev  
Author's index
- 59 Navodila avtorjem
- 61 Notes for authors

# WHO LIVES IN OUR DISHWASHER? PRELIMINAR RESULTS OF FUNGAL METAGENOMIC ANALYSIS OF HOUSEHOLD DISHWASHERS

Simon KOREN<sup>1</sup>, Minka KOVAČ<sup>2</sup>, Nataša TOPLAK<sup>3</sup>

Received May 29, 2015; accepted June 30, 2015.  
Delo je prispelo 29. maja 2015, sprejeto 30. junija 2015.

## *Who lives in our dishwasher? Preliminar results of fungal metagenomic analysis of household dishwashers*

In the last few years the advances in molecular biological methods, especially the development of next generation sequencing, have drastically changed and improved our view of microbial world. Progress in new molecular techniques enables us to overcome potential disadvantages of traditional microbiological techniques in fungal community identifications. It also enables us to evaluate the richness of fungal populations more efficiently and reliably. In the present study, we used the Ion Torrent PGM next generation sequencing platform to analyse fungi present in ordinary household dishwashers. The identification was based on massive parallel sequencing of the D2 LSU *rRNA* amplicon. The analysis revealed rich and diverse fungal communities present in our dishwashers. Interpretation of the results was based on previously published research by Zalar *et al.* (2011). The results of our study confirmed that the new technology in many ways surpasses classical methods used in fungal analysis by offering quicker, reliable, more sensitive and inexpensive high-throughput identification of microorganisms in entire communities.

**Key words:** molecular biology / molecular techniques / fungi / metagenomics / next generation sequencing / Ion Torrent PGM / household dishwashers

## 1 INTRODUCTION

Fungi have a billion years of evolutionary history, number perhaps 1.5 million species, and are hence extremely diverse both phylogenetically and functionally, with a complex taxonomy.

## *Kdo živi v našem pomivalnem stroju? Preliminarni rezultati metagenomske analize gliv v gospodinjskih pomivalnih strojih*

Na področju metagenomike je napredek molekularno bioloških metod, predvsem razvoj naslednje generacije sekvenciranja, dramatično spremenil in razširil pogled na mikrobn svet. Napredek novih molekularnih tehnik nam omogoča premagovanje pomanjkljivosti tradicionalnih mikrobioloških tehnik, predvsem pri identifikacij populacij gliv. Z novim pristopom dobimo učinkovitejšo in zanesljivejšo ocenitev števila vrst gliv v določenih populacijah. V naši raziskavi smo uporabili tehnologijo naslednje generacije sekvenciranja Ion Torrent za analizo prisotnosti gliv v gospodinjskih pomivalnih strojih. Identifikacija je temeljila na masivni paralelni določitvi nukleotidnega zaporedja podenote D2 LSU glivnega gena *rRNA*. S končno analizo smo potrdili bogate in raznolike skupnosti gliv v naših pomivalnih strojih, interpretacija rezultatov pa je temeljila na že objavljenih predhodnih raziskavah Zalarjeve in sod. (2011). Rezultati naše raziskave so potrdili, da nova tehnologija na mnogih področjih presega klasične mikrobiološke metode, ki se uporabljajo pri analizi skupnosti gliv in ponuja hitrejšo, zanesljivejšo, občutljivejšo ter cenejšo identifikacijo mikroorganizmov v skupnosti.

**Ključne besede:** molekularna biologija / molekularne tehnike / glive / metagenomika / naslednja generacija sekvenciranja / Ion Torrent PGM / gospodinjski pomivalni stroji

In the last few years, several approaches have been proposed to study fungi in various environments. Each of the approaches (traditional or molecular) has their advantages and limitations. Classification of fungi that cannot be isolated in pure culture can be especially problematic. In recent years, development of the next generation sequencing (NGS) techniques has enabled sequenc-

<sup>1</sup> Omega d.o.o., Dolinškova 8, Ljubljana, SI-1000, Slovenia, e-mail: simon.koren@omega.si

<sup>2</sup> Same address as 1, e-mail: minka.kovac@omega.si

<sup>3</sup> Same address as 1, e-mail: natasa.toplak@omega.si

ing of whole genomes or only parts of genomes, which can be used for taxonomical studies. These techniques can also be used to investigate complex microbial communities with the metagenomics approach. Metagenomics analyses present different challenges as microbiome samples can contain thousands of species, often novel and closely related (Tringe *et al.*, 2005) and accessing the genetic information from an entire community of organisms represents a bioinformatical challenge. In the last years, many articles were published in the area of eukaryotic metagenomics (Venter *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010). Articles published since 2009, which describe fungal metagenomics studies performed using different NGS platforms, are listed in Supplement 1. These studies are based on the analysis of nucleotide sequences of whole genomes or use different genetic (ITS1, ITS2 or LSU). One of the possible approaches to fungal metagenomics analysis is to use the D2 expansion segment region; part of the gene which encodes the large subunit ribosomal 28S rRNA (LSU rDNA) (Amend *et al.*, 2010; Gottel *et al.*, 2011; Lekberg *et al.*, 2012; Tonge *et al.*, 2014). Especially the variations in the 5' end of LSU region are widely used for fungal phylogenetic analyses at or above the genus level. Recently, (Thomas *et al.*, 2012) published some guidelines about the entire workflow for microbial metagenomics studies, ranging from sampling to data analysis.

In our study, we were interested in fungal communities, which are in daily contact with humans at home. As it is well known, fungi are very diverse organisms living almost anywhere, including very extreme conditions. One of the possible extreme habitats in human homes is the dishwasher. It represents an interesting habitat, because it is rich in nutrients and water, but on the other hand, it is regularly exposed to extreme conditions, which include high temperatures, very fluctuating humidity levels and high detergent concentrations. (Zalar *et al.*, 2011) presented the study of fungal community in the dishwashers across the world. The focus of their study were polyextermotolerant fungi, which can be potentially pathogenic for humans. Certain generalist species are adjusted at adapting to different stressful environments and Zalar *et al.* (2011) have shown that this includes the dishwasher. Actually, most fungi are not dangerous, but some types can be harmful, like oligotrophic black fungi, which have been potential to cause human infection (Lian & de Hoog, 2010), or for example, *Exophiala dermatitidis*, which can cause potentially fatal systemic and brain infections (Zeng *et al.*, 2007). Furthermore, fungi have also been implicated in the sick building syndrome (Straus, 2009; Thrasher & Crawley, 2009). In the review of Gostinčar *et al.* (2011) some genera (*Exophiala*, *Aspergillus*, *Candida*, *Dipodascus*, *Fusarium*, *Penicillium*,

*Pichia* and *Rhodotorula*) were found to form stable communities in dishwashers.

In the present study, we used the Ion Torrent PGM, NGS platform to analyse fungi present in ordinary household dishwashers. In a few previous studies, Ion Torrent technology was already used to identify fungal communities from different sources (Kemler *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2013; Tonge *et al.*, 2014; Geml *et al.*, 2014), but here we present the first report of the NGS metagenomic approach for analysis of fungal populations in the samples from four different dishwashers. Identification was based on NGS of the D2 LSU rRNA amplicon and it revealed rich, but also diverse fungal communities present in our dishwashers.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 MATERIAL

In our preliminary study, we collected samples from 4 different household dishwashers. The samples were collected with buccal swabs (Prionics, Switzerland) around the door-sealing O-ring.

### 2.2 METHODS

#### 2.2.1 DNA EXTRACTION AND QUANTIFICATION

Before the isolation, the buccal swabs were vortexed in 1 ml of 1x PBS. The samples were divided into two tubes and centrifuged for 1 min at 100 x g. The DNA from half of the sample was isolated with the PrepMan<sup>®</sup> Ultra Sample Preparation Reagent (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA from the other half of the samples was isolated using the MagMAX<sup>™</sup> Total Nucleic Acid Isolation Kit with the MagMAX Express Magnetic Particle Processor (both Life Technologies) following the manufacturer's instructions. The concentrations and purities of the extracted DNA were determined using the LAMBDA Bio+ spectrophotometer (Perkin-Elmer, USA), and the DNA was diluted 100x with sterile deionized water.

#### 2.2.2 PCR AMPLIFICATION, SIZE SELECTION AND QUANTIFICATION OF PCR PRODUCT

PCR amplification of the D2 LSU rDNA region of fungal DNA was done with the PCR MicroSeq module,

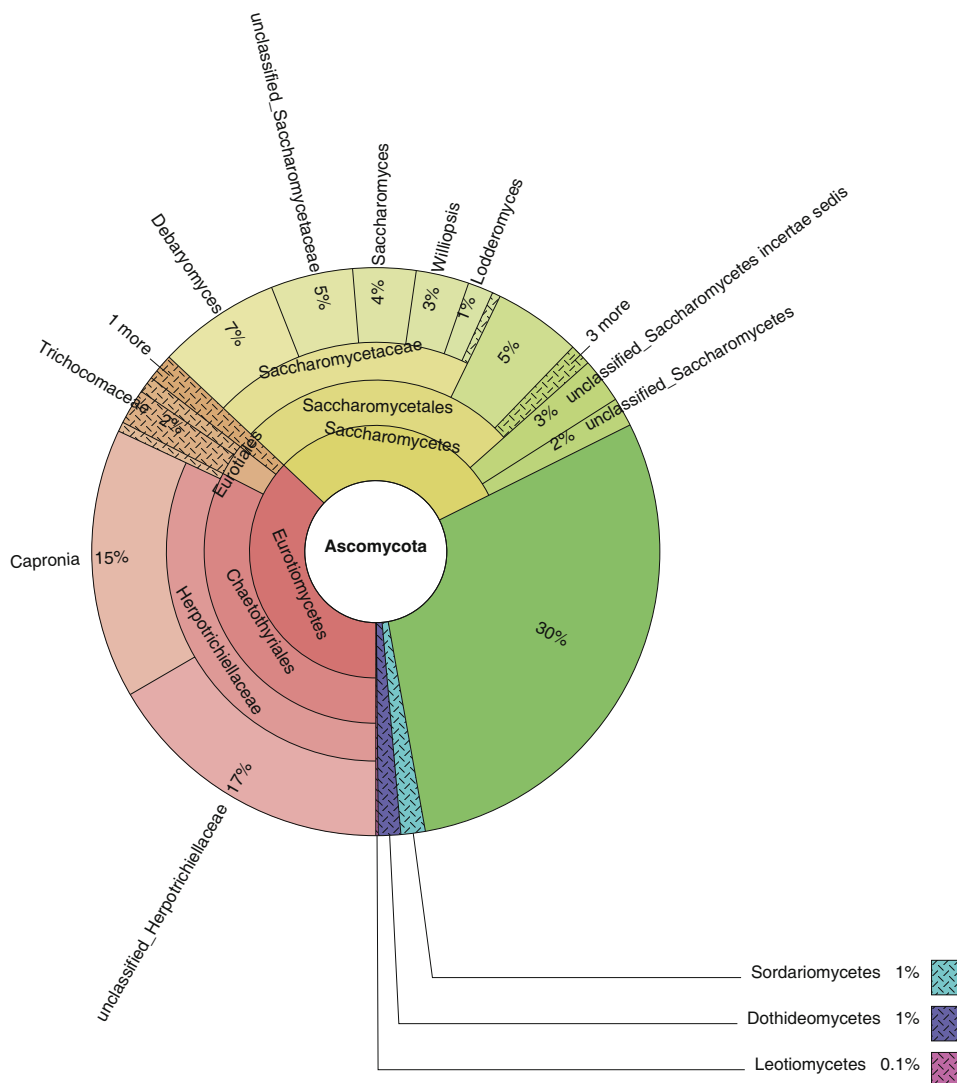


which is a part of the MicroSeq<sup>®</sup> D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit (Life Technologies). The size selection of the specific approximately 350 bp long PCR products was done with the E-Gel<sup>®</sup> SizeSelect™ 2 % kit (Life Technologies). The concentrations of PCR products were determined using the dsDNA HS Assay Kit and the Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorimeter (Life Technologies).

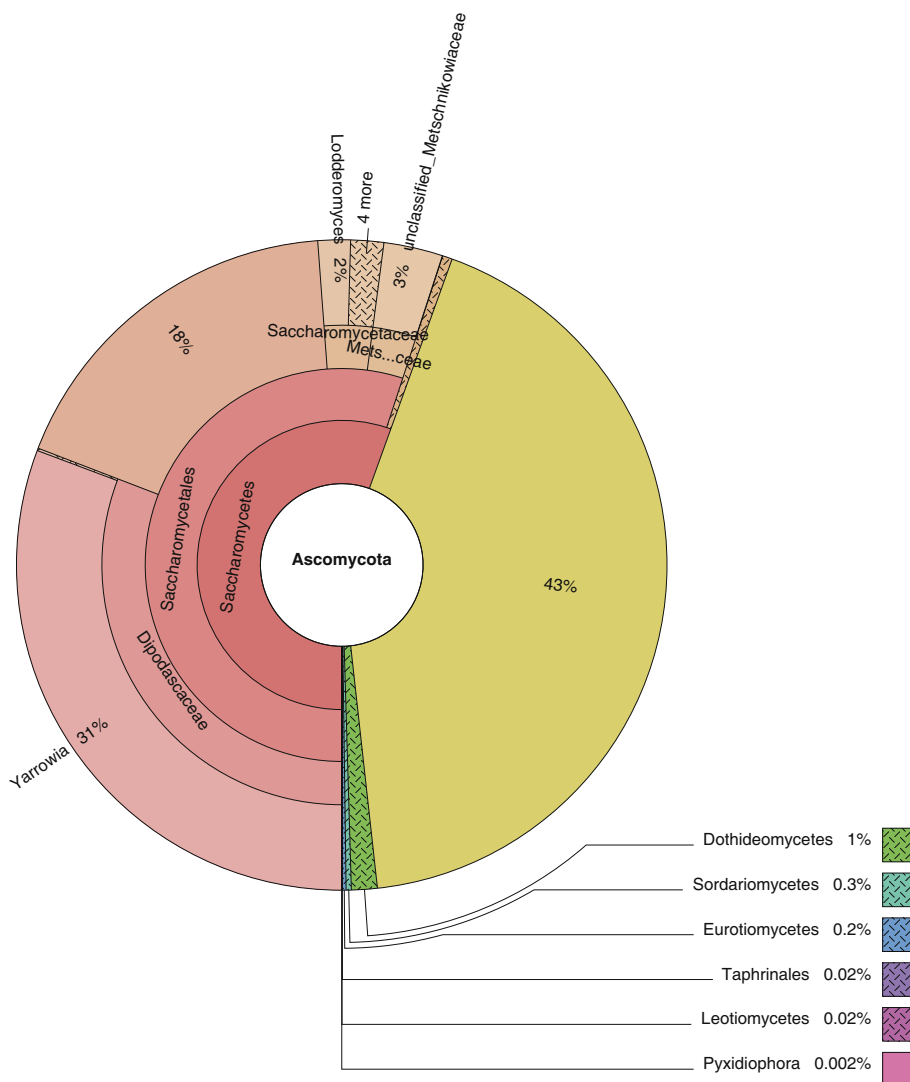
### 2.2.3 ION TORRENT LIBRARY PREPARATION AND SEQUENCING

The DNA library was prepared using the Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Some modifications were made as the concentra-

tion of starting material was in the range between 10 to 20 ng and the step of fragmentation of gDNA with Ion Shear™ Plus Reagent was skipped. The samples were bar-coded according to the manual with Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit (Life Technologies). The amount and size distribution of library DNA fragments was determined with the Labchip GX instrument (Perkin-Elmer). Emulsion PCR and enrichment steps were carried out using the Ion PGM™ Template OT2 200 Kit and the Ion OneTouch™ 2 System as described in the manufacturer's protocol. Assessment of the Ion Sphere particle quality was undertaken between the emulsion PCR and enrichment steps with the Ion Sphere quality control kit (Life Technologies) using a Qubit 2.0 fluorimeter. Libraries were sequenced on the Ion 316™ Chip v2 (Life Technologies) with the Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 follow-



**Figure 1a:** Distribution of the taxa for the most prominent phylum Ascomycota identified in the first dishwasher  
**Slika 1a:** Porazdelitev taksonov v najbolj zastopnem deblu Ascomycota v prvem pomivalnem stroju



**Figure 1b:** Distribution of the taxa for the most prominent phylum Ascomycota identified in the second dishwasher  
**Slika 1b:** Porazdelitev taksonov v najbolj zastopanem deblu Ascomycota v drugem pomivalnem stroju

ing the manufacturer's manual. Signal processing and base calling was performed with the Torrent Suite software version 4.0 (Life Technologies).

#### 2.2.4 BIOINFORMATICS ANALYSIS

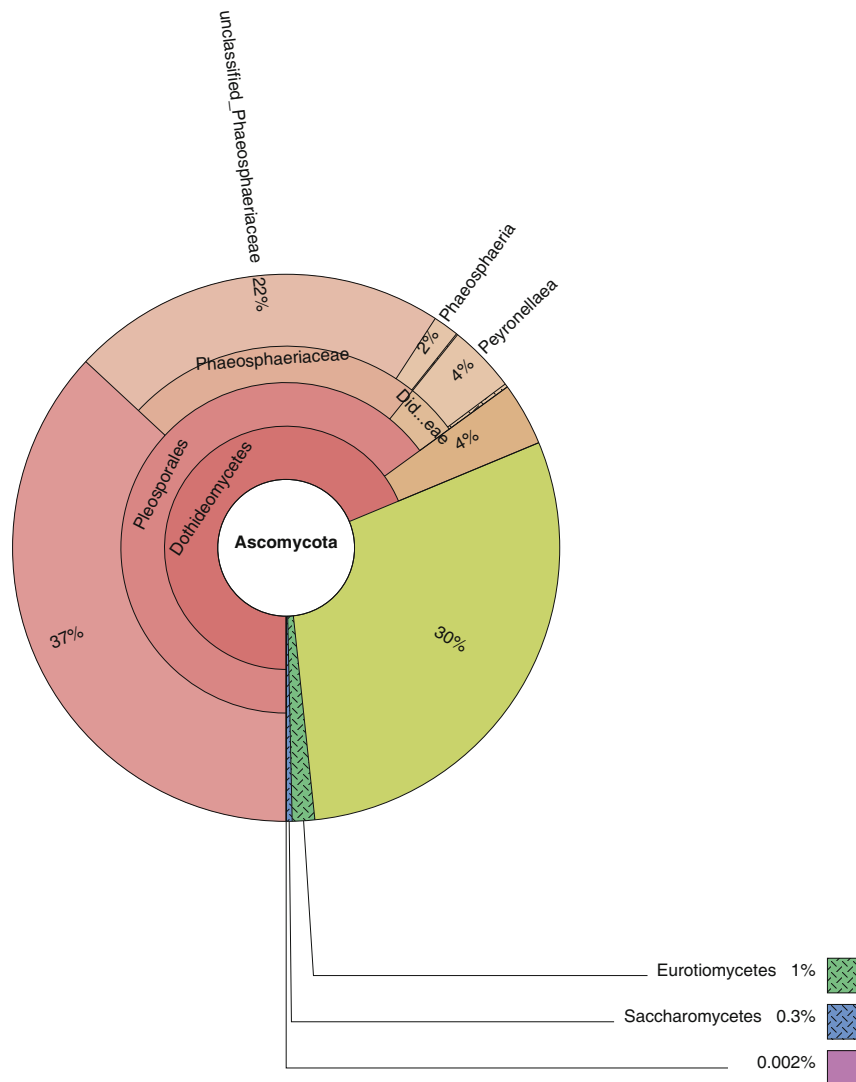
For the metagenomics analysis, all the reads that passed the default Torrent Suite quality thresholds were exported into FASTA format and classified using the fungal naïve Bayesian classifier available through the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Since the classifier requires sequences with at least 50 bp for good classification results, shorter sequences were not submitted for the analysis. The bootstrap confidence threshold of 80 % was used for classification, and

the sequences not reaching this threshold were grouped into "unclassified" taxons. Interactive hierarchical data browser Krona (Ondov *et al.*, 2011) was used to display the resulting taxonomical data.

### 3 RESULTS

In total, 678,354 reads for four samples were sequenced with a mean length of approximately 119 bp and the longest reads over 300 bp long, resulting in 80.85 Mbp of sequencing data, from which 54.73 Mbp met the Q20 quality criteria (67.7 %).

Each sequence of fungal D2 LSU *rRNA* gene was classified from the phylum down to the order and in



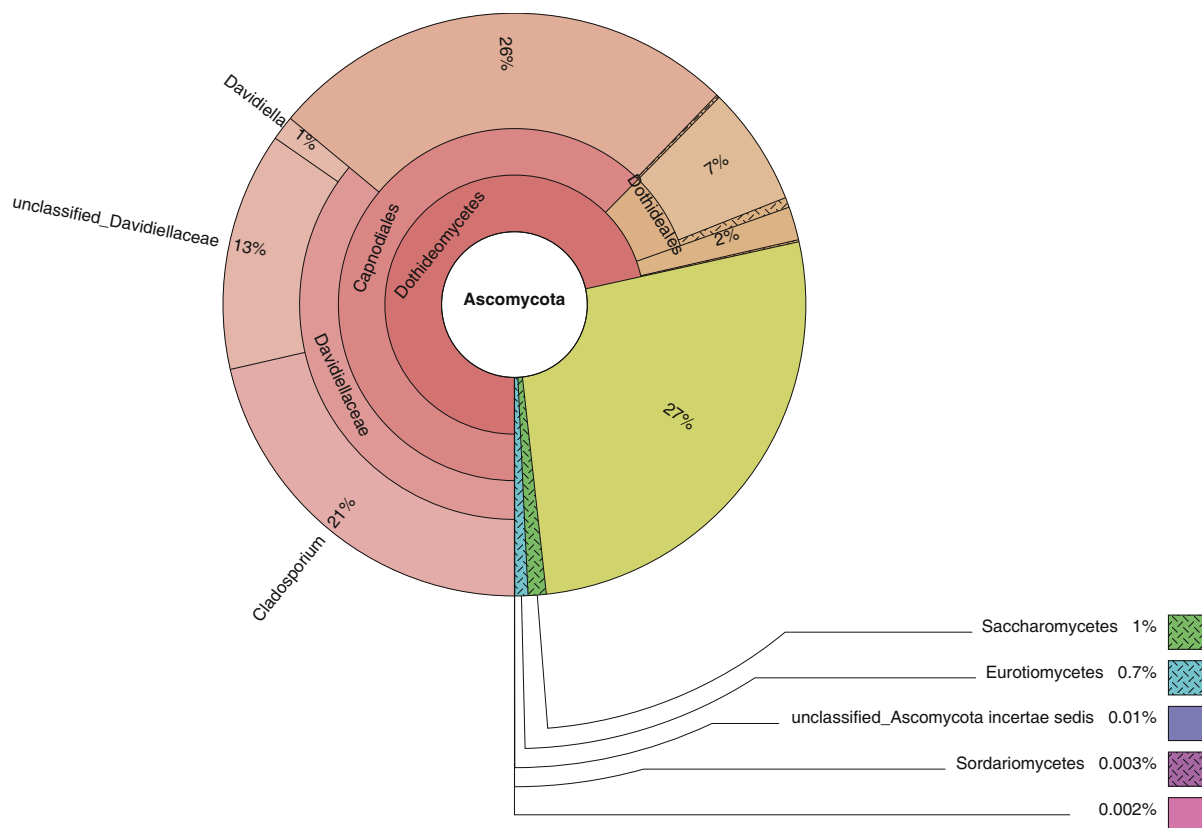
**Figure 1c:** Distribution of the taxa for the most prominent phylum *Ascomycota* identified in the third dishwasher  
**Slika 1c:** Porazdelitev taksonov v najbolj zastopnem deblu *Ascomycota* v tretjem pomivalnem stroju

some cases also genus level using the Ribosomal Database Project.

The richness of fungal biomes present in the four sampled dishwashers differed.

The proportion of sequences assigned to unclassified fungi was between 11.9 and 36.0%. In all four samples, only two phyla (*Ascomycota* and *Basidiomycota*) were present. Taxonomic composition analysis for all samples is presented in Figure 1a–d. The *Ascomycota* were the dominant phylum in all samples tested. Of the total six classes of *Ascomycota* and four classes of *Basidiomycota* were observed. The three classes of the phylum *Ascomycota* commonly shared between the samples were the *Saccharomycetes*, *Eurotiomycetes* and *Dothideomycetes*. In contrast, *Sordariomycetes* and *Leotiomycetes* were found only in two samples and *Ascomycota incertae sedis* only

in one sample. In addition, members of *Basidiomycota* were observed only in one sample (sample 4) at higher proportions – for this sample, 32% of the sequences were assigned to this phylum, whereas in the other three samples, the percentages of *Basidiomycota* were much lower – 0.01, 0.4 and 4%, respectively. Using the cut off of at least 10 reads, at the class level *Exobasidiomycetes* and *Tremellomycetes* were present only in one sample (sample 1 and sample 4, respectively); *Microbotryomycetes* and *Agaricomycetes* were present in two samples (sample 2/sample 4 and sample 1/sample 4, respectively). The detailed further classification for all four samples can be interactively visualized in the hierarchical data browser Krona (supplemental information S2). In summary, a total of 46 different genera could be identified in the samples at the selected confidence threshold.



**Figure 1d:** Distribution of the taxa for the most prominent phylum Ascomycota identified in the fourth dishwasher  
**Slika 1d:** Porazdelitev taksonov v najbolj zastopanem deblu Ascomycota v četrtem pomivalnem stroju

#### 4 DISCUSSION

Indoor environments offer numerous different habitats for microorganisms. The most contaminated places are kitchens and bathrooms (Ojima *et al.*, 2002; Beumer & Kusumaningrum, 2003; Nishiuchi *et al.*, 2009; Feazel *et al.*, 2009). Zalar *et al.* (2011) observed the fungal flora inside the dishwasher by classic microbiology or the classical sequencing molecular biology approach, whereas in our study we aimed to capture a broader view of fungal communities using the massive parallel sequencing metagenomics approach.

Amend *et al.* (2010) showed that fungi are ubiquitous and diverse components of human indoor environments. The most cosmopolitan taxa reported on their studies were also present in our dishwasher samples: *Alternaria* (3 of 4 samples), *Cladosporium* (1 of 4 samples), *Penicillium* (2 of 4 samples), *Aspergillus* (2 of 4 samples) and *Sordariomycetes* (2 of 4 samples).

In all sample's class, *Saccharomycetes* was present, especially families *Metschnikowiaceae* (*Clavispora*), *Saccharomycetaceae* (*Lodderomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*) and *Saccharomycodaceae* (*Dipodascaceae*, *Yarrowia*). *Saccharomycetes* are economically and envi-

ronmentally important fungi and generally occupy damp or wet habitats that are high in organic material so the presence of a high number of different *Saccharomycetes* in all samples was not surprising. Some of the species of *Saccharomycetes* (*S. cerevisiae*) are used in food processing, production of macromolecular cellular components such as lipids, proteins, including enzymes, and vitamins. However, some evidence indicates also the involvement of *S. cerevisiae* in a range of superficial and systemic diseases (Murphy & Kavanagh, 1999). Interestingly, genus *Yarrowia*, which contains a single-species *Yarrowia lipolytica* was present in high numbers in one of the samples. The species has attracted a lot of interest because of its very high biotechnological potential, especially due to its lipid metabolism abilities (Gonçalves *et al.*, 2014), which are likely also useful for survival in the ecosystem of the dishwasher.

We also investigated the presence of potentially pathogenic fungi described by Zalar *et al.* (2011) in the dishwashers from our study. Members of the order *Chaetothyriales* were identified in 3 out of 4 samples, in one of them in very high numbers. On the other hand, genus *Exophiala*, which contains numerous potential opportunistic pathogens causing disease, mainly in immuno-

compromised humans and in cold-blooded animals (de Hoog *et al.*, 2011), was not confirmed. However, in the Ribosomal Database Project, most species of *Exophiala* are classified under the genus *Capronia*, and we did identify this genus in all tested dishwashers. Therefore, it is likely that the pathogenic species of *Exophiala*, found to be widespread in dishwashers in the study by Zalar *et al.*, were also present in dishwashers from our study. Genus *Capronia* also includes a group of fungi known as black yeast with some species responsible for important opportunistic infections in the vertebrata (de Hoog *et al.*, 2000).

We also identified some other potentially pathogenic fungi. In one sample, the genus *Alternaria* was present. It can also be found within the nose, mouth, and upper respiratory tract; they are common allergens in humans (O'Hollaren *et al.*, 1991). The same sample also contained fungi from the genus *Cladosporium*. Some *Cladosporium* species are pathogenic and toxigenic to humans, it has been reported to cause infections of the skin, as well as sinusitis and pulmonary infections (Tasić & Miladinović-Tasić, 2007).

In another sample genus, *Penicillium* was present. It is a very common species known for causing allergies and asthma; some species produce mycotoxins, one being the common antibiotic penicillin (Frisvad *et al.*, 2004; Watanabe, 2008; Bundy *et al.*, 2009).

One sample was also rich in the order *Pleosporales*. Species of this order occur in various habitats, and can be epiphytes, ednophytes or parasites of living leaves or stems, hyperparasits on fungi or insects or saprobes of dead plant material. Some species of this order contain both plant pathogens and food spoilage agents; some of them also contain enzymes that are biological control agents (Kruys *et al.*, 2006). Furthermore, it is known that some species invade homes, and they can cause plant diseases or hay fever and more serious infections in humans (Khan *et al.*, 2000).

NGS has revolutionised the field of metagenomic microbiology by providing a culture independent technique through which to identify and assess microbiological diversity. Furthermore, the availability of affordable "bench-top" sequencers has placed the ability to perform such studies in the hands of most laboratories.

We have tested our approach using four separate fungal communities. According to our data, the fungal biomes present in the dishwashers differed considerably in composition and richness, probably due to differences in models and programming of dishwashers, user's habits and sampling skills. Zalar *et al.* (2011) already suggested that extreme conditions like high temperature, detergent and pH fluctuations can provide an alternative habitat for species also known to be pathogenic to humans, and

this was also confirmed in our study. Different stressful conditions can serve as preadaptations for fungal communities and drive their evolution towards pathogenicity. Gostinčar *et al.* (2011) investigated possible scenarios and mechanisms by which the extreme conditions play a role in this process.

The results from our study confirmed that the new technology in many ways surpasses classical methods used in the fungal analysis by offering quicker, reliable, more sensitive and inexpensive high-throughput identification for entire communities. In further studies, it would be interesting to extend the scope of this preliminary study by analysing more samples, increasing the number of reads and by sequencing additional targets, which would enable even deeper classification of fungi down to the level of species. Furthermore, comparison of the temperature protocols in the dishwasher instruments would also contribute valuable data on the role of extreme conditions for the composition of the biome.

## 5 ACKNOWLEDGEMENTS

The project described was supported by Omega d.o.o., Ljubljana, Slovenia.

## 6 REFERENCE

- Amend A.S., Seifert K.A., Samson R., Bruns T.D. 2010. Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 13748–13753. doi:10.1073/pnas.1000454107
- Beumer R.R., Kusumaningrum H. 2003. Kitchen hygiene in daily life. *Int Biodeterior Biodegrad*, 51: 299–302. doi:10.1016/S0964-8305(03)00041-6
- Brown S.P., Callahan M.A., Oliver A.K., Jumpponen A. 2013. Deep Ion Torrent sequencing identifies soil fungal community shifts after frequent prescribed fires in a southeastern US forest ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol*, 86: 557–566. doi:10.1111/1574-6941.12181
- Bundy K.W., Gent J.F., Beckett W., Bracken M.B., Belanger K., Triche E., Leaderer B.P. 2009. Household airborne *Penicillium* associated with peak expiratory flow variability in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 103: 26–30. doi:10.1016/S1081-1206(10)60139-1
- Feazel L.M., Baumgartner L.K., Peterson K.L., Frank D.N., Harris J.K., Pace N.R. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 16393–16399. doi:10.1073/pnas.0908446106
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol.*, 49: 201–241

- Geml J., Pastor N., Fernandez L., Pacheco S., Semenova T.A., Becerra A.G., Wicaksono C.Y., Nouhra E.R. 2014. Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Mol Ecol.*, 23: 2452–2472. doi:10.1111/mec.12765
- Gonçalves F.A.G., Colen G., Takahashi J.A. 2014. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *ScientificWorld Journal*, 2014: 476207. doi:10.1155/2014/476207
- Gostinčar C., Grube M., Gunde-Cimerman N. 2011. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biol.*, 115: 1008–1018. doi:10.1016/j.funbio.2011.03.004
- Gottel N.R., Castro H.F., Kerley M., Yang Z., Pelletier D.A., Podar M., Karpinets T., Uberbacher E., Tuskan G.A., Vilgalys R., *et al.* 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Appl Environ Microbiol.*, 77: 5934–5944. doi:10.1128/AEM.05255-11
- De Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical fungi, viii + 1126 p.
- De Hoog G.S., Vicente V.A., Najafzadeh M.J., Harrak M.J., Badali H., Seyedmousavi S. 2011. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*, 27: 46–72. doi:10.3767/003158511X614258
- Kemler M., Garnas J., Wingfield M.J., Gryzenhout M., Pillay K.-A., Slippers B. 2013. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. *PLoS One*, 8: e81718. doi:10.1371/journal.pone.0081718
- Khan J.A., Hussain S.T., Hasan S., McEvoy P., Sarwari A., others. 2000. Disseminated *Bipolaris* infection in an immunocompetent host: an atypical presentation. *J Pak Med Assoc.*, 50: 68–71
- Kruys A., Eriksson O.E., Wedin M. 2006. Phylogenetic relationships of coprophilous Pleosporales (Dothideomycetes, Ascomycota), and the classification of some bitunicate taxa of unknown position. *Mycol Res.*, 110: 527–536. doi:10.1016/j.mycres.2006.03.002
- Lekberg Y., Schnoor T., Kjoller R., Gibbons S.M., Hansen L.H., Al-Soud W.A., Sørensen S.J., Rosendahl S. 2012. 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol.*, 100: 151–160. doi:10.1111/j.1365-2745.2011.01894.x
- Lian X., de Hoog G.S. 2010. Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection. *Med Mycol.*, 48: 622–628. doi:10.3109/13693780903405774
- Murphy A., Kavanagh K. 1999. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: Implications for biotechnology. *Enzyme Microb Technol.*, 25: 551–557. doi:10.1016/S0141-0229(99)00086-1
- Nishiuchi Y., Tamura A., Kitada S., Taguri T., Matsumoto S., Tateishi Y., Yoshimura M., Ozeki Y., Matsumura N., Ogura H., Maekura R. 2009. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis.*, 62: 182–186
- O'Hollaren M.T., Yunginger J.W., Offord K.P., Somers M.J., O'Connell E.J., Ballard D.J., Sachs M.I. 1991. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med.*, 324: 359–363. doi:10.1056/NEJM199102073240602
- Ojima M., Toshima Y., Koya E., Ara K., Tokuda H., Kawai S., Kasuga F., Ueda N. 2002. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. *J Appl Microbiol.*, 93: 800–809. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01746.x
- Ondov B.D., Bergman N.H., Phillippy A.M. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12: 385. doi:10.1186/1471-2105-12-385
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., *et al.* 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59–65. doi:10.1038/nature08821
- Straus D.C. 2009. Molds, mycotoxins, and sick building syndrome. *Toxicol Ind Health*, 25: 617–635. doi:10.1177/0748233709348287
- Tasić S., Miladinović-Tasić N. 2007. *Cladosporium* spp.: Cause of opportunistic mycoses. *Acta Fac Medicae Naissensis*, 24: 15–19
- Thomas T., Gilbert J., Meyer F. 2012. Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp.*, 2: 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3
- Thrasher J.D., Crawley S. 2009. The biocontaminants and complexity of damp indoor spaces: more than what meets the eyes. *Toxicol Ind Health*, 25: 583–615. doi:10.1177/0748233709348386
- Tonge D.P., Pashley C.H., Gant T.W. 2014. Amplicon-based metagenomic analysis of mixed fungal samples using proton release amplicon sequencing. *PLoS One*, 9: e93849. doi:10.1371/journal.pone.0093849
- Tringe S.G., von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M., Mathur E.J., Detter J.C., *et al.* 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308: 554–557. doi:10.1126/science.1107851
- Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., *et al.* 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457: 480–484. doi:10.1038/nature07540
- Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., *et al.* 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304: 66–74. doi:10.1126/science.1093857
- Watanabe M. 2008. Production of mycotoxins by *Penicillium expansum* inoculated into apples. *J Food Prot.*, 71: 1714–1719
- Zalar P., Novak M., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. 2011. Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol.*, 115: 997–1007. doi:10.1016/j.funbio.2011.04.007
- Zeng J.S., Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G., Harrak M.J., de Hoog G.S. 2007. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *J Clin Microbiol.*, 45: 3713–3720. doi:10.1128/JCM.02012-06

# RAZISKAVE MIKRO RNA PRI GOVEDU, PRAŠIČIH, OVCAH IN KOKOŠIH

Neža POGOREVC<sup>1</sup>, Minja ZORC<sup>2</sup>, Tanja KUNEJ<sup>3</sup>

Delo je prispelo 26. maja 2015, sprejeto 30. junija 2015.  
Received May 26, 2015; accepted June 30, 2015.

## *Raziskave mikro RNA pri govedu, prašičih, ovcah in kokoših*

Mikro RNA (miRNA) so kratke nekodirajoče RNA, ki imajo pomembno funkcijo pri uravnavanju izražanja genov. Polimorfizmi v prekurzorjih miRNA, v tarčnih genih ali znotraj komponent, ki sodelujejo pri mehanizmu utišanja genov, pomembno prispevajo k fenotipski raznovrstnosti pri živalih. Zaradi te vloge so miRNA postale predmet naraščajočega zanimanja za raziskave v povezavi s proizvodnimi lastnostmi v živalih. V članku smo predstavili primere povezav med miRNA in fenotipom pri štirih vrstah rejnih živali: govedu, prašičih, ovcah in kokoših. Večina raziskav o delovanju miRNA je usmerjenih predvsem v mišično in maščobno tkivo, spolne žleze, razvoj zarodka in imunski odziv organizma. Delovanje miRNA vpliva tudi na produktivnost živali in posledično na ekonomsko uspešnost priraje. S tem, ko razumemo delovanje miRNA v različnih bioloških procesih, jih lahko uporabljamo za razvijanje novih strategij za izboljšanje produktivnosti rejnih živali.

**Ključne besede:** živinoreja / genetika / mikro RNA

## 1 UVOD

Mikro RNA (miRNA) so nekodirajoče RNA (ncRNA), dolge približno 21 nukleotidov, ki uravnavajo izražanje tarčnih genov. Ocenili so, da okoli 1000 miRNA uravnava izražanje vsaj tretjine genov pri živalih (Georges in sod., 2007; Wang in sod., 2013).

Prva miRNA je bila odkrita pri *Caenorhabditis elegans*. Od takrat so jih začeli odkrivati pri različnih živalskih in rastlinskih vrstah, kjer igrajo pomembno vlogo pri številnih bioloških procesih, kot so razvoj, apoptoza, diferenciacija in proliferacija celic (Wang in sod., 2013). V številnih študijah so ugotovili, da lahko miRNA vpli-

## *Micro RNA research in cattle, pig, sheep, and chicken*

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play key roles in regulating gene expression. Polymorphisms in miRNA precursors, target genes or within components of silencing machinery contribute significantly to the phenotypic diversity in animals. Due to this role miRNAs became the subject of increased research interest in association with production traits in livestock. In this article we presented examples of associations between miRNA genes and phenotypes of four livestock species: cattle, pig, sheep, and chicken. Most miRNA research studies are focused on their functioning in muscle, adipose tissues, gonads, fetal development and immune system. MicroRNA functions also impact animal productivity and consequently economic success of farming. With understanding miRNA functions in various biological pathways it is possible to develop new strategies for improving the productivity of livestock.

**Key words:** animal production / genetics / microRNA

vajo na fenotip organizma (Georges in sod., 2007). Eden takšnih primerov je mišična hipertrofija pri ovcah pasme teksel, ki je posledica translacijske inhibicije gena za miostatina, za katero je odgovorna miRNA (Clop in sod., 2006). Poznavanje funkcije miRNA pri rejnih živalih je pomembno za razumevanje regulacije različnih bioloških procesov in možnosti razvijanja novih strategij za izboljšanje proizvodnosti živali (Wang in sod., 2013).

V članku smo opisali biogenezo in delovanje miRNA ter vpliv na fenotipsko variabilnost in razvoj bolezni pri rejnih živalih. Opisali smo vpliv miRNA na ekonomsko pomembne lastnosti pri štirih vrstah: govedu, prašičih, ovcah in kokoših.

<sup>1</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-naslov: neza\_pogo@hotmail.com

<sup>2</sup> Isti naslov kot 1, e-naslov: minja.zorc@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Isti naslov kot 1, e-naslov: tanja.kunej@bf.uni-lj.si

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIOGENEZA MIKRO RNA

Biogeneza miRNA se začne v jedru s primarnimi prepisi (pri-miRNA), ki so dolgi več sto ali tisoč baznih parov. Te predpise nato proteinski kompleks Drosha razcepi v 60 do 70 nukleotidov dolge prekursorske miRNA (pre-miRNA), ki imajo značilno strukturo lasničnih zank (Lee in sod., 2002; Bartel, 2004). Pre-miRNA preko transportnega proteina Exportin-5 potujejo iz jedra v citoplazmo, kjer jih prepozna encimski kompleks Dicer in jim odcepi zanko. S tem tvori približno 22 nukleotidov dolgo dvojno vijačnico zrele miRNA (angl. mature miRNA) (Hutvagner in sod., 2001). Dvojna vijačnica se razkline in vstopi v ribonukleoproteinski kompleks RISC (Khvorova in sod., 2003), v katerem pride do interakcije miRNA z informacijsko RNA (mRNA), ki privede do utišanja izražanja gena (McDanel, 2009).

### 2.2 MEHANIZMI DELOVANJA miRNA

Delovanje miRNA pri živalih je kompleksno, saj vključuje različne mehanizme in interakcije med njimi, ki še niso popolnoma raziskane (Georges in sod., 2007). Komplementarnost med miRNA in njeno tarčno mRNA je lahko delna ali popolna. Za vezavo na tarčo je odgovorno zaporedje od drugega do osmega nukleotida s 5' konca verige miRNA, ki ga imenujemo območje "seed" (Wang in sod., 2013).

Predlagane so tri prevladujoče teorije o vlogi miRNA pri uravnavanju izražanja genov. Ko se miRNA vključi v kompleks RISC in veže na 3' konec neprevedene regije s tem (a) povzroči razgradnjo mRNA, (b) onemogoči prevajanje mRNA ali (c) premakne mRNA v P-telesca (angl. P-bodies), kjer se ta kasneje razgradi (McDanel, 2009).

### 2.3 POLIMORFIZMI POVEZANI Z URAVNAVANJEM IZRAŽANJA GENOV S POSREDOVANJEM miRNA

Znane so tri glavne kategorije polimorfizmov, ki vplivajo na mehanizme uravnavanja izražanja genov s posredovanjem miRNA; v genih za miRNA, v tarčnih genih in v ostalih sodelujočih komponentah tega mehanizma (pregl. 1).

1) V genih za miRNA je lahko spremenjeno zaporedje zrele miRNA, ki povzroči stabilizacijo ali destabilizacijo interakcije s tarčo. Prav tako so polimorfizmi lahko prisotni v pri- ali pre-miRNA in vplivajo na stabilnost ali učinkovitost procesiranja. Mutacije, ki delujejo v *cis* ali *trans* na promotor pri-miRNA lahko vplivajo na raven prepisovanja. Opisane pa so bile tudi različice v številu kopij (angl. copy number variations), ki vplivajo na število kopij miRNA (Georges in sod., 2007).

2) V tarčnih genih za miRNA se lahko pojavijo mutacije, ki vplivajo na funkcionalnost vezavnih mest ter s tem stabilizirajo ali destabilizirajo interakcije z miRNA. Polimorfizmi lahko ustvarijo nova mesta za vezavo miRNA ali pa povzročijo nastanek alternativne poliadenilacije in vplivajo na zgradbo 3' konca tarčnega gena.

3) Polimorfizmi lahko vplivajo tudi na ostale komponente mehanizma za utišanje genov s spreminjanjem zaporedja aminokislin ali s spreminjanjem koncentracije komponent. Prav tako pa se lahko geni nahajajo v območju različic v številu kopij (Georges in sod., 2007).

### 2.4 RAZISKAVE miRNA PRI REJNIM ŽIVALIM

Raziskave miRNA v živinoreji se osredotočajo predvsem na ekonomsko pomembne lastnosti, ki so povezane s pridelavo mleka, mesa in jajc ter tudi na tiste, ki vplivajo na produktivnost živali, njihovo plodnost, preživetveno sposobnost zarodkov in odpornost proti boleznim. Poleg

**Preglednica 1:** Kategorije polimorfizmov, ki vplivajo na z miRNA posredovano uravnavanje genov

**Table 1:** Categories of polymorphisms that affect miRNA-mediated gene regulation

	Polimorfizmi v genih za miRNA	Polimorfizmi v tarčah za miRNA	Polimorfizmi v genih, ki kodirajo komponente mehanizma za utišanje genov (angl. silencing machinery) (npr.: Dicer, Drosha)
i)	Spremenijo zaporedje zrele miRNA, pri- ali pre-miRNA	Spremenijo vezavno mesto za miRNA	Spremenijo zaporedje aminokislin
ii)	Spremenijo zaporedje promotorja pri-miRNA	Ustvarijo neligitimno vezavno mesto za miRNA	Spremenijo koncentracijo proteina
iii)	Različice v številu kopij vplivajo na število kopij miRNA	Spremenijo 3' konec zaporedja gena (npr. alternativna poliadenilacija)	Različice v številu kopij

(prirejeno po Georges in sod., 2007)



**Preglednica 2:** Mikro RNA in njihove funkcije pri govedu

**Table 2:** MicroRNAs and their functions in cattle

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-143</i>	Diferenciacija in proliferacija preadipocitov	Li in sod., 2011
<i>miR-19a, -92a, -92b, -101, -103, -106, -142-5p, -296, -378</i>	Adipogeneza	Jin in sod., 2010; Romao in sod., 2012
<i>miR-1, miR-206, -181b</i>	Diferenciacija mišičnih celic	Naguibneva in sod., 2006; Miretti in sod., 2010; Townley-Tilson in sod., 2010
<i>miR-106a</i>	Razvoj oocitov	Miles in sod., 2012
<i>miR-205, -150, -122, -96, -146a, -146b-5p</i>	Zorenje oocitov	Abd El Naby in sod., 2011
<i>miR-196a</i>	Zorenje foliklov	Tripurani in sod., 2011
<i>miR-181a</i>	Zgodnji razvoj zarodka in odziv imunskega sistema	Lingenfelter in sod., 2011; Naeem in sod, 2012
<i>miR-21, miR-130a</i>	Zgodnji razvoj zarodka	Guduric-Fuchs in sod., 2012; Mondou in sod., 2012
<i>miR-155, -223</i>	Protivnetna vloga	Izumi in sod, 2012

tega imajo miRNA potencial za razvoj biooznačevalcev (biomarkerjev) za nekatere bolezni in za razvoj diagnostičnih testov (Fatima in Morris, 2013).

Za miRNA velja, da so evolucijsko ohranjene. Veliko miRNA pri človeku ima podobne funkcije in podobna zaporedja kot miRNA pri rejnih živalih, kar kaže na evolucijsko ohranjanje funkcij miRNA. Nekatere družine miRNA pa so specifične za posamezno vrsto, saj jih ob primerjavi z drugimi genomi ne najdejo (Lawless in sod., 2014). Trenutna verzija podatkovne zbirke miRBase (verzija 21, junij 2014) vsebuje 3477 zrelih miRNA pri govedu, kokoših, konjih, prašičih, ovcah in kozah skupaj.

#### 2.4.1 MIKRO RNA PRI GOVEDU

V genomu goveda so do sedaj odkrili 793 zrelih miRNA, ki so kodirane na vseh kromosomih (Lawless in sod., 2014). Študije se osredotočajo predvsem na vlogo miRNA v maščevju, skeletnih mišicah, oocitu in razvoju zarodka. V preglednici 2 je naštetih nekaj teh vlog miRNA.

Izražanje *miR-143* se poveča ob diferenciaciji intramuskularnih preadipocitov v adipocite (Li in sod., 2011). Osem miRNA (*miR-19a, -92a, -92b, -101, -103, -106, -142-5p* in *-296*), ki se izraža v maščobnem tkivu, se odziva na vnos krme z visoko vsebnostjo maščob. Domnevajo, da so del regulatornega omrežja genov, ki posredujejo pri konzumaciji z maščobami obogatene obroka, kar povzroča adipogenezo (Romao in sod., 2012).

Nekatere živali pasme piemontese so imele dvojno omišičenost zaradi točkovne mutacije v genu za miosta-

tin (Berry in sod., 2002). Miretti in sod. (2011) so primerjali izražanje teh dveh miRNA v skeletnih mišicah pri pasmi piemontese in črno-beli pasmi. Ugotovili so, da v izražanju *miR-1* ni razlik med pasmama, medtem ko so za *miR-206* ugotovili višje izražanje pri piemontese kot pri črno-beli, kar pomeni, da *miR-206* prispeva k mišični hipertrofiji pasme piemontese.

Izražanje *miR-106a* v oocitu goveda je bilo višje kot pri kompleksu jajčna celica-kumulus. Izražanje gena *WEE1A*, na katerega deluje *miR-106a*, je bilo v oocitu goveda posledično nižje kot pri kompleksu jajčna celica-kumulus. Te razlike kažejo na vlogo *miR-106a* pri razvoju oocitov s tem, ko znižujejo raven izražanja gena *WEE1A* (Miles in sod., 2012). Podobno delujeta tudi *miR-196a* in *miR-181a*. Prva deluje na gen *NOBOX* (Tripurani in sod., 2011) in druga deluje na gen *NPM2* (Lingenfelter in sod., 2011). Poleg tega so tarče *miR-181a* tudi geni, ki so pomembni pri fagocitozi in procesiranju antigenov (Naeem in sod, 2012).

Ob primerjavi izražanja miRNA v kolostrumu in v zrelem mleku, so ugotovili, da je bilo kar nekaj miRNA višje izraženih v kolostrumu, med njimi *miR-155* in *miR-223* (Izumi in sod, 2012). Pri tem *miR-155* regulira diferenciacijo imunskih T-celic, *miR-223* pa je povezan z aktivacijo nevtrofilcev (Lindsay, 2008).

#### 2.4.2 MIKRO RNA PRI KOKOŠIH

Kokoši so pomembne tako z vidika prireje mesa kot z vidika prireje jajc, zato so vloge miRNA pri razvoju mišičnega in maščobnega tkiva ter pri procesu nastajanja

**Preglednica 3:** Mikro RNA in njihove funkcije pri govedu**Table 3:** MicroRNAs and their functions in cattle

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-1a</i> , -133a, -122, -199	Razvoj maščobnega tkiva in skeletnih mišic	Wang in sod., 2012
<i>miR-206</i> , -10b, -1, -23b, -19b, -23a, -27a	Razvoj skeletnih mišic	Sweetman in sod., 2006; Li in sod., 2011; Wang in sod., 2012
<i>miR-143</i>	Proliferacija in apoptoza celic maščobnega tkiva	Trakooljul in sod., 2010
<i>miR-126</i> , -455-5p, -181b, -145	Diferenciacija maščobnih celic	Wang in sod., 2012
<i>miR-221</i> , -142-3p, -365, -34a	Hondrogeneza	Kim in sod., 2010, 2011a, 2011b, 2012; Guan in sod., 2011;
<i>miR-202*</i> , -101, -31, -202-5p	Razvoj moških in ženskih spolnih žlez	Bannister in sod., 2011; Cutting in sod., 2012
<i>miR-499</i> , <i>miR-1709</i>	Razvoj jajcevoda in nastajanje jajc	Lee in sod., 2012
<i>miR-124a</i> , <i>miR-1669</i>	Razvoj jajcevoda in zarodka	Jeong in sod., 2012
<i>miR-181a*</i>	Diferenciacija in delitev primordijalnih zarodnih celic	Lee in sod., 2011
<i>miR-15c</i> , -29b, -383, -222	Metilacija DNA v primordijalnih zarodnih celicah	Rengaraj in sod., 2011
<i>miR-302</i> , <i>miR-456</i>	Uravnavanje diferenciacije blastoderma	Lee in sod., 2011

jajc prav tako pomembne (Wang in sod., 2013). Trenutno je v podatkovni zbirki miRBase zbranih že 994 zrelih miRNA. Odkrili so tudi že veliko njihovih vlog, od katerih jih je nekaj predstavljenih v preglednici 3.

V maščobnem tkivu *miR-122* deluje na gene, ki med drugim sodelujejo pri odpornosti na vročinski stres in pri tvorbi hrustanca in kosti. Na drugi strani *miR-133a* v skeletnih mišicah vpliva na gene, ki sodelujejo pri različnih celičnih procesih kot so izražanje mRNA, regulacija steroidov, transport ionov itd. V skeletnih mišicah deluje tudi *miR-1a*. Delovanje te miRNA vpliva na gene, ki tvorijo receptorje na transmembranskih proteinih, ki so pomembni za zvijete, procesiranje, stabilnost in lokalizacijo proteinov in ki domnevno sodelujejo pri diferenciaciji, proliferaciji in smrti celic. V obeh tkivih deluje *miR-199* in sicer v maščevju vpliva na delovanje lipoproteinske lipaze ter v mišicah ureja razvoj GTP-vezavnega proteina (Wang in sod., 2012). Izražanje fibroblastnega rastnega faktorja (FGF4) v mišicah, ki ima ključno vlogo pri miogenezi, vpliva na transkripcijo *miR-1* in *miR-206* (Sweetman in sod., 2006). Skupaj z *miR-10b*, je *miR-206* največkrat dokazana miRNA v skeletnih mišicah tako pri nesnih kot pri pitovnih pasmah kokoših, tudi njuni vlogi sta povezani z razvojem skeletnih mišic (Li in sod., 2013).

Mikro RNA urejajo tudi spolni dimorfizem in vodijo razvoj ženskih in moških spolnih žlez pri kokoših. Eden takšnih je gen *miR-202\**, ki je na vseh razvojnih stopnjah testisov višje izražen kot pri razvoju jajčnikov, kar kaže na njegovo vlogo pri razvoju moških gonad

(Bannister in sod., 2011). *MiR-499* in *miR-1709* sta povezani z regulacijo rastnega faktorja pleiotropina (angl. pleiotrophin; PTN) (Lee in sod., 2012). Na izražanje proteina AHCYL1 (angl. S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1), ki je pomemben pri razvoju zarodka, vplivata *miR-124a* in *miR-1669*. Poleg tega so tarčni geni teh dveh miRNA vključeni v razvoj in diferenciacijo jajcevoda (Jeong in sod., 2012).

V primordijalnih zarodnih celicah imajo vlogo *miR-181a\**, -15c, -29b, -383 in -222. Prva, *miR-181a\**, zavira diferenciacijo teh celic in preprečuje njihov vstop v mejozo (Lee in sod., 2011). Ostale miRNA nadzirajo gen *DNMT3B*, ki je odgovoren za metilacijo DNA v zarodnih celicah (Rengaraj in sod., 2011). *MiR-302* in *miR-456* vplivata na transkripcijski dejavnik iz družine SOX in s tem ohranjata celice blastoderma na nediferencirani stopnji (Lee in sod., 2011).

Polimorfizmi posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism; SNP), ki nastanejo znotraj regije *seed* zrele miRNA pomembno vplivajo na fenotipske lastnosti. Nekaj takšnih so odkrili pri kokoših, med drugimi znotraj gena za *miR-1657*, za te miRNA so ugotovili, da pomembno vplivajo na rast piščancev in na lastnosti kakovosti mesa (Li in sod., 2012). Tudi SNP znotraj gena *miR-1614-3p* posredno vpliva na kakovost mesa s tem, ko vpliva na sposobnost mišic, da zadržujejo vodo, na mehkoobo mesa (angl. muscle tenderness) in na količino abdominalne maščobe (Li in sod., 2013).

**Preglednica 4:** Mikro RNA in njihove funkcije pri prašičih

**Table 4:** MicroRNAs and their functions in pigs

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-155</i>	Razvoj skeletnih mišic in vloga pri odpornosti	Zhao in sod., 2012)
<i>miR-1, -206, -148a</i>	Miogeneza	Holley in sod, 2011; Tang in sod., 2014
<i>miR-215, -135, -224, -146b, -1a, -133a, -122, -204, -183, -143, -103, -148</i>	Razvoj in rast maščobnega tkiva	Li in sod., 2011; Chen in sod., 2012
<i>miR-122</i>	Metabolizem lipidov	Cirera in sod., 2010
<i>miR-148b</i>	Razkrečenost nog	Maak in sod., 2010
<i>miR-378</i>	Razvoj in delovanje jajčnikov ter miogeneza	Xu in sod., 2011
<i>miR-153, -205, -196, -485-3p, -149*</i>	Regulacija spermatogeneze	Lian in sod., 2012
<i>miR-18a, -21, -24</i>	Pomembni celični procesi pri zarodkih	Stowe in sod, 2012
<i>miR-27a</i>	Velikost gnezda	Lei in sod., 2011

## 2.4.3 MIKRO RNA PRI PRAŠIČIH

Prašiči so gospodarsko izredno pomembna vrsta živali za prirejo mesa. Poleg tega so tudi dobri modelni organizmi. V številnih raziskavah so raziskovali vpliv miRNA na izboljšanje njihove proizvodnosti. Zrelah miRNA, odkritih pri prašičih, je v podatkovni zbirki miRBase 411. Nekatere vloge miRNA v bioloških procesih so nasete v preglednici 4.

Gen *OLFML3* (angl. olfactomedin-like 3), ki je vključen v formiranje matriksa med mišičnimi celicami, se različno izraža v skeletnih mišicah pasme landrace kot pri pasmi tongcheng na pre- in postnatalni ravni razvoja prašičev. Odkrili so, da izražanje tega gena uravnava *miR-155*. Zvišano raven izražanja te miRNA so odkrili tudi v vranici, kjer ureja imunost (Zhao in sod., 2012).

Ob primerjavi izražanja miRNA v maščevju so ugotovili razlike med pasmami. Pri pasmi veliki beli prašič so bile bolj izražene *miR-215, -135, -224* in *-146b*, pri pasmi meishan pa so bile bolj izražene *miR-1a, -133a, -122, -204* in *-183*. Prašiči pasme meishan so znani kot bolj zamaščeni (Chen in sod., 2012). Z debelostjo povezujejo *miR-122*, ki je pomemben regulator metabolizma lipidov. Pri pujskih, ki so jih krmili z visoko kaloričnim obrokom, so opazili nižjo raven izražanja *miR-122* kot pri tistih, ki so jih krmili z normalnim obrokom (Cirera in sod., 2010).

Hormoni jajčnikov so zelo pomembni pri repro-

dukaciji. Encim aromataza pretvori androgen v estrogen in uravnavanje gena *CYP19* lahko vpliva na razvoj in delovanje jajčnikov. Znižano raven izražanja gena za aromatazo povzroči *miR-378* (Xu in sod., 2011).

Veliko miRNA so našli v oocitih in zarodkih. Med njimi *miR-18a, -21* in *-24*, katerih tarčni geni so vključeni v diferenciacijo in signalizacijo celic in še v nekatere druge celične procese (Stowe in sod., 2012). Polimorfizem posameznega nukleotida v genu za *miR-27a* je bil odkrit pri pasmi veliki beli prašič in pri maternalni liniji modernega mesnega tipa kitajskih prašičev (angl. Dam line of Chinese lean-type new lines pigs). Znotraj slednje se je pokazala velika razlika v velikosti gnezd med posameznimi genotipi, medtem ko pri velikem belem prašiču te razlike niso opazili (Lei in sod., 2011).

## 2.4.4 MIKRO RNA PRI OVCAH

V literaturi najbolj citirana posledica delovanja miRNA pri rejnih živalih je bila odkrita pri ovcah. To je mišična hipertrofija pri pasmi teksel (angl. texel). Poleg te sta v preglednici 5 prikazani še dve povezavi med miRNA in fenotipom živali. V zbirki miRBase je zbranih 153 zrelih miRNA za to vrsto.

Gen za miostatin je pomemben regulator pri rasti in razvoju skeletnih mišic. Zaradi zamenjave gvanina za adenin na 3' koncu tega gena, nastane na tem delu tarčno mesto za *miR-1* in *miR-206*. Ti dve miRNA z vezavo na tarčno mesto inhibirata gen za miostatin in s tem vplivata na razvoj mišične hipertrofije ovc pasme teksel (Clop in sod., 2006).

V dolgi hrbtni mišici se izraža *let-7g*, ob povišanem izražanju te miRNA se zmanjša, ob znižanem izražanju pa poveča nastajanje adipocitov (Yan in sod., 2013). *MiR-*

**Preglednica 5:** Mikro RNA in njihove funkcije pri ovcah

**Table 5:** MicroRNAs and their functions in sheep

Mikro RNA	Funkcija miRNA	Vir
<i>miR-1, miR-206</i>	Mišična hipertrofija	Clop in sod., 2006
<i>let-7g</i>	Adipogeneza	Yan in sod., 2013
<i>miR-22</i>	Razvoj testisov	Torley in sod., 2011

22 se izraža v Sertolijevih celicah, kjer preprečujejo vplivanje estrogena na zarodek v času razvoja testisov (Torley in sod., 2011).

#### 2.4.5 BIOINFORMACIJSKA ORODJA ZA RAZISKAVE MIRNA V ŽIVINOREJI

Kljub pomembni vlogi, ki jo imajo miRNA, je, v primerjavi z drugimi vrstami, raziskav pri rejnih živalih precej manj. Prav tako je pri teh vrstah razvitih manj bioinformacijskih orodij in podatkovnih zbirk. V okviru naših raziskav smo razvili bioinformacijsko orodje miRNA SNIper, ki omogoča analizo genetske variabilnosti pri 15 vrstah živali (Zorc in sod., 2015). Z analizo *in silico* na ravni celotnega genoma smo izdelali katalog polimorfizmov v zrelih miRNA pri rejnih živali.

### 3 ZAKLJUČEK

Čeprav so miRNA še pred nekaj več kot dvajsetimi leti uvrščali med nefunkcionalne regije genoma, jih danes dojemamo povsem drugače. Z raziskavami so ugotovili, da je tudi ta nekodirajoči del genoma funkcionalen in ima pomembno vlogo pri uravnavanju izražanja kodirajočih genov. S svojim delovanjem vplivajo na potek različnih bioloških poti tudi pri rejnih živalih in posredno s tem na njihove ekonomsko pomembne lastnosti v kmetijstvu. Prisotne so v različni tkivih in telesnih tekočinah, kjer vplivajo na razvoj mišic, rast maščevja, delovanje spolnih žlez, razvoj zarodka in imunske odzive. Informacije o delovanju miRNA, o polimorfizmih, ki vplivajo na njihovo delovanje in o tarčnih genih bi lahko postale pomembne komponente selekcijskih programov za izboljšanje fenotipskih lastnosti rejnih živali. Mehanizmi delovanja miRNA so zelo kompleksni in še niso v celoti raziskani. Dosedanje študije kažejo, da imajo miRNA velik potencial za aplikacijo v kmetijstvu.

### 4 VIRI

Abd El Naby W.S., Hagos T.H., Hossain M.M., Salilew-Wondim D., Gad A.Y., Rings F., Cinar M.U., Tholen E., Looft C., Schellander K., Hoelker M., Tesfaye D. 2011. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote*, 21, 1: 31–51. doi:10.1017/S0967199411000566

Bannister S.C., Smith C.A., Roeszler K.N., Doran T.J., Sinclair A.H., Tizard M.L. 2011. Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202\* expression in embryonic chicken gonads. *Biology of Reproduction*, 85, 1: 22–30. doi:10.1095/biolreprod.110.088476

Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 2: 281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5

Berry C., Thomas M., Langley B., Sharma M., Kambadur R. 2002. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 283, 1: C135–C141. doi:10.1152/ajpcell.00458.2001

Chen C., Deng B., Qiao M., Zheng R., Chai J., Ding Y., Peng J., Jiang S. 2012. Solexa sequencing identification of conserved and novel microRNAs in backfat of Large White and Chinese Meishan pigs. *Plos One*, 7, 2: e31426. doi:10.1371/journal.pone.0031426

Cirera S., Birck M., Busk P.K., Fredholm M. 2010. Expression profiles of miRNA-122 and its target CAT1 in minipigs (*Sus scrofa*) fed a high-cholesterol diet. *Comparative Medicine*, 60, 2: 136–141

Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Natural Genetics*, 38, 7: 813–818. doi:10.1038/ng1810

Cutting A.D., Bannister S.C., Doran T.J., Sinclair A.H., Tizard M.V., Smith C.A. 2012. The potential role of microRNAs in regulating gonadal sex differentiation in the chicken embryo. *Chromosome Research*, 20, 1: 201–213. doi:10.1007/s10577-011-9263-y

Fatima A., Morris D.G. 2013. MicroRNAs in domestic livestock. *Physiological Genomics*, 45, 16: 685–696. doi:10.1152/physiolgenomics.00009.2013

Georges M., Coppieters W., Charlier C. 2007. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17, 3: 166–176. doi:10.1016/j.gde.2007.04.005

Guan Y.J., Yang X., Wei L., Chen Q. 2011. MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25, 12: 4457–4466. doi:10.1096/fj.11-185132

Guduric-Fuchs J., O'Connor A., Cullen A., Harwood L., Medina R.J., O'Neill C.L., Stitt A.W., Curtis T.M., Simpson D.A. 2012. Deep sequencing reveals predominant expression of miR-21 amongst the small non-coding RNAs in retinal microvascular endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 6: 2098–2111. doi:10.1002/jcb.24084

Holley C., Topkara V. 2011. An introduction to small non-coding RNAs: miRNA and snoRNA. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 25, 2: 151–159. doi:10.1007/s10557-011-6290-z

Hou X., Tang Z., Liu H., Wang N., Ju H., Li K. 2012. Discovery of MicroRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs. *Plos One*, 7, 12: e52123

Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Balint E., Tuschl T., Zamore P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small

- temporal RNA. *Science*, 293, 5531: 834–838. doi:10.1126/science.1062961
- Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T., Takase M. 2012. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, 95, 9: 4831–4841. doi:10.3168/jds.2012-5489
- Jeong W., Kim J.M., Ahn S., Lee S., Bazer F., Han J., Song G. 2012. AHCYL1 is mediated by estrogen-induced ERK1/2 MAPK cell signaling and microRNA regulation to effect functional aspects of the avian oviduct. *Plos One*, 7, 11: e49204
- Jin W., Dodson M.V., Moore S.S., Basarab J.A., Guan L.L. 2010. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Molecular Biology*, 11, 29: 1–8. doi:10.1186/1471-2199-11-29
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 2: 209–216. doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8
- Kim D., Song J., Jin E.J. 2010. MicroRNA-221 regulates chondrogenic differentiation through promoting proteosomal degradation of slug by targeting Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 35: 26900–26907. doi:10.1074/jbc.M110.115105
- Kim D., Song J., Kim S., Chun C.H., Jin E.J. 2011a. MicroRNA-34a regulates migration of chondroblast and IL-1beta-induced degeneration of chondrocytes by targeting EphA5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415, 4: 551–557. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.087
- Kim D., Song J., Kim S., Kang S.S., Jin E.J. 2011b. MicroRNA-142-3p regulates TGF-beta3-mediated region-dependent chondrogenesis by regulating ADAM9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414, 4: 653–659. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.104
- Kim D., Song J., Kim S., Park H.M., Chun C.H., Sonn J., Jin E.J. 2012. MicroRNA-34a modulates cytoskeletal dynamics through regulating RhoA/Rac1 cross-talk in chondroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 15: 12501–12509. doi:10.1074/jbc.M111.264382
- Kim H.K., Lee Y.S., Sivaprasad U., Malhotra A., Dutta A. 2006. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *Journal of Cell Biology*, 174, 5: 677–687. doi:10.1083/jcb.200603008
- Kozomara A., Griffiths Jones S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42: D68–D73. doi:10.1093/nar/gkt1181
- Lawless N., Vegh P., O'Farrelly C., Lynn D.J. 2014. The role of microRNAs in bovine infection and immunity. *Frontiers in Immunology*, 5, 611: 1–7
- Lee J.Y., Jeong W., Lim W., Kim J., Bazer F.W., Han J.Y., Song G. 2012. Chicken pleiotrophin: regulation of tissue specific expression by estrogen in the oviduct and distinct expression pattern in the ovarian carcinomas. *Plos One*, 7, 4: e34215
- Lee S.I., Lee B.R., Hwang Y.S., Lee H.C., Rengaraj D., Song G., Park T.S., Han J.Y. 2011. MicroRNA-mediated posttranscriptional regulation is required for maintaining undifferentiated properties of blastoderm and primordial germ cells in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 26: 10426–10431. doi:10.1073/pnas.1106141108
- Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N. 2002. MicroRNA maturation stepwise processing and subcellular localization. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21, 17: 4663–4670. doi:10.1093/emboj/cdf476
- Lei B., Gao S., Luo L.F., Xia X.Y., Jiang S.W., Deng C.Y., Xiong Y.Z., Li F.E. 2011. A SNP in the miR-27a gene is associated with litter size in pigs. *Molecular Biology Reports*, 38, 6: 3725–3729. doi:10.1007/s11033-010-0487-2
- Li G., Li Y., Li X., Ning X., Li M., Yang G. 2011. MicroRNA identity and abundance in developing swine adipose tissue as determined by Solexa sequencing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 5: 1318–1328. doi:10.1002/jcb.23045
- Li H., Zhang Z., Zhou X., Wang Z., Wang G., Han Z. 2011. Effects of microRNA-143 in the differentiation and proliferation of bovine intramuscular preadipocytes. *Molecular Biology Reports*, 38, 7: 4273–4280. doi:10.1007/s11033-010-0550-z
- Li H., Sun G.R., Lv S.J., Wei Y., Han R.L., Tian Y.D., Kang X.T. 2012. Association study of polymorphisms inside the miR1657 seed region with chicken growth and meat traits. *British Poultry Science*, 53, 6: 770–776. doi:10.1080/00071668.2012.750716
- Li H., Sun G.R., Tian Y.D., Han R.L., Li G.X., Kang X.T. 2013. MicroRNAs-1614-3p gene seed region polymorphisms and association analysis with chicken production traits. *Journal of Applied Genetics*, 54, 2: 209–213. doi:10.1007/s13353-013-0142-4
- Li T., Wu R., Zhang Y., Zhu D. 2011. A systematic analysis of the skeletal muscle miRNA transcriptome of chicken varieties with divergent skeletal muscle growth identifies novel miRNAs and differentially expressed miRNAs. *BMC Genomics*, 12, 186: 1–20. doi:10.1186/1471-2164-12-186
- Lian C., Sun B., Niu S., Yang R., Liu B., Lu C., Meng J., Qiu Z., Zhang L., Zhao Z. 2012. A comparative profile of the microRNA transcriptome in immature and mature porcine testes using Solexa deep sequencing. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 279, 6: 964–975. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08480.x
- Lindsay M.A. 2008. MicroRNAs and the immune response. *Trends in Immunology*, 29, 7: 343–351. doi:10.1016/j.it.2008.04.004
- Lingenfelter B.M., Tripurani S.K., Tejomurtula J., Smith G.W., Yao J. 2011. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 40: 1–9. doi:10.1186/1477-7827-9-40
- Maak S., Boettcher D., Komolka K., Tetens J., Wimmers K., Reinsch N., Swalve H.H., Thaller G. 2010. Exclusion of sequence polymorphisms in the porcine ITGA5 and MIR148B loci as causal variation for congenital splay leg in piglets. *Animal Genetics*, 41, 4: 447–448
- McDaneld T.G. 2009. MicroRNA mechanism of gene regulation and application to livestock. *Journal of Animal Science*, 87, 14: E21–E28. doi:10.2527/jas.2008-1303
- Miles J.R., McDaneld T.G., Wiedmann R.T., Cushman R.A., Echterkamp S.E., Vallet J.L., Smith T.P. 2012. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes:

- possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, 130, 1–2: 16–26
- Miretti S., Martignani E., Taulli R., Bersani F., Accornero P., Baratta M. 2011. Differential expression of microRNA-206 in skeletal muscle of female Piedmontese and Friesian cattle. *Veterinary Journal*, 190, 3: 412–413. doi:10.1016/j.tvjl.2010.12.012
- Mondou E., Dufort I., Gohin M., Fournier E., Sirard M.A. 2012. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. *Molecular Human Reproduction*, 18, 9: 425–434. doi:10.1093/molehr/gas015
- Muramatsu H., Zou P., Kurosawa N., Ichihara-Tanaka K., Maruyama K., Inoh K., Sakai T., Chen L., Sato M., Muramatsu T. 2006. Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors. *Genes Cells*, 11, 12: 1405–1417. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.01028.x
- Naeem A., Zhong K., Moisa S., Drackley J., Moyes K., Loor J. 2012. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Science*, 95, 11: 6397–6408. doi:10.3168/jds.2011-5173
- Naguibneva I., Ameyar-Zazoua M., Polesskaya A., Ait-Si-Ali S., Groisman R., Souidi M., Cuvellier S., Harel-Bellan A. 2006. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature Cell Biology*, 8, 3: 278–284. doi:10.1038/ncb1373
- Rengaraj D., Lee B.R., Lee S.I., Seo H.W., Han J.Y. 2011. Expression patterns and miRNA regulation of DNA methyltransferases in chicken primordial germ cells. *Plos One*, 6, 5: e19524
- Romao J.M., Jin W., He M., McAllister T., Guan le L. 2012. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PLoS One*, 7, 7: e40605
- Stowe H.M., Curry E., Calcaterra S.M., Krisher R.L., Paczkowski M., Pratt S.L. 2012. Cloning and expression of porcine Dicer and the impact of developmental stage and culture conditions on microRNA expression in porcine embryos. *Gene*, 501, 2: 198–205. doi:10.1016/j.gene.2012.03.058
- Sweetman D., Rathjen T., Jefferson M., Wheeler G., Smith T. G., Wheeler G.N., Munsterberg A., Dalmay T. 2006. FGF-4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. *Developmental Dynamics*, 235, 8: 2185–2191. doi:10.1002/dvdy.20881
- Tang Z., Liang R., Zhao S., Wang R., Huang R., Li K. 2014. CNN3 is regulated by microRNA-1 during muscle development in pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 4: 377–385. doi:10.7150/ijbs.8015
- Torley K.J., da Silveira J.C., Smith P., Anthony R.V., Veeramachaneni D.N., Winger Q.A., Bouma G.J. 2011. Expression of miRNAs in ovine fetal gonads: potential role in gonadal differentiation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 2: 1–11. doi:10.1186/1477-7827-9-2
- Townley-Tilson W.H., Callis T.E., Wang D. 2010. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42, 8: 1252–1255. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.002
- Trakooljul N., Hicks J.A., Liu H.C. 2010. Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR-143. *Animal Genetics*, 41, 4: 357–364
- Tripurani S.K., Lee K.B., Wee G., Smith G.W., Yao J. 2011. MicroRNA-196a regulates bovine newborn ovary homeobox gene (NOBOX) expression during early embryogenesis. *BMC Developmental Biology*, 11, 25: 1–9. doi:10.1186/1471-213x-11-25
- Wang X., Gu Z., Jiang H. 2013. MicroRNAs in farm animals. *Animal*, 7, 10: 1567–1575. doi:10.1017/S1751731113001183
- Wang X.G., Yu J.F., Zhang Y., Gong D.Q., Gu Z.L. 2012. Identification and characterization of microRNA from chicken adipose tissue and skeletal muscle. *Poultry Science*, 91, 1: 139–149. doi:10.3382/ps.2011-01656
- Xu S., Linher-Melville K., Yang B.B., Wu D., Li J. 2011. MicroRNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase. *Endocrinology*, 152, 10: 3941–3951. doi:10.1210/en.2011-1147
- Yan X., Huang Y., Zhao J.X., Rogers C.J., Zhu M.J., Ford S.P., Nathanielsz P.W., Du M. 2013. Maternal obesity downregulates microRNA let-7g expression, a possible mechanism for enhanced adipogenesis during ovine fetal skeletal muscle development. *International Journal of Obesity*, 37, 4: 568–575. doi:10.1038/ijo.2012.69
- Zhao S., Zhang J., Hou X., Zan L., Wang N., Tang Z., Li K. 2012. OLFML3 expression is decreased during prenatal muscle development and regulated by microRNA-155 in pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 4: 459–469. doi:10.7150/ijbs.3821
- Zorc M., Omejec S., Tercic D., Holcman A., Dovc P., Kunec T. 2015. Catalog of genetic variants within mature microRNA seed regions in chicken. *Poultry Science*, 94, 9: 2037–2040. doi:10.3382/ps/pev170

# PRISPEVEK BIOPLINSKIH NAPRAV V SLOVENIJI K ZMANJŠEVANJU TOPLOGREDNEGA UČINKA IZ KMETIJSKEGA SEKTORJA

Romana MARINŠEK LOGAR <sup>1</sup>, Neža NOVAK <sup>2</sup>, Maša VODOVNIK <sup>2</sup>

Delo je prispelo 19. marca 2015, sprejeto 20. maja 2015.  
Received March 19, 2015; accepted May 20, 2015.

## *Prispevek bioplinskih naprav v Sloveniji k zmanjševanju toplogrednega učinka iz kmetijskega sektorja*

Kmetijstvo je vir emisij toplogrednega plina metana v okolje. Te emisije lahko zmanjšamo z ustreznim skladiščenjem gnojevke in gnoja, s pravilnim gnojenjem in ustrezno predelavo organskih kmetijskih odpadkov v bioplin, kjer metan kontrolirano zajemamo, uporabimo kot vir energije in s tem zmanjšujemo nekontrolirane emisije toplogrednih plinov v atmosfero. Bioplin je obnovljiv vir energije, ki ga proizvajamo z mikrobnano anaerobno razgradnjo v bioplinskih napravah. Substrati v bioplinskih napravah so različne vrste organske biomase kot so živinski gnoj in gnojevka, žetveni ostanki, pokvarjena silaža, odpadki iz živilsko-predelovalne industrije in biorazgradljivi industrijski in komunalni odpadki. Nastali bioplin lahko uporabimo za proizvodnjo toplote in električne energije, očiščenega pa kot pogonsko gorivo (biometan). Presnovljen substrat lahko uporabimo kot kakovostno organsko gnojilo. Bioplin kot obnovljivi vir energije predstavlja zamenjavo za fosilna goriva in tako dodatno zmanjšuje emisije toplogrednih plinov iz fosilnih goriv. V Sloveniji je v uporabi sistem finančnih podpor električni energiji, proizvedeni iz bioplina. Leta 2014 je v Sloveniji delovalo 24 bioplinskih naprav, ki največji delež bioplina proizvedejo iz energetskih rastlin. Premajhen delež bioplina proizvedemo iz gnojevke in gnoja, zato bomo v bodoče prvenstveno podpirali razvoj kmetijskih mikrobioplinskih naprav, ki bodo kot substrat uporabljale živinska gnojila in odpadno organsko biomaso iz agro-živilskega sektorja.

**Ključne besede:** kmetijstvo / bioplin / toplogredni učinek / Slovenija

## *The contribution of Slovenian biogas plants to the reduction of agricultural sector green house emissions*

Agriculture is a source of emissions of the greenhouse gas methane into the environment. These emissions can be reduced by appropriate storage of animal slurry and manure, with proper fertilization and processing of organic agricultural waste into biogas, where methane is captured and used as an energy source. Biogas is a renewable source of energy that is produced by microbial anaerobic digestion in biogas plants. As a substrate in biogas plants using different types of organic biomass such as animal manure and slurry, crop residues, spoiled silage, waste from food processing industry and biodegradable industrial and municipal waste. Biogas can be used to produce heat and electricity or purified to biomethane as a fuel for vehicles. Digestate can be used as a high-quality fertilizer. Biogas as a renewable energy source represents a replacement for fossil fuels, thus reducing greenhouse gas emissions from fossil sources. The system of financial supports for electricity produced from biogas is applied in Slovenia. There were 24 operating biogas plants in Slovenia in year 2014. Slovenian biogas plants currently produce the majority of biogas from energy crops. As only the minority of biogas is produced from animal excrements we will primarily support the development of agricultural micro-biogas plants that will use animal excrements and organic waste biomass from agri-food sector as substrates.

**Key words:** agriculture / biogas / green house effect / Slovenia

<sup>1</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-naslov: romana.marinsek@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Isti naslov kot 1

## 1 UVOD

Pospešen napredek v kmetijstvu so v zadnjem stoletju omogočila fosilna pogonska goriva. Ker so količine fosilnih goriv omejene in ker njihova intenzivna uporaba povečuje učinek toplogrednih plinov in s tem povezane klimatske spremembe, se osredotočamo na ekonomično izrabo omejenih virov in na iskanje novih tehnologij za izkoriščanje obnovljivih virov, kot je biomasa različnih virov (velik delež tu predstavlja odpadna kmetijska biomasa), za nadaljnjo proizvodnjo energije (Deublein in Steinhauser, 2008).

V zadnjih nekaj letih se je spet močno povečal interes za proizvodnjo bioplina z anaerobno razgradnjo organskih snovi in njegovo uporabo kot obnovljiv vire energije. Interes za proizvodnjo bioplina se je sicer ciklično povečeval z vsako naftno krizo do sedaj, trenutno pa ga podpira tudi globalno okoljsko zavedanje o toplogrednih učinkih. Pri uporabi fosilnih goriv preoblikujemo ogljik, ki je shranjen v zemeljski skorji, in ga izpustimo v ozračje kot toplogredni plin  $\text{CO}_2$ . Pri uporabi bioplina se v končni fazi tudi sprošča  $\text{CO}_2$ , vendar je v tem primeru ogljik odvzet iz atmosfere s fotosintezo rastlin in je kroženje ogljika zelo kratko, od enega do nekaj let. Če gnoja in gnojevke ne shranjujemo pravilno in sta podvržena spontani anaerobni fermentaciji, v ozračje spuščamo toplogredni plin  $\text{CH}_4$ .  $\text{CH}_4$  prispeva približno 20 % k antropogenemu učinku tople grede. Polovico vseh virov onesnaževanja s  $\text{CH}_4$ , ki ga povzroča človek, predstavlja govedoreja. Pri proizvodnji bioplina  $\text{CH}_4$  nastaja kontrolirano, se zajame in se porabi za proizvodnjo energije, pri tem pa so izpusti v ozračje zmanjšani (Berglund, 2006).

Proizvodnja bioplina kot obnovljivega vira energije ima za kmetijski sektor več pozitivnih učinkov: dodatni vir zaslužka v kmetijski dejavnosti, gre za ekonomsko upravičen in okoljsko sprejemljiv način odstranjevanja odpadne kmetijske biomase in stranskih živalskih proizvodov, presnovljen substrat predstavlja kakovostno organsko gnojilo, emisije smradu so manjše kot pri konvencionalnem shranjevanju in raztrosu surovega gnoja in gnojevke, zmanjšuje se odvisnosti od uvoza fosilne energije, saj proizvodnja bioplina poteka lokalno in znotraj državnih meja. V procesu anaerobne razgradnje iz ogljikovih spojin nastaja  $\text{CH}_4$  kot energetski plin, nekatere ogljikove spojine pa ostanejo v digestatu, ki ga uporabimo kot gnojilo, ta povečuje vsebnost organske snovi v zemlji in posledično poveča kapaciteto za zadrževanje vode v tleh (Deublein in Steinhauser, 2008).

## 2 PROCES PROIZVODNJE BIOPLINA

Bioplin je plin brez vonja in barve, ki gori z modrim plamenom, podobno kot utekočinjen naftni plin. Običajno je sestavljen iz 60–70 %  $\text{CH}_4$ , 40–30 %  $\text{CO}_2$ , vodne pare in vodikovega sulfida v sledih (Christy in sod., 2014). Nastaja v mikrobnem procesu anaerobne razgradnje, kjer mešana mikroba združba anaerobnih bakterij in arhejske kompleksne organske snovi v večstopenjskem procesu pretvori v bioplin, nov mikrobnih celični material, mineralizirano snov in ostanek organske snovi. Postopek poteka brez prisotnosti kisika v bioreaktorjih oz. digestrih. Gre za posnemanje naravnih procesov, ki sicer potekajo v prebavilih živali (posebej pri prežvekovalcih) in ljudi, v močvirjih, ribnikih, riževih poljih, jezerskih sedimentih, termalnih vrelih in oceanih. Procese anaerobne razgradnje uporabljamo za anaerobno čiščenje z organsko snovjo bogatih odpadkov ali trdnih organskih odpadkov in/ali za trajnostno proizvodnjo obnovljive energije iz načrtno vzgojenih energetskih rastlin (Christy in sod., 2014).

Anaerobna metanogena razgradnja je kompleksen proces, ki ga lahko razdelimo na štiri faze: hidrolizo, acidogenezo, acetogenezo in metanogenezo. Različne faze izvajajo različni mikroorganizmi, ki so med seboj povezani in delujejo sinergistično. Prva in druga faza sta med seboj močno povezani, prav tako tretja in četrta, kar omogoča, da lahko proces izvajamo tudi v dveh stopnjah. V prvi fazi eksoencimi fakultativnih in obligatnih anaerobnih bakterij celulozo, beljakovine in maščobe hidrolizirajo do monomerov. Fakultativni anaerobni mikrobi porabijo kisik, raztopljen v vodi, in s tem ustvarijo nizek redoks potencial, ki je potreben za obligatne anaerobne mikrobe. Lignoceluloza in lignin se razgradita počasi in nepopolno, kar je tudi poglobljena ovira pri proizvodnji bioplina iz odpadnih kmetijskih substratov (Deublein in Steinhauser, 2008). Anaerobna razgradnja trdnega lignoceluloznega materiala in dostopnost hidrolitskih mikroorganizmov do trdnih delcev je omejujoč korak. Možna rešitev je predhodno tretiranje, ki ga lahko izvajamo z močnimi kislinami in bazami, encimi, različnimi drugimi kemikalijami, glivami ali hidrolitskimi bakterijami (Čater in sod., 2014).

Monomerne produkte hidrolitične faze kot substrat uporabljajo različne obligatno in fakultativno anaerobne bakterije in jih preoblikujejo v kratkoverižne maščobne kisline (KMK; mravljična, očetna, propanojska, maslena kislina), alkohole, vodik in ogljikov dioksid. Pretvorba organskega materiala v organske kisline zniža pH vrednost v bioreaktorju, kar pri zelo nizkih vrednostih lahko povzroči zaviranje proizvodnje metana in ustavljanje procesa na ravni kratkoverižnih maščobnih kislin. Če tako stanje brez posredovanja v proces traja nekaj dni,



se lahko proces proizvodnje bioplina popolnoma ustavi, restavracija postopka pa lahko traja tudi nekaj mesecev. Zato so KMK zelo pomembna kontrolna točka bioplinskega procesa, ki omogoča dovolj hitro posredovanje in preprečitev ekonomske in okoljske škode (Christy in sod., 2014). Raven KMK ugotavljamo s plinsko kromatografijo po dvojni etrski ekstrakciji (Holdeman in sod., 1977)

Obligatne vodik proizvajajoče acetogene bakterije pretvorijo propanojsko kislino, masleno kislino in alkohole v očetno kislino, vodik in ogljikov dioksid. Homoacetogene bakterije pa pretvorijo vodik in ogljikov dioksid v očetno kislino (Liu in sod., 2011). Acetogene bakterije so v sinotrofičnem odnosu z metanogenimi arhejami, ki porabljajo vodik za tvorbo metana, ker potrebujejo nizek parcialni pritisk vodika za preživetje in rast (Christy in sod., 2014).

V zadnji fazi metanogene arheje proizvedejo metan v striktno anaerobnih pogojih. Metan nastaja na dva načina, in sicer z razcepom očetne kisline v  $\text{CH}_4$  in  $\text{CO}_2$  ali z redukcijo ogljikovega dioksida z vodikom. Običajno z razcepom acetata nastane okoli 70 % metana, z redukcijo  $\text{CO}_2$  pa le okoli 30 %. Če metanogeneza ne poteka pravilno in metan ne nastaja, pride do povečane kislosti, ta zavre tudi acetogenezo. Podobne težave se pojavijo tudi v primerih, ko substrati za bioplinsko proizvodnjo vsebujejo sulfate. V teh primerih se v bioreaktorju namnožijo sulfat reducirajoče bakterije, ki porabljajo  $\text{H}_2$  za tvorbo vodikovega sulfida. Za vodik tekmujejo z metanogenimi arhejami, ki posledično proizvedejo manj metana, poleg tega je vodikov sulfid toksičen za metanogene arheje (Deublein in Steinhäuser, 2008).

Proizvodnja bioplina je kompleksen mikrobiološki proces, kjer je za dober izplen bioplina potrebno strokovno vodenje in zagotavljanje konstantnih pogojev. Uspešna proizvodnja bioplina je odvisna je od mnogih parametrov, ki jih moramo med procesom obvladovati.

Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na proizvodnjo bioplina, so:

- Redoks potencial: med  $-400$  in  $-100$  mV.
- Temperatura: procese glede na temperaturo ločujemo v tri tipe, in sicer psihrofilne (pod  $25$  °C), mezofilne ( $25$ – $45$  °C) in termofilne ( $45$ – $65$  °C). Običajno anaerobna razgradnja poteka v mezofilnih ali termofilnih pogojih.
- Substrat: za anaerobno razgradnjo uporabljamo odpadno organsko biomaso, ki daje različne donose bioplina glede na svojo sestavo, ali pa dražje energetske rastline (koruza, oljne rastline), ki dajejo večji izplen bioplina.
- pH: Optimalni pH za anaerobno metanogeno razgradnjo je med  $6,8$  in  $7,5$ .
- C/N razmerje: Primerno razmerje med ogljikom

in dušikom (C/N) za anaerobno razgradnjo je med  $20$  in  $30$ . Pri odstopanju od tega intervala se zmanjša donos bioplina.

- Inhibitorji: organski odpadki živinorejski farm in rastlin velikokrat vsebujejo toksične snovi, kot so dezinfekcijska sredstva, pesticidi, antibiotiki, prevelike količine amonijaka, sulfata in težkih kovin, ki inhibirajo rast, metabolizem in razmnoževanje mikrobov.
- Mešanje: za prenos substrata do mikroorganizmov, razredčevanje inhibitorjev in zagotavljanje enakomernega pH ter temperature je v bioreaktorju potrebno mešanje z mešali, črpalkami, pihalniki.
- Inokulum: aktivni mikroorganizmi, ki proizvajajo metan, so ključnega pomena za uspešen začetek bioprocasa. Volumen inokuluma mora biti nad  $10$  % delovnega volumna bioreaktorja in ga ponavadi vnesemo iz enega od delujočih bioreaktorjev (Liu in sod., 2011).

Anaerobne mikroorganizme, ki sodelujejo pri proizvodnji bioplina, lahko razdelimo na dve skupini, nemetanogene bakterije in metanogene arheje (Liu in sod., 2011). Med nemetanogene uvrščamo fermentativne bakterije, vodik proizvajajoče acetogene bakterije in homoacetogene bakterije. Prve opravijo fazi hidrolize in acidogeneze, nekateri najbolj znani rodovi iz te skupine pa so *Clostridium*, *Bacteroides* in *Butyrivibrio*, pri čemer je bila posebej med klostridiji odkrita velika pestrost. Tudi nekatere anaerobne glive delujejo podobno kot fermentativne bakterije. Vodik proizvajajoče acetogene bakterije metabolizirajo  $\text{C}_3$  ali višje organske kisline, etanol, nekatere aromatske spojine,  $\text{H}_2$  in  $\text{CO}_2$ , kar ni termodinamsko ugodno in zato predstavlja omejujoč faktor. Nekateri znani rodovi so *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Fusobacterium* in *Pelobacter*. Homoacetogene bakterije so miksotrofi in lahko uporabljajo  $\text{H}_2$  in  $\text{CO}_2$  ali nekatere organske spojine za produkcijo očetne kisline, s čimer povečujejo koncentracijo očetne kisline za nastajanje metana ter tudi ohranjajo nizek parcialni pritisk vodika. Funkcija teh bakterij v anaerobni razgradnji še ni popolnoma znana. Ocenjeno je, da proizvedejo  $1$ – $4$  % očetne kisline v digestorju. Poznane homoacetogene bakterije so *Acetobacterium woodii*, *Acetobacterium wieringae* in *Clostridium thermoautotrophicum* (Liu in sod., 2011; Ziganshina in sod., 2014).

Metanogene arheje, ki pretvarjajo anorganske in organske spojine v metan in ogljikov dioksid, razdelimo v dve skupini: tiste, ki uporabljajo acetat, in tiste, ki uporabljajo vodik in  $\text{CO}_2$ . Najpomembnejše vrste so iz rodov *Methanobacterium*, *Methanospirillum* in *Methanosarcina*. Metanogene arheje živijo v obligatnem sinotrofičnem odnosu z acetogenimi bakterijami. Zaradi termodinam-

skih razlogov lahko acetogene bakterije razgradijo maščobne kisline od C3–C6 le, ko produkte te razgradnje učinkovito odstranjujejo metanogene arheje (Worm in sod., 2014).

### 3 BIOPLINSKE NAPRAVE IN SUBSTRATI ZA PROIZVODNJO BIOPLINA

Bioplinska naprava je bioreaktor, ki omogoča proizvodnjo bioplina, energetske izrabo bioplina in hkrati nadzor onesnaževanja. Na voljo je več različnih tipov bioplinarn in različnih tehnologij, njihova uporaba pa je odvisna od vrste substrata, ekonomske situacije in energetske politike. Bioplinske naprave po velikosti razvrstimo v mikro (do 50 kW), majhne (do 1000 kW), srednje (med 1 in 10 MW) in velike (več od 10 MW) (Borroni in Sakulin, 2010).

Kmetijska bioplinska naprava je namenjena razgradnji gnojevke in ostalih kmetijskih odpadnih organskih snovi za produkcijo bioplina. Kmetijska bioplinska naprava običajno vsebuje sledeče sestavne dele: zbirna jama za gnojevko, eden ali več digestorjev, plinohram, oprema za čiščenje in obdelavo bioplina, eden ali več končnih rezervoarjev za shranjevanje predelane (bioplinske) gnojevke, ena ali več kombiniranih toplotnih enot in oprema, potrebna za dovajanje električne energije v javno omrežje in izkoriščanje nastale toplotne energije (Liu in sod., 2011). V zbirni jami se zbira gnoj, gnojevka in/ali drugi organski odpadki in se homogenizira. Glede na vrsto substrata ima lahko zbirna jama še dodatno tehnično opremo, kot so mešalnik, drobilnik in črpalke. Digestor je lahko narejen iz različnih materialov (armiran beton, jeklo, plastična masa ...) in obrnjen navpično ali vodoravno. Opremljen je z mešalnikom in opremo za zbiranje bioplina ter ogrevan, da je zagotovljena konstantna proizvodnja bioplina. V plinohramu se zbira plin do nadaljnje predelave. Lahko je sestavni del digestorja ali ločena enota. V kogeneracijski enoti se bioplin, ki se mu predhodno z ustreznimi filtri odstranijo vodikov sulfid in voda, sežiga v motorju z notranjim izgorevanjem, pri čemer nastajata toplotna in električna energija (Deublein in Steinhauser, 2008).

Obstaja več različnih postopkov fermentacije organskih snovi do bioplina. Uporabljajo se šaržni in kontinuirni procesi. Pri šaržnem se digestor napolni naenkrat in substrat se počasi razgrajuje brez dodajanja ali odvzemanja do konca procesa. Šaržna fermentacija traja od 40 do 100 dni. Lahko se postavi več zaporednih šaržnih digestorjev, vendar so pri tem stroški višji. V takšnem sistemu potekajo v različnih digestorjih različne faze razgradnje. Pri kontinuirnem procesu se ves čas dodaja svež substrat in odvzema digestat. Prednosti so krajši čas zadrževanja

substrata (od 10 do 30 dni) in konstantna proizvodnja bioplina s konstantno sestavo. Slabosti so višji stroški in večja poraba energije zaradi segrevanja in mešanja (Deublein in Steinhauser, 2008).

Substrati za proizvodnjo bioplina se uvrščajo v biomaso, ki je alternativni vir energije. Vse rastline in živali v nekem ekosistemu pripadajo biomas. Tudi hranila, iztrebki in bioodpadki iz gospodinjstev in industrije so biomasa. Biomasa, ki se lahko uporablja za proizvodnjo bioplina, se glede na vir deli na naslednje kategorije:

- B1 – energetske rastline – olesenele in neolesenele rastline, ki se gojijo posebej za energetske namene,
- B2 – biorazgradljivi deli produktov, ostankov in odpadkov iz kmetijstva; vključuje snovi rastlinskega in živalskega izvora,
- C1, C2 – biorazgradljivi industrijski in komunalni odpadki

V kmetijskih bioplinarnah kot substrate največ uporabljajo živinsko gnojevko in energetske rastline. Vedno več se uporabljajo tudi kmetijski odpadki in stranski proizvodi, organski del komunalnih odpadkov, organski odpadki prehranske industrije in kanalizacijska gošča (Borroni in Sakulin, 2010).

Bioplin lahko direktno pretvorimo v električno moč v gorivni celici, ga sežigamo, pri čemer se sprošča toplota, ali ga sežigamo za soproizvodnjo toplote in električne energije. Možno je tudi napajanje v mrežo zemeljskega plina ali uporaba kot gorivo za motorna vozila. Bioplin, ki pride iz digestorja, ni čist, ampak vsebuje paro, prah in sledi H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>. Te nečistoče je potrebno odstraniti, glede na nadaljnjo uporabo bioplina. Trdne delce prefiltrirajo z zbiralniki prahu, brozga in pena se odstranijo s ciklonskimi separatorji, odstranjevanje plinov v sledih izvedejo v več korakih. Prvi je odstranitev vodikovega sulfida, sledi ločevanje ogljikovega dioksida in drugih neželenih plinskih komponent, na koncu pa še razvlaževanje. Prvi in tretji korak sta prisotna v skoraj vsaki bioplinski napravi. Odstranjevanje ogljikovega dioksida in drugih plinskih komponent je potrebno le, če se bioplin napaja v plinovodno omrežje ali če se uporablja kot pogonsko gorivo za vozila (Deublein in Steinhauser, 2008).

Neposredno izgorevanje bioplina je najpreprostejši način uporabe in je najpogostejši v državah v razvoju. Občasno se uporablja tudi v razvitih državah v gorilnikih za zemeljski plin. Za pridobivanje toplote bioplin ne potrebuje izboljšave, a mora skozi proces kondenzacije, odstranitve delcev, stiskanja, ohlajanja in dehidracije (Holm-Nielsen in sod., 2009). Naprave za soproizvodnjo toplote in električne energije (SPTE naprave) so v slovenskih bioplinarnah zelo pogoste. Pred uporabo v SPTE napravi je potrebno bioplin osušiti. V Evropi se največ uporablja štiritačni motor z notranjim izgoreva-

njem. Novejše tehnologije, kot na primer gorivne celice ali plinske mikroturbine so redko v uporabi (Deublein in Steinhäuser, 2008). Za dovajanje bioplina v omrežje zemeljskega plina (česar v Sloveniji še ne izvajamo) in uporabo kot gorivo za vozila ga je potrebno očistiti do t.i. biometana, ki mora vsebovati vsaj 99 % metana. Obstaja veliko različnih metod čiščenja bioplina, najpomembnejše so absorpcija, adsorpcija, membransko in kriogeno odstranjevanje. Odstranjen  $\text{CO}_2$  se običajno spušča nazaj v atmosfero, v nekaterih primerih pa se lahko uporabi za povečevanje koncentracije  $\text{CO}_2$  za fotosintezo v rastlinjaki in za karbonizacijo v živilski industriji (Starr in sod., 2012).

#### 4 DIGESTAT ALI BIOPLINSKA GNOJEVKA KOT STRANSKI PROIZVOD BIOPLINSKE TEHNOLOGIJE

Presnovljen substrat se lahko uporabi kot gnojilo, in sicer v tekoči ali dehidrirani obliki. Bioplinska gnojevka ima v primerjavi z neobdelano manjše razmerje C/N, manjšo vsebnost suhe snovi, večjo vsebnost  $\text{NH}_4^+$  in manjšo vsebnost KMK, ki sicer sproščajo neprijeten vonj. Zaradi zmanjšane vsebnosti suhe snovi se lahko presnovljen substrat hitreje vsrkava v zemljo, pri čemer se zmanjšajo emisije amonijaka pri gnojenju (Amon in sod., 2006).

#### 5 PRISPEVEK BIOPLINSKIH TEHNOLOGIJ K ZMANJŠEVANJU TOPLOGREDNEGA UČINKA

Bioplin se pogosto uporablja kot zamenjava za fosilna goriva, s tem pa se zmanjšujejo emisije  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$  sicer nastaja med anaerobno razgradnjo in izhaja med izgorevanjem bioplina, a izvira iz rastlin, ki so ga pred kratkim vgradile prek fotosinteze, zato te emisije na daljši rok ne bodo povzročile akumulacije  $\text{CO}_2$  v atmosferi, vse dokler ga bodo nove rastline vgrajevale naprej. Pri izgorevanju fosilnih goriv izhaja  $\text{CO}_2$ , ki se je vgradil pred 50 do 500 milijoni let. Regeneriranje fosilnih goriv traja zelo dolgo, zato izgorevanje fosilnih goriv prispeva k neto akumulaciji  $\text{CO}_2$  v atmosferi. Pri proizvodnji bioplina se porabi veliko manj fosilnih goriv (npr. gorivo za transport), kot se jih nadomesti z uporabo bioplina (Berglund, 2006).

Živinska gnojila vsebujejo velike količine ogljika, ki služi kot vir hranil za mikroorganizme. Pri shranjevanju živinskih gnojil se organska snov v anaerobnih pogojih mikrobnost razgrajuje, pri tem nastajata  $\text{CH}_4$  in  $\text{CO}_2$ , ki se nekontrolirano sproščata v ozračje in povečujeta toplogredni učinek. Tudi določen delež dušika, ki ga izločijo

živali, se po mikrobnih pretvorbah sprosti v ozračje kot  $\text{N}_2\text{O}$  med shranjevanjem živinskih gnojil.  $\text{N}_2\text{O}$  nastaja iz dušikovih spojin v procesu nitrifikacije in denitrifikacije. Med nitrifikacijo se dušik iz sečnine in amonijaka oksidira preko nitrita do nitrata. Če temu sledi anaerobna faza denitrifikacije, iz nitrita nastaja  $\text{N}_2\text{O}$  kot vmesni produkt in uhaja v ozračje. Med anaerobno razgradnjo se ogljik, ki predstavlja energijo, potrebno za denitrifikacijo, vključuje v mikrobnost biomaso ali pa se pretvori v  $\text{CH}_4$  in  $\text{CO}_2$ . Če pa izvajamo anaerobno razgradnjo živinskih gnojil pri kontroliranih pogojih (proizvodnja bioplina), ves nastali  $\text{CH}_4$  lahko zajamemo in pretvorimo v energijo. S tem ne le zmanjšamo emisije  $\text{CH}_4$ , ki ima do 24-krat večji toplogredni učinek kot  $\text{CO}_2$ , ampak tudi zmanjšamo porabo fosilnih goriv, torej gre za dvakratni prispevek k zmanjševanju učinka tople grede (Amon in sod., 2006). Amon in sodelavci (2006) so preučevali emisije  $\text{CH}_4$  in  $\text{N}_2\text{O}$  v atmosfero med shranjevanjem in po uporabi surove gnojevke na polju. Iz neobdelane gnojevke so med shranjevanjem in po uporabi na polju izhajali toplogredni plini (TGP) v obsegu 92,4 ekv.  $\text{kg CO}_2/\text{m}^3$ . Po anaerobni razgradnji so se emisije TGP zmanjšale na 37,9 ekv.  $\text{kg CO}_2/\text{m}^3$ . Kontrolirana anaerobna obdelava gnojevke v bioplinarni je dobra rešitev za zmanjševanje izpustov  $\text{CH}_4$  in  $\text{N}_2\text{O}$  ter tudi zmanjševanje neprijetnih vonjav, saj se amonijak, ki je glavni vir neprijetnih vonjav, v bioplinskem procesu reducira do raztopljenega amonijevega iona, ki ne povzroča smradu.

V Sloveniji prispeva govedoreja kar 82 % izpustov  $\text{CH}_4$ . Od leta 1986 do 2011 so se izpusti  $\text{CH}_4$  v kmetijstvu zmanjšali za 7,2 %, izpusti  $\text{N}_2\text{O}$  pa za 21,3 %. K zmanjšanju je največ prispevala govedoreja, pri kateri so se precej zmanjšali izpusti  $\text{CH}_4$  zaradi fermentacije v prebavilih ter izpusti  $\text{N}_2\text{O}$  pri skladiščenju živinskih gnojil. To je predvsem posledica izboljšane učinkovitosti reje. V prašičereji pa so se izpusti zmanjšali tudi zaradi izboljšane načina ravnanja z živinskimi gnojili. Izpusti  $\text{CH}_4$  na uhlevljeno žival pri skladiščenju prašičjega gnoja so se zmanjšali za 20 % zaradi separacije gnojevke in njene obdelave v anaerobnih digestorjih za pridobivanje bioplina (Verbič in Mekinda Majaron, 2013). V slovenski živinoreji obstaja kar precejšen potencial za dodatno zmanjšanje izpustov toplogrednega  $\text{CH}_4$  z obsežnejšo predelavo živinskih gnojil v kmetijskih bioplinskih napravah. Trenutno ta dejavnost poteka v majhnem obsegu.

#### 6 PREGLED STANJA NA PODROČJU PROIZVODNJE BIOPLINA V SLOVENIJI

V letu 2013 je bila Slovenija v 51,3 % energetsko odvisna od uvoza energije. V strukturi bruto domače porabe so kot vir energije prevladovali naftni proizvodi

**Preglednica 1:** Višina podpor električni energiji proizvedeni iz bioplina v letu 2014 (*Biomethane Regions*, 4. novice, 2013: 4)

**Table 1:** The subsidies for the electricity produced from biogas in year 2014 (*Biomethane regions*, 6. Novice, 2014:6)

Velikostni razred proizvodne naprave	Zagotovljeni odkup (€/MWh <sub>el</sub> )		Obratovalna podpora (€/MWh <sub>el</sub> )	
	B1 in B2 vhodni substrat (energetske rastline)	C1 in C2 vhodni substrat (biološko razgradljivi odpadki)	B1 in B2 vhodni substrat (energetske rastline)	C1 in C2 vhodni substrat (biološko razgradljivi odpadki)
Mikro (do 50 kW)	165,55	139,23	127,44	101,12
Mala (do 1 MW)	161,75	139,23	122,34	99,82
Srednja (do 10 MW)	147,77	129,15	107,92	89,30

s 35 % deležem, obnovljivi viri energije (OVE) brez hidro energije pa so predstavljali le 9,2 %. Ostali del je bil razdeljen med zemeljski plin, jedrsko in hidro energijo, trdna goriva in neobnovljive industrijske odpadke. Poraba bioplina je bila 5,4 % v strukturi porabe obnovljivih virov energije (brez hidro energije) (Energetska bilanca Republike Slovenije za leto 2013). Direktiva 2009/28/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 23. aprila 2009 o spodbujanju uporabe energije iz obnovljivih virov, spremembi in poznejši razveljavitvi direktiv 2001/77/ES in 2003/30/ES za Slovenijo določa, da mora do konca leta 2020 doseči najmanj 25 % delež OVE v rabi bruto končne energije in 10 % delež OVE v prometu, kar je tudi zapisano v Nacionalnem akcijskem načrtu za obnovljive vire energije. K povečani porabi OVE lahko prispeva tudi kmetijski sektor z bioplinom (Akcijski načrt za obnovljive vire energije 2010–2020). V Akcijskem načrtu za energetska učinkovitost je zapisano, da bo Slovenija do leta 2020 za 20 % zmanjšala skupne emisije toplogrednih plinov glede na leto 1990.

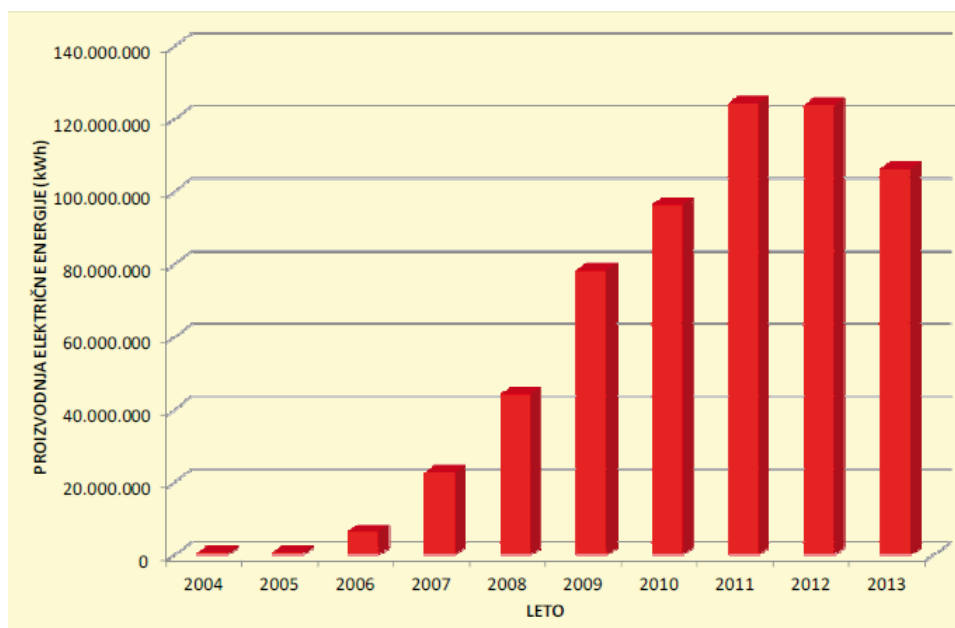
Pred letom 2002 je bilo pridobivanje bioplina z anaerobno razgradnjo omejeno na bioplin iz čistilnih naprav in zajetje deponijskega plina na deponijah komunalnih odpadkov. Pridobivanje plina iz odpadkov in ostankov kmetijstva je bilo pred tem letom omejeno na eno samo napravo, in sicer na prašičjo farmo Ihan (Kranjc in sod., 2010). Razvoj bioplinarn se je v Sloveniji začel po letu 2002, ko je vlada Republike Slovenije zagotovila ustrezne odkupne cene in premije za kvalificirane proizvajalce električne energije in se je povečal interes za izgradnjo bioplinarn na kmetijske odpadke na velikih živinorejskih farmah (Poje, 2011). Priložnost za gradnjo bioplinarn so izkoristile predvsem večje kmetije in investitorji, ki so načrtovali bioplinarne naprave nad 1 MW<sub>el</sub>. Velike bioplinarne naprave so začele bioplin proizvajati pretežno iz načrtno gojenih, pogosto uvoženih energetskih rastlin. V letu 2008 se je stanje na trgu EU spremenilo in prišlo je do velikega zvišanja cen kmetijskih rastlin, na primer koruze, kar je porušilo njihovo ekonomsko vzdržnost (Grmek, 2009). V letu 2009 je stopila v veljavo nova shema podpor proizvodnji zelene

elektrike. Podpore sestavljata zagotovljeni odkup električne energije in finančna pomoč za poslovanje (obratovalna podpora). Na podlagi zagotovljenega odkupa center za podpore, ne glede na ceno električne energije na trgu, odkupi vso prevzeto neto proizvedeno električno energijo po zagotovljenih cenah energije, določenih z uredbo. Obratovalna podpora se dodeli neto proizvedeni električni energiji, ki ima potrdilo o izvoru in jo proizvajalci električne energije prodajajo na trgu (Kranjc in sod., 2010; *Biomethane Regions*, 4. novice, 2013).

Ker je bilo v Sloveniji leta 2010 večino bioplina proizvedenega iz koruze in koruzne silaže, je leta 2011 prišlo do spremembe v Uredbi, po kateri so višine podpore odvisne tudi od vrste vhodnih substratov (pregl. 1). Če gnoj in gnojevka letno predstavljata prostorninsko več kot 30 % substrata, je bioplinarna naprava upravičena do dodatka v višini 10 % obratovalne podpore, če pa predstavljata več kot 70 % substrata, je naprava upravičena do dodatka v višini 20 % obratovalne podpore. S tem se spodbuja uporaba gnoja in gnojevke namesto energetskih rastlin za proizvodnjo bioplina, kar podpira trajnostni razvoj in realno omejuje emisije TPG. Za naprave, nastale po 1. 7. 2012, dodatno velja, da če uporabljajo več kot 40 % prostorninskih odstotkov načrtno proizvedenih energetskih rastlin, niso upravičene do podpore (Določanje višine podpor električni energiji proizvedeni iz OVE in SPTE in višine podpor v letu 2014, 2014).

V Sloveniji je bilo leta 2013 24 delujočih bioplinarn naprav z deklaracijami in skupno nazivno močjo 33,6 MW<sub>el</sub>, njihova povprečna velikost pa je bila 1 MW<sub>el</sub>, proizvedle so več kot 10<sup>7</sup> kWh električne energije (slika 1). Največja bioplinarna je v Lendavi (Ecos d.o.o.) Njena nazivna moč je 7 MW<sub>el</sub> in kot substrat uporablja le koruzno in drugo silažo (*Biomethane Regions*, 6. novice, 2014).

Bioplinarne naprave v Sloveniji kot substrat v največjem deležu uporabljajo energetske rastline, ki dajo dober izkoristek metana. Gnojevka se uporablja v manjši meri. Bioplinarne, ki so pridobile obratovalno dovoljenje pred letom 2011, imajo sklenjene pogodbe, ki jim 15 let zagotavljajo subvencionirano odkupno ceno elektrike ne



**Slika 1:** Proizvodnja električne energije iz bioplina v Sloveniji od leta 2004 do leta 2013 (Biomethane Regions, 6. novice, 2014: 3)

**Figure 1:** Production of electric power from biogas between years 2004 and 2013 in Slovenia (Biomethane Regions, 6. Novice, 2014: 3)

glede na vrsto uporabljenih substratov. Višina podpore bioplinarnam vpliva na pridelovalce tako, da uporabljajo kosubstrate (predvsem koruzno silažo) in odpadke, pridelane izven kmetij, ki jih dodajajo gnojevki. Med odpadki, ki jih uporabljajo kmetijske bioplinarne, prevladujejo odpadki iz živilske industrije in komunalnih dejavnosti. Za doseganje večjih donosov bioplina slovenske bioplinarne največ uporabljamo koruzno silažo. V prihodnosti bi bila za bioplinarne lahko zanimiva tudi raba bioremediacijskih rastlin s površin, ki so kontaminirane s težkimi kovinami, vendar bioplinarska gnojevka potem ne bi bila uporabna kot gnojilo. Tla bi se tako postopoma očistila (Country Specific Conditions and barriers to Implementation for Anaerobic Digestion). Prav tako bi lahko koruzno silažo nadomestili in povečali izplen bioplina v kmetijskih bioplinarskih napravah z načrtnim gojenjem sekundarnih posevkov na obstoječih kmetijskih površinah in s pridelavo ustrezne biomase na opuščeni in manj kakovostnih kmetijskih površinah (Pšaker, 2011). Živalska gnojila, predvsem gnojevka in gnojnica, imata za pridelavo bioplina nekoliko neugodno razmerje C/N, z dodajanjem rastlinske biomase pa je možno razmerje ustrezno povečati. V Sloveniji se je leta 2011 Kmetijski inštitut Slovenije vključil v EU projekt »Biomethane Regions«, ki spodbuja razvoj proizvodnje metana iz živalskih in rastlinskih odpadkov in uporabo v javnem omrežju zemeljskega plina ter za pogon vozil (Biomethane Regions, 1. novice, 2011).

Bioplinarske naprave, ki so odmaknjene od večjih naselij in mest in ne morejo izkoristiti vse presežne to-

plotne energije, so primerne za dovajanje metana v javno plinovodno omrežje. Bioplin lahko očistijo do čistega metana (biometan) direktno na bioplinarskih napravah in ga vbrizgajo v javno omrežje ter s tem transportirajo do potencialnih uporabnikov na velike razdalje. Takšno rešitev bi v Sloveniji lahko uporabili na kmetijah, ki imajo nad 150 GVŽ. To bo izvedljivo, ko bo obstajala pravna in tehnična zakonodaja za vbrizgavanje biometana v obstoječe plinsko omrežje (Biomethane Regions, 4. tehnične novice, 2013), zaenkrat pa te možnosti še ni.

V zadnjih letih se je v Evropski uniji povečal interes za mikro bioplinarske naprave, ki tudi za Slovenijo predstavljajo najprimernejši način proizvodnje bioplina. To so naprave z močjo, manjšo od 50 kW. Njihove prednosti so, da so zasnovane kot manjši objekti, zato na kmetiji ni potrebno žrtvovati veliko prostora. Lahko jih načrtujemo tako, da se tudi arhitekturno ujamejo s krajino, kar je zelo pomembno na turističnih kmetijah. Veliko prednost imajo tudi v primeru naravnih nesreč, ko pride do energetskih izpadov, saj so manj ranljive od velikih sistemov in zagotavljajo lastno energetsko oskrbo. Lahko se jih postavi v kontejnerski izvedbi in ni potrebno opravljati večjih gradbenih del. Koncept mikro bioplinarske naprave je v Sloveniji predstavilo podjetje Omega Air (Omega Air) iz Ljubljane (Biomethane Regions, 3. tehnične novice, 2012). Podjetje Omega Air se je v zadnjih dveh letih uveljavilo kot edini ponudnik kmetijskih mikrobioplinarskih naprav, ki ponuja kompletno načrtovanje in postavitev bioplinarske naprave. Podjetje zaposluje ustrezno uspo-

sobljen multidisciplinarni tim, česar do sedaj v Sloveniji nismo imeli, in smo bili vezani na tuje ponudnike.

V Sloveniji imamo tudi velik potencial za izrabo gospodinjskih organskih odpadkov, ki jih lahko dodajamo v kmetijske bioplinarne za povečanje razmerja C/N in s tem povečamo proizvodnjo bioplina. Poleg tega kot ko-substrate lahko uporabljamo tudi odpadke iz proizvodnje mleka, iz klavnic, iz prehranske industrije, industrije pi-jač ... Za uspešno anaerobno razgradnjo sta pomembni sestava in kakovost substrata, zato je potrebno gospodinske organske odpadke predhodno obdelati (mletje) in sanitirati, kar povzroči nekaj dodatnih stroškov in dodatne porabe energije (Cesaro in Belgiorno, 2014).

## 7 ZAKLJUČKI

V Sloveniji imamo le pet kmetijskih bioplinarn, ki anaerobno presnavljajo gnojevko in/ali gnoj rejnih živali ter druge organske odpadke iz agroživilskega sektorja ter na ta način le v majhnem deležu prispevajo k zmanjšanju emisij toplogrednih plinov iz kmetijstva. Dostopnost investicijskih kreditov, državne podpore zeleni energiji, ugodne odkupne cene bioplinske elektrike in zakonodaja pred letom 2011 so vzpodbudile za slovenski prostor neustrezno rast velikih bioplinarn (nad 1 MW<sub>e</sub>) po letu 2002. Tako večina slovenskih bioplinarn trenutno proizvaja bioplin iz koruze in koruzne silaže. V stremljenju po dobičku so predvsem v SV Sloveniji nekateri živinorejci opustili rejo več sto glav goveda in začeli koruzo pridelovati izključno za proizvodnjo bioplina. Ker so bile investicije v bioplinarne načrtovane v prevelikem obsegu, je večina pomurskih bioplinarn danes v finančnih težavah in ne obratuje s polno zmogljivostjo. Preusmeritev velikih slovenskih bioplinarn na odpadne agro-živilske substrate je težavna, ker bi bile potrebne dodatne investicije v prilagoditev tehnologij in pridobitev okoljevarstvenih dovoljenj (OVD). Pridobivanje OVD (po Zakonu o varstvu okolja; Ur. list RS, št 39/2006) za velike bioplinarne je v Sloveniji trenutno zelo zapleten postopek, saj OVD nasprotujejo civilne iniciative, podobno kot izbiram lokacij za deponije odpadkov in sežigalnicam. Za kmetijski sektor (in slovenski prostor nasploh) so primerne manjše mikrobioplinarne, ki živinska gnojila in odpadno kmetijsko biomaso predelajo na mestu nastanka, ne obremenjujejo okolja s transportom substratov in digestat (bioplinsko gnojevko) uporabijo za gnojenje kmetijskih površin.

## 8 VIRI

- Bannink A., Valk H., Van Vuuren A.M. 1999. Intake and Excretion of Sodium, Potassium and Nitrogen and the Effects on Urine Production by Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 1008–1018. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75321-X
- Akcijski načrt za obnovljive vire energije za obdobje 2010–2020. 2010. Ljubljana: 134 str. [http://www.mgrt.gov.si/fileadmin/mgrt.gov.si/pageuploads/Energetika/Porocila/AN\\_OVE\\_2010-2020\\_final.pdf](http://www.mgrt.gov.si/fileadmin/mgrt.gov.si/pageuploads/Energetika/Porocila/AN_OVE_2010-2020_final.pdf) (15. maj 2014)
- Al-Mansour F. 2008. Regionalna strategija in akcijski plan za razvoj proizvodnje bioplina v Sloveniji. Ljubljana, Inštitut Jožef Štefan. [http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/MEH/Biogas/STRATEGIJA\\_RAZVOJA\\_BIOPLINSKIH\\_NAPRAV.pdf](http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/MEH/Biogas/STRATEGIJA_RAZVOJA_BIOPLINSKIH_NAPRAV.pdf) (15. maj 2014)
- Amon B., Kryvoruchko V., Amon T., Zechmeister-Boltenstern S. 2006. Methane, nitrous oxide and ammonia emissions during storage and after application of dairy cattle slurry and influence of slurry treatment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112: 153–162. doi:10.1016/j.agee.2005.08.030
- Berglund M. 2006. Biogas Production from a Systems Analytical Perspective. Lund, Lund University, Faculty of Engineering: 59 str.
- Biomethane Regions, 1. novice. 2013. Jejčič V. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 7 str. [http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/D6.1.2\\_NOVICE\\_1\\_BIOMETHANE\\_REGIONS\\_JUNIJ\\_2011.pdf](http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/D6.1.2_NOVICE_1_BIOMETHANE_REGIONS_JUNIJ_2011.pdf) (15. maj 2014)
- Biomethane Regions, 3. novice. 2012. Poje T. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 8 str. [http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/NOVICE\\_3\\_BIOMETHANE\\_REGIONS\\_SEPTEMBER\\_2012.pdf](http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/NOVICE_3_BIOMETHANE_REGIONS_SEPTEMBER_2012.pdf) (15. maj 2014)
- Biomethane Regions, 3. tehnične novice. 2013. Jejčič V. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 17 str. [http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/TEHNICNE\\_NOVICE\\_3\\_BIOMETHANE\\_REGIONS\\_OKTOBER\\_2012.pdf](http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/TEHNICNE_NOVICE_3_BIOMETHANE_REGIONS_OKTOBER_2012.pdf) (15. maj 2014)
- Biomethane Regions, 4. novice. 2013. Jejčič V. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 8 str. [http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/NOVICE\\_4\\_BIOMETHANE\\_REGIONS\\_MAREC\\_2013.pdf](http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/NOVICE_4_BIOMETHANE_REGIONS_MAREC_2013.pdf) (15. maj 2014)
- Biomethane Regions, 4. tehnične novice. 2013. Jejčič V. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 10 str. [http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/TEHNICNE\\_NOVICE\\_4\\_BIOMETHANE\\_REGIONS\\_JULIJ\\_2013.pdf](http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/TEHNICNE_NOVICE_4_BIOMETHANE_REGIONS_JULIJ_2013.pdf) (15. maj 2014)
- Biomethane Regions, 6. novice. 2014. Jejčič V. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 7 str. [http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/NOVICE\\_6\\_BIOMETHANE\\_REGIONS\\_MAREC\\_2014.pdf](http://www.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/e-novice/NOVICE_6_BIOMETHANE_REGIONS_MAREC_2014.pdf) (21. avgust 2014)
- Borroni V., Sakulin C. 2010. Country specific conditions for the implementation of biogas technology, Comparison of Remuneration. *Biogas Regions*: 12 str. [http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/MEH/Biogas/PRIMERJAVA\\_](http://www.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/MEH/Biogas/PRIMERJAVA_)

- PLACILA\_ZA\_PROIZVEDENO\_ELEKTRIKO.pdf (15. maj 2014)
- Cesaro A., Belgiorno V. 2014. Pretreatment methods to improve anaerobic biodegradability of organic municipal solid waste fractions. *Chemical Engineering Journal*, 240: 24–37. doi:10.1016/j.cej.2013.11.055
- Christy P. M., Gopinath L. R., Divya D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34: 167–173. doi:10.1016/j.rser.2014.03.010
- Country Specific Conditions and Barriers to Implementation for Anaerobic Digestion Plants in Slovenia. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 19 str. [http://www.kis.si/datoteka/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/D2.1.1\\_COUNTRY\\_SPECIFIC\\_CONDITIONS\\_AND\\_BARRIERS\\_REPORT\\_AIS\\_SLOVENIA.pdf](http://www.kis.si/datoteka/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/D2.1.1_COUNTRY_SPECIFIC_CONDITIONS_AND_BARRIERS_REPORT_AIS_SLOVENIA.pdf) (15. maj 2014)
- Čater M., Zrec M., Marinšek Logar R. 2014 Methods for improving anaerobic lignocellulosic substrates degradation for enhanced biogas production. *Springer science reviews*, 2: 59–61
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. *Biogas from Waste and Renewable Resources*. Weinham, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 443 str.
- Določanje višine podpor električni energiji proizvedeni iz OVE in višine podpor v letu 2014. 2013. Ljubljana, Borzen, organizator trga z električno energijo, d.o.o.: 12 str. [http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore\\_slo.pdf](http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf) (20. dec. 2014)
- Energetska bilanca Republike Slovenije za leto 2013. 2013. Ljubljana, Vlada Republike Slovenije: 82 str. <http://www.energetika-portal.si/dokumenti/statisticne-publikacije/letna-energetska-bilanca/> (20. dec. 2014)
- Grmek T. 2009. Potencial bioplina v Sloveniji, Zbirno poročilo. Ljubljana, Agencija za prestrukturiranje energetike d.o.o.: 14 str. [http://www.big-east.eu/downloads/fr-reports/ANNEX%203-6\\_WP2\\_D2.2\\_Summary%20Report%20Slovenia-Slovenian.pdf](http://www.big-east.eu/downloads/fr-reports/ANNEX%203-6_WP2_D2.2_Summary%20Report%20Slovenia-Slovenian.pdf) (18. okt. 2014)
- Holdeman, L.V., Cato, E.P., Moore, W.E.C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th Edition, VPI, Blacksburg, Virginia
- Holm-Nielsen J.B., Al-Seadi T., Oleskowicz-Popiel P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Biore-source Technology*, 100, 22: 5478–5484. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.046
- Kranjc N., Mihelič M., Premrl T. 2010. Poročilo o proizvodnji bioplina v Sloveniji. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije: 15 str.
- Liu X., Yan Z., Yue Z.B. 2011. *Biogas*. V: *Comprehensive Biotechnology*. Moo-Young M. (ur.). Oxford, Elsevier: 99–144
- Omega Air. <http://www.omega-air.si/index.php?PageID=708> (15. maj 2014)
- Poje T. 2011. [KM24] Proizvodnja obnovljive energije iz kmetijskih virov. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za okolje. [http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=467](http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=467) (15. maj 2014)
- Pšaker P. 2011. Potencial kmetijstva za proizvodnjo bioplina v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 127 str.
- Starr K., Gabarrell X., Villalba G., Talens L., Lombardi L. 2012. Life cycle assessment of biogas upgrading technologies. *Waste Management*, 32: 991–999. doi:10.1016/j.wasman.2011.12.016
- Verbič J., Mekinda Majaron T. 2013. [KM14] Izpusti metana in didušikovega oksida. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za okolje. [http://kazalci.arso.gov.si/print?ind\\_id=558&lang\\_id=302](http://kazalci.arso.gov.si/print?ind_id=558&lang_id=302) (21. avgust 2014)
- Worm P., Koehorst J.J., Visser M., Sedano-Nú-éz V.T., Schaap P.J., Plugge C.M., Sousa D.Z., Stams A.J.M. 2014. A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities. *BBA Bioenergetics*
- Ziganshina E.E., Bagmanova A.R., Khilyas I.V., Ziganshin A.M. 2014. Assessment of a biogas-generating microbial community in a pilot-scale anaerobic reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 6: 730–736. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.11.013
- Zakon o varstvu okolja (ZVO-1-UPB1). Ur.l. RS št 39-1682/2006: 4151. <https://www.uradni-list.si/1/content?id=72890#!/> Zakon-o-varstvu-okolja-(uradno-precisceno-besedilo)-(ZVO-1-UPB1) (15. dec. 2014)





# VPLIV KRMLJENJA ČEBELJIH DRUŽIN NA NJIHOVO ŽIVALNOST IN PRISTNOST MEDU

Andreja KANDOLF BOROVSŠAK<sup>1</sup>, Nives OGRINC<sup>2</sup>, Nataša LILEK<sup>1</sup>, Boštjan NOČ<sup>1</sup>, Janko BOŽIČ<sup>3</sup>, Mojca KOROŠEC<sup>3</sup>

Delo je prispelo 11. maja 2015, sprejeto 30. junija 2015.  
Received May 11, 2015; accepted June 30, 2015.

## *Vpliv krmljenja čebeljih družin na njihovo živalnost in pristnost medu*

Čebelja družina potrebuje za svoj razvoj ustrezno prehrano. Pomanjkanje medu v brezpašnem obdobju lahko nadomestimo s krmljenjem družin s sladkornimi pogačami ali sladkorno raztopino. Krmljenje družin v brezpašnem obdobju spodbuja vzrejo zalege in pašno aktivnost družin, bolj živahna družina pa proizvede tudi več medu. Če je dodana prevelika količina krme, pa to lahko vpliva na pristnost medu, posebej ob tehniki prevešanja satja z venci krme iz plodišča v medišče. Preverjanje pristnosti medu je zelo kompleksno, na voljo ni ene same metode, na podlagi katere bi lahko zanesljivo potrdili potvorjenost medu. Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali spomladansko krmljenje družin vpliva na njihovo živalnost in zalogo medu v plodišču ter na pristnost medu, prav tako pa tudi, ali obstaja kaka preprosta metoda za ugotavljanje pristnosti medu. Družine smo krmili s pogačami, katerim smo kot označevalnik (marker) za ugotavljanje potvorjenosti medu dodali kvasovke in modro barvilo za živila. Spremljali smo živalnost družin in količino medu v plodišču. Rezultate vsebnosti stabilnih izotopov ogljika v medu in aktivnosti tujih encimov v njem smo primerjali z rezultati vsebnosti kvasovk in barve medu (absorbanca medu, določanje vrednosti L\*, a\*, b\* s kromometrom Minolta). Pojav kvasovk v medu in obarvan med sta očitno dober pokazatelj potvorjenosti medu, kar pa mora biti še dodatno raziskano.

**Ključne besede:** čebelarstvo / čebelje družine / krmljenje / živalnost / med / pristnost / barva / kvasovke

## *Influence of feeding bee colonies on colony strength and honey authenticity*

For the natural development of bee colonies, there is the need for appropriate nutrition. Lack of natural honey flow must be supplemented by feeding bee colonies with sugar syrups or candy paste. This supplementary feeding encourages brood breeding and forage activity, whereby stronger colonies collect more honey. Sugar syrups can cause honey adulteration, which is more frequent with the reversing of the brood combs with the bee food, with the combs moved from the brood chamber to the upper chamber. Authentication of honey from the standpoint of the presence of sugar syrup is very complex, because there is no single method by which honey adulteration can be reliably confirmed. Feeding the colonies in spring should result in stronger colonies and hence the collection of more honey in the brood chambers. The objective of the present study was to determine whether this has effects also on honey authenticity, and to discover a simple method for detection of honey adulteration. The colonies were fed with candy paste that had added yeast and blue dye, to provide markers for detection of honey adulteration. The strength of the colonies and quantity of honey in the brood chambers were monitored. The results of the analysis of stable isotope and activity of foreign enzymes were compared with the results of yeast quantity and colour of the honey (absorbance, L\*, a\*, b\* parameters). Detection of yeast in the honey samples and presence of colour as a consequence of added dye appear to be appropriate methods to follow honey adulteration, and further studies are ongoing.

**Key words:** apiculture / bee colonies / feeding / colony strength / honey authenticity / colour of honey / yeast

<sup>1</sup> Čebelarstva zveza Slovenije, Brdo pri Lukovici 8, SI-1225 Lukovica, Slovenija, e-naslov: andreja.kandolf@czs.si

<sup>2</sup> Institut Jožef Stefan, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Jamnikarjeva ulica 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

## 1 UVOD

Čebelja družina potrebuje za svoj razvoj ustrezno prehrano. Ker se okolje, v katerem čebelarimo, stalno spreminja, v kmetijstvu pa prevladujejo monokulture, obstaja verjetnost, da čebele v naravi ne morejo v celoti zadovoljiti svojih potreb po hrani (Naug, 2009).

Čebele živijo v družini, zato je treba vplive prehrane spremljati na ravni družine, tj. na ravni zalege in odraslih čebel, saj so vsi njeni člani odvisni eden od drugega. Odrasle čebele imajo velike potrebe po ogljikovih hidratih in brez zalog hrane ne preživijo dolgo, saj v svojem telesu nimajo velikih zalog ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob (Hrassnigg in Crailsheim, 2005). Ogljikove hidrate potrebujejo tudi ličinke. Dejavnosti odraslih čebel, kot so nabiranje medicinske/mane in cvetnega prahu ter vzreja ličink, se prilagajajo potrebam ter donosu ogljikovih hidratov in beljakovin (Schmickl in Crailsheim, 2004).

Spomladi ali kadar koli v brezpašnem obdobju je treba čebele krmiti, da preživijo, oz. da ostanejo živalne ali postanejo bolj živalne in produktivnejše (Standifer, 1980). Krmljenje čebel v brezpašnem obdobju spodbuja vzrejo zalege in pašno aktivnost (Crane, 1950), bolj živalna družina proizvede več medu (Farrar, 1937).

Pri dodajanju čebelje krme pa je vendarle treba paziti, da je družinam dodamo toliko, da ta ne bo vplivala na kakovost čebeljih pridelkov. Čebelja krma namreč nikakor ne sme vplivati na pristnost medu. Med seveda ne sme vsebovati predelane sladkorne raztopine.

Ena izmed zelo uporabnih metod za ugotavljanje pristnosti medu je analiza razmerja stabilnih izotopov ogljika  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (White in Winters, 1989), imenovana SCIRA (ang. Stable Carbon Isotope Ratio Analysis). Metoda temelji na dejstvu, da imajo rastline, ki fotosintetizirajo po različnem ciklu, različno razmerje stabilnih izotopov ogljika (Anklam, 1998; Padovan in sod., 2003). Metoda je uporabnejša za dokazovanje vsebnosti sladkorjev rastlin C4 (trs) kot rastlin C3 (pesa) v medu (Elflein, Raetzke, 2008). Pri dokazovanju ponaredekov s sladkorji rastlin C3 namreč ni učinkovita, ker je vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  podobna tako v sladkornih sirupih kot v medu in dosega od  $-25$  do  $-26$  ‰ (Cordella in sod., 2005). Razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo  $\delta$ , ki ponazarja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca glede na izbrani standard. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga vsebuje manj (Craig, 1957). Kot dopolnilna metoda se je uveljavila metoda interne standarda, ki temelji na primerjavi razmerja izotopov ogljika v proteinih in v sladkorju v medu, razmerji pa se ne smeta razlikovati, če med izvira iz istega vira. Velja pravilo, da med ni pristen, kadar je razlika med  $\delta^{13}\text{C}$

medu in  $\delta^{13}\text{C}$  proteinov v medu večja od 1 ‰. Metoda se imenuje ISCIRA (ang. Internal Standard Isotope Carbon Ratio Analysis, White in Winters, 1989). Kot dopolnitev te metode izvajajo tudi metode, ki ugotavljajo razmerje stabilnih izotopov ogljika v sladkornih frakcijah medu (Elflein, 2008) in vsebnost tujih encimov v medu (Valkov in sod., 2010).

Preverjanje pristnosti medu glede na vsebnost sladkornih sirupov je zelo kompleksno, saj potvorjenosti vzorca ni mogoče zanesljivo potrditi z eno samo metodo. Za določanje pristnosti medu je zato treba analizirati več parametrov, zbrane vrednosti analiziranega vzorca pa primerjati z vrednostmi vzorcev iz podatkovne baze o sestavi pristnega medu, značilnih za določeno vrsto medu, in pri tem uporabiti multivariatne statistične metode (Korošec, 2012).

Ker je težko oceniti, kolikšna je zadostna količina hrane, ki jo čebele nujno potrebujejo za svoje življenje in ki hkrati ne ogroža pristnosti medu, smo v raziskavi skušali ugotoviti, ali obstajajo preprostejše metode za določanje nepristnega medu. Tako smo v krmo za družine dodali barvilo in kvasovke ter ugotavljali pojav kvasovk v iztočenem medu in njegovo obarvanost.

Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali spomladansko krmljenje čebeljih družin vpliva na njihovo živalnost in zalogo medu v plodišču ter ob tehniki prevešanja satja iz plodišča v medišče na pristnost medu, prav tako pa tudi, ali obstaja kaka preprosta metoda za ugotavljanje pristnosti medu.

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

Raziskavo smo leta 2013 in 2014 opravljali v 30 družinah, naseljenih v AŽ-panjih v čebelnjaku v bližini golf igrišča na Bledu.

Družine smo pregledovali vsak teden, da smo se prepričali, ali se razvijajo v skladu s sezono. Za preprečevanje rojenja smo sate z zalego in venci hrane iz plodišča prevešali v medišče. V povprečju smo prevešali dvakrat, prvič v obdobju od 5. 5. do 21. 5. in drugič v obdobju od 4. 6. do 11. 6. Družinam smo po potrebi dodajali satnice. Jeseni smo družine nakrmili s 15 kg sladkorja, ki smo ga v razmerju 1 : 1 raztopili v vodi. Jeseni leta 2013 smo družine za zimsko krmljenje nakrmili s trsnim sladkorjem. Glede na naravo poskusa smo družine razdelili na pet skupin (pregl. 1), v vsaki skupini je bilo šest družin.

### 2.1 PRIPRAVA POGAČE

Spomladi leta 2013 smo družine krmili s komercialnimi pogačami Stimulans. Leta 2014 smo pogače pripra-

**Preglednica 1:** Načrt izvajanja poskusa**Table 1:** Plan of the experimental layout for each year

Oznaka skupine	Leto	Število družin (n)	Krmljenje	Količina dodane krme spomladi
31	2013	6	brez krmljenja	0
41	2014	6		0
32	2013	6	ostanek zimske krme v medišču (pribl. 3 kg)	0
42	2014	6		0
331	2013	6	spomladansko krmljenje (komercialna pogača <sup>a</sup> )	0,15 kg
431	2014	6	spomladansko krmljenje (pogača, ki smo jo pripravili sami <sup>b</sup> )	0,15 kg
332	2013	6	spomladansko krmljenje (komercialna pogača <sup>a</sup> )	0,33 kg
432	2014	6	spomladansko krmljenje (pogača, ki smo jo pripravili sami <sup>b</sup> )	0,33 kg
333	2013	6	spomladansko krmljenje (komercialna pogača <sup>a</sup> )	0,50 kg
433	2014	6	spomladansko krmljenje (pogača, ki smo jo pripravili sami <sup>b</sup> )	0,50 kg

<sup>a</sup> Komercialna pogača Stimulans: krmljenje je potekalo od 18. 4. do 15. 5. 2013.

<sup>b</sup> Pogača, ki smo jo pripravili sami: krmljenje je potekalo od 2. 4. do 7. 6. 2014

vljali sami: 14 kg pesnega sladkorja smo dodali 6 l vode, nato pa smo raztopini ob stalnem mešanju dodali še 750 g kvasa in pet kapljic modrega barvila za živila Blue (flow paste) proizvajalca Kopykake iz ZDA, s čimer smo želeli slediti prehodu krme v družini. Vlogo označevalnika (markerja) za ugotavljanje pristnosti medu je imel tudi dodan kvas.

## 2.2 SPREMLJANJE DRUŽIN

V družinah smo od začetka oz. sredine aprila do konca julija spremljali živalnost in količino medu v plodišču.

Živalnost smo določali na podlagi ocenjevanja glede na povprečje družin, vključenih v poskus, in sicer z ocenami od 1 do 4 (ocena 1 in 2: pod povprečjem, ocena 3 in 4: nad povprečjem). Zalogo medu v plodišču smo ocenjevali z ocenami od 1 do 5 (ocena 1: skoraj brez hrane, ocena 2: majhna količina hrane, ocena 3: zadovoljivo velika količina hrane, ocena 4: velika količina hrane, ocena 5: izjemno velika količina hrane v plodišču). Ocenjeval je vedno isti ocenjevalec.

## 2.3 VZORČENJE MEDU

Leta 2013 smo med vzorčili 11. junija, leta 2014 pa 7. julija. Med iz vsakega panja smo vzorčili posebej. V skupini, kjer čebel nismo krmili, smo tako leta 2013 kot tudi 2014 vzorčili samo 4 vzorce, v dveh družinah medu ni bilo. Satje iz vsakega panja smo stehali tako pred točenjem kot tudi po njem ter na ta način ugotovili donos

medu na panj. Analize vsakega posameznega parametra smo izvedli v roku treh dni.

## 2.4 ANALIZE MEDU

### 2.4.1 RAZMERJE STABILNIH IZOTOPOV

Razmerja vsebnosti stabilnih izotopov ogljika <sup>13</sup>C in <sup>12</sup>C v medu ter razmerja vsebnosti stabilnih izotopov ogljika <sup>13</sup>C in <sup>12</sup>C v proteinih medu smo določili po metodi masne spektrometrije za določanje izotopskega razmerja lahkih elementov IRMS (ang. Isotope Ratio Mass Spectrometry – IRMS; AOAC 998.12, 1999, ter Padovan in sod., 2003).

### 2.4.2 TUJI ENCIMI V MEDU

Analizo aktivnosti encimov β-fruktofuranozidaze (BFF) in β/γ-amilaze so izvedli v laboratoriju Intertek Food Service GmbH (Nemčija). Laboratorij je znan po tem, da tako kvalitativno kot tudi kvantitativno ovrednoti vsebnost teh encimov.

### 2.4.3 DOLOČANJE KVASOVK V MEDU

10 g medu smo raztopili v 10 ml destilirane vode. Raztopino smo potem 10 minut centrifugirali pri 10000 g. Supernatant smo odlili, sediment pa razredčili z 1 ml destilirane vode. S to raztopino smo napolnili hemoci-

tometer Thoma (0,1 mm; 0,0025 mm<sup>2</sup>). V vseh 16 kvadratih smo prešteli kvasovke in jih izračunali po formuli:

$$\mathring{S}C[\text{proml}] = \frac{\text{vsota vseh celic v 16 velikih kvadratih}}{16} * TRF$$

$$\mathring{S}C[\text{progedu}] = \frac{\mathring{S}C(ML)}{10G} * R$$

$\mathring{S}C$  – število celic

TRF – razredčitveni faktor hemocitometra Thoma (250000)

R – razredčitveni faktor vzorca (1 ml, ker smo sediment raztopili v 1 ml)

#### 2.4.4 MERJENJE OBARVANOSTI MEDU S KROMOMETROM MINOLTA

Prozorne plastične petrijevke smo napolnili z medom in jih previdno pokrili s pokrovom, da smo se izognili nastanku zračnih mehurčkov. Na vsako petrijevko

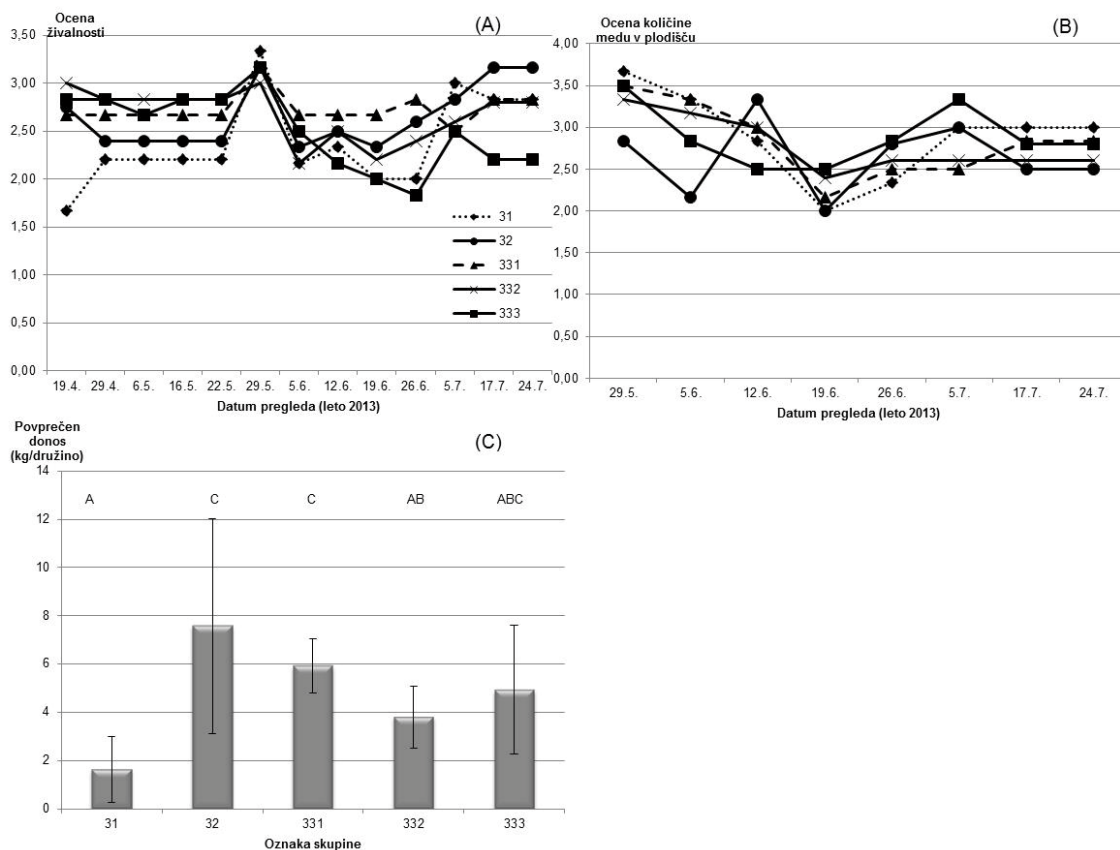
smo nastavili merilno glavo kromometra Minolta CR-400 in za posamezne vzorce odčitali vrednosti L\*, a\* in b\*. Pri vsakem vzorcu medu smo meritev ponovili štirikrat in izračunali povprečen rezultat.

#### 2.4.5 SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE OBARVANOSTI

Pripravili smo 50-odstotno raztopino medu (w/v) in jo pet minut centrifugirali pri 10000 g. Med smo raztopili v bidestilirani vodi. Supernatantu smo zmerili absorbenco pri 450 in 720 nm valovne dolžine. Vrednosti izračunanih razlik absorbance smo množili s tisoč (Beretta in sod., 2005).

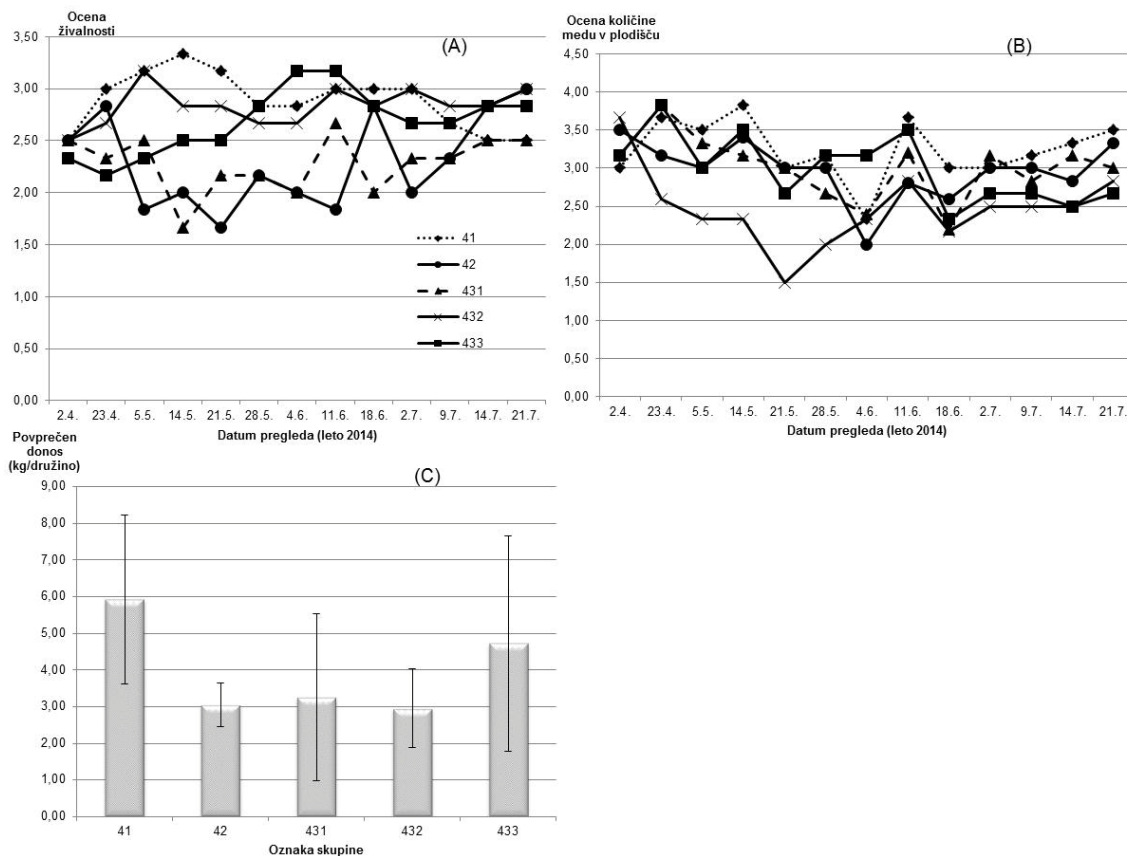
#### 2.5 STATISTIČNA ANALIZA

Statistične analize smo izvedli s programom SPSS, različica 21.0 (IBM). Izračunali smo osnovno opisno sta-



**Slika 1:** Živalnost (slika A) in količina medu v plodišču (slika B) in donos medu ob točenju (11. 6. 2013, slika C). Vrednosti, označene z različnimi velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo glede na neparametrični test ( $p < 0,05$ ).

**Figure 1:** Colony strength (A) and quantity of honey in the brood chamber (B) and honey yield assessments at honey harvesting (June 11, 2013). Different superscript capital letters indicate significant differences according to nonparametric tests ( $P < 0.05$ ).



Slika 2: Živalnost (slika A) in količina medu v plodišču (slika B) in donos medu ob točenju (7. 7. 2014, slika C)

Figure 2: Colony strength (A) and quantity of honey in the brood chamber (B) and honey yield assessments at honey harvesting (July 7, 2014)

tistiko, izvedli smo metodo analize variance, uporabili smo Dunconov post hoc test. V primeru nehomogenosti varianc v vzorcih smo uporabili neparametrične teste. Za ugotavljanje porazdelitve vzorcev med skupinami smo uporabili metodo linearne diskriminantne analize, za namene ugotavljanja najbolj primernih metod za razlikovanje med vzorci pa metodo glavnih komponent. Rezultate kemičnih analiz, s katerimi smo preverjali pristnost medu, smo primerjali z rezultati vsebnosti kvasovk in barve medu.

### 3 UGOTOVITVE IN RAZPRAVA

#### 3.1 ŽIVALNOST ČEBELJIH DRUŽIN

Leta 2013 se živalnost med skupinami ni razlikovala, družine so bile zelo izenačene. Od 29. maja naprej smo spremljali tudi količino medu v plodiščih čebeljih družin. Razlik v količini medu v plodiščih ni bilo. Ob točenju je bil donos medu največji v družinah v skupini 32, to pa je lahko posledica neizpraznjenih medišč pred pašno sezo-

no. Najmanj medu so proizvedle družine v skupini 31. Po pričakovanjih naj bi bil donos največji v družinah v skupinah 333 in 332, vendar je bil poleg družin v skupini 32 donos večji tudi v družinah v skupini 331. To kaže, da je bila paša tudi v naravi in da se družine po donosu med seboj zelo razlikujejo (slika 1).

Čebelarstvo sezono 2014 so zaznamovale slabe pašne razmere in pomanjkanje hrane v čebeljih družinah. Donos medu na kontrolnih tehtnicah je bil tako rekoč celotno sezono negativen, razen v obdobjih od 2. 4. do 23. 4., od 5. 6. do 11. 6. in od 19. 6. do 2. 7., ko so tehtnice pokazale manjši donos. Zaradi slabih pašnih razmer in stanja v čebeljih družinah smo jim 4. junija dodali približno 1 kg sladkorja v obliki sladkorne raztopine, da smo zagotovili zadostno minimalno prehranjenost družin.

Skupine družin so niso razlikovale po živalnosti. Ob spremljanju posameznih skupin čebeljih družin smo ugotovili, da se je živalnost na začetku sezone (izjema so bile le družine v skupini 42) povečevala, pozneje pa se je to dogajalo samo pri družinah v skupini 433, torej pri tistih, ki so prejemale največ krme, pri preostalih družinah pa smo opazili nihanje živalnosti. Zmanjšanje živalnosti

družin v skupini 433 smo ugotovili po 11. juniju, torej po prenehanju krmljenja.

Glede na krmljenje družin bi pričakovali, da bi imele največ zaloge medu v plodiščih družine v skupinah 433 in 432, tem pa naj bi sledile družine v skupini 431. Najmanj medu v plodiščih naj bi imele družine v skupinah 41 in 42. Izkazalo se je, da količina medu v plodišču statistično ni bila značilno različna, prav tako pa tudi ne donos medu na družino ob točenju.

Ob točenju je bil donos medu najmanjši v družinah v skupini 432, prav tako pa je bila najmanjša tudi količina medu v plodiščih. Glede na to, da sta se živalnost in količina skupne zalege v teh družinah v brezpašnem obdobju zmanjšali najmanj, bi lahko sklepali, da so dodano hrano porabile za vzdrževanje živalnosti. Zanimivo je, da je bil ob točenju donos medu največji v družinah v skupini 41, vendar je to verjetno posledica prevešanja, saj je bila tudi pri teh družinah dokazana potvorjenost medu (slika 2).

### 3.2 PRISTNOST MEDU

Med vzorci, pridobljenimi iz družin z različnim krmljenjem, v analiziranih parametrih nismo našli statistično značilnih razlik. Rezultati so prikazani v preglednici 2. Z metodo linearne diskriminantne analize smo ugotovili, da je na podlagi analiziranih parametrov v svojo dejansko skupino pravilno uvrščenih 78,6 % vzorcev.

Da bi pridobili natančnejše podatke o pristnosti medu, so analize razmerja stabilnih izotopov vzorcev iz leta 2014 izvedli v laboratoriju Intertek GmbH v Nemčiji. Njihova metoda omogoča določanje  $\delta^{13}\text{C}$ , tudi posameznih sladkorjev v medu, in sicer glukoze, fruktoze, disaharidov, trisaharidov in oligosaharidov. V skladu z njihovo analizo je med potvorjen, kadar je  $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$  večja od  $\pm 1$  ‰ ali  $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$  oz. večja od  $\pm 2,1$  ‰, kadar je

vsebnost C4 sladkorjev večja od 7 % ter kadar so zaznani oligosaharidi.

Analize razmerja izotopov in vsebnosti tujih encimov so pokazale, da so bili v skupini 41 štirje vzorci nepristni, dva pa povsem na meji; v skupini 42 je bil nepristen en vzorec in eden na meji; v skupini 431 je bilo samo pet vzorcev, od tega je bil eden nepristen, preostali pa so bili povsem na meji; v skupini 432 je bil en vzorec pristen vsi preostali pa nepristni, v skupini 433 pa so bili nepristni štirje vzorci. Vsi vzorci medu iz družin, ki smo jih krmili, so bili obarvani zelenkasto, vendar je bila barva vzorcev v skupinah 432 in 433 intenzivnejša.

Statistično značilne razlike med skupinami smo ugotovili v  $\delta^{13}\text{C}_{\text{glu}}$ ,  $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$ ,  $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ , v vsebnosti sladkorjev C4, aktivnosti beta fruktofuranozidaze, količini kvasov, absorbcanci in parametrih  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , merjenih s kromometrom.

Najbolj negativne vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{glu}}$  smo ugotovili v vzorcih medu iz skupin 431, 42 in 432, najmanj negativne pa v vzorcu iz skupine 41. Razlika v  $\delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$  ( $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$ ) je bila najmanjša v vzorcih medu iz skupine 41, največja pa v vzorcih iz skupin 433, 431 in 432. V skupinah 433, 432 in 431 (krmljene družine) je bila ta razlika povprečno večja od 1, ki je meja za pristen med. Povprečno je bila razlika v  $\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$  ( $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ ) večja od 2 – kar kaže na nepristen med – v vzorcih medu iz vseh skupin čebeljih družin, razen v vzorcih medu iz skupine 42. Največja je bila v vzorcih medu iz skupin 41 in 432. Tako  $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$  kot  $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$  sta bili največji v vzorcih medu iz skupine 432, to pa se ujema tudi z dejstvom, da je bila potvorjenost medu dokazana pri skoraj vseh vzorcih iz te skupine.

Največjo vsebnost sladkorjev C4 (več kot 7 %), ki kaže na potvorjenost medu s trsnim sladkorjem, smo ugotovili v vzorcih medu iz skupine 41. Glede na to, da smo jeseni 2013 družine krmili s trsnim sladkorjem, je ta pojav posledica prevešanja zimske krme iz plodišča v

**Preglednica 2:** Izmerjeni parametri vzorcev medu iz različnih skupin čebeljih družin glede na krmljenje

**Table 2:** Measured parameters for the honey samples according to the different groups of bee colonies

Parameter	Oznaka skupine (n)				
	31 (4)	32 (6)	331 (6)	332 (6)	333 (6)
$\delta^{13}\text{C}$ (med) (‰)	$-25,09 \pm 0,17$	$-24,83 \pm 0,4$	$-24,87 \pm 0,45$	$-24,80 \pm 0,64$	$-25,06 \pm 0,43$
$\delta^{13}\text{C}$ (proteini) (‰)	$-25,09 \pm 0,39$	$-25,17 \pm 0,34$	$-25,05 \pm 0,35$	$-25,19 \pm 0,41$	$-25,15 \pm 0,22$
$\Delta \delta^{13}\text{C}$ (razlika) (‰)	$0,20 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,33$	$0,25 \pm 0,21$	$0,38 \pm 0,29$	$0,25 \pm 0,29$
beta/gama amilaza (enot/kg)	$1,65 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,15$	$1,33 \pm 0,73$	$1,52 \pm 0,25$	$1,37 \pm 0,33$
beta fruktofuranozidaza (enot/kg)	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$3,53 \pm 8,65$	$0 \pm 0$
absorbanca (mAU)	$595,00 \pm 103,73$	$554,42 \pm 74,08$	$465,17 \pm 53,12$	$516,83 \pm 139,88$	$451,67 \pm 93,87$
$L^*$	$44,84 \pm 2,37$	$44,45 \pm 2,33$	$48,96 \pm 2,04$	$44,59 \pm 5,67$	$47,60 \pm 2,8$
$a^*$	$7,45 \pm 2,38$	$8,49 \pm 2,07$	$4,66 \pm 1,57$	$7,97 \pm 4,3$	$5,55 \pm 3,56$
$b^*$	$32,01 \pm 0,72$	$33,37 \pm 2,63$	$35,68 \pm 2,41$	$32,74 \pm 4,59$	$34,26 \pm 1,65$

**Preglednica 3:** Izmerjeni parametri vzorcev medu v različnih skupinah čebeljih družin glede na krmljenje v letu 2014**Table 3:** Measured parameters for the honey samples according to the different groups of bee colonies

Parameter	Oznaka skupine (n)				
	41 (4)	42 (6)	431 (6)	432 (6)	433 (6)
$\delta^{13}\text{C}$ (proteini) (‰)	$-24,57 \pm 0,14$	$-24,33 \pm 0,14$	$-24,40 \pm 0,14$	$-24,42 \pm 0,26$	$-24,53 \pm 0,27$
$\delta^{13}\text{C}$ (med) (‰)	$-23,50 \pm 0,15$	$-23,90 \pm 0,37$	$-23,74 \pm 0,19$	$-23,82 \pm 0,34$	$-23,67 \pm 0,24$
$\delta^{13}\text{C}$ (fru) (‰)	$-23,70 \pm 0,14$	$-24,10 \pm 0,39$	$-23,94 \pm 0,2$	$-24,04 \pm 0,29$	$-23,83 \pm 0,23$
$\delta^{13}\text{C}$ (glu) (‰)	$-23,73 \pm 0,2^a$	$-24,17 \pm 0,3^b$	$-24,08 \pm 0,12^b$	$-24,23 \pm 0,29^b$	$-23,94 \pm 0,22^{ab}$
$\delta^{13}\text{C}$ (disaharidi) (‰)	$-24,03 \pm 0,29$	$-22,46 \pm 0,22$	$-22,77 \pm 0,26$	$-22,29 \pm 0,26$	$-22,14 \pm 0,51$
$\delta^{13}\text{C}$ (trisaharidi) (‰)	$-22,40 \pm 0,18$	$-22,84 \pm 0,34$	$-22,53 \pm 0,24$	$-22,71 \pm 0,37$	$-22,76 \pm 0,32$
$\delta^{13}\text{C}$ (oligosaharidi) (‰)	$0 \pm 0$	$4,02 \pm 9,83$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (razlika fru-glu) (‰)	$0,01 \pm 0,01^A$	$0,10 \pm 0,07^B$	$0,18 \pm 0,08^B$	$0,19 \pm 0,11^B$	$0,12 \pm 0,07^B$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (razlika max) (‰)	$2,19 \pm 0,14^b$	$1,65 \pm 0,28^a$	$2,11 \pm 0,27^{ab}$	$2,33 \pm 0,59^b$	$2,03 \pm 0,41^{ab}$
Vsebnost C4 (%)	$7,20 \pm 0,7^b$	$3,32 \pm 2,31^a$	$4,46 \pm 1,91^a$	$4,05 \pm 2,9^a$	$5,82 \pm 0,79^{ab}$
Razmerje fru/glu	$1,15 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$
Odstotek disaharidov (%)	$12,73 \pm 0,99$	$12,59 \pm 2,7$	$12,83 \pm 1,38$	$12,83 \pm 2,17$	$12,42 \pm 1,25$
Odstotek trisaharidov (%)	$4,03 \pm 0,43$	$4,59 \pm 2,13$	$3,91 \pm 0,81$	$3,55 \pm 0,89$	$4,22 \pm 0,64$
Odstotek oligosaharidov (%)	$0 \pm 0$	$0,26 \pm 0,62$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
Beta/gama amilaza (enot/kg)	$1,83 \pm 0,19$	$2,38 \pm 0,84$	$1,80 \pm 0,33$	$1,72 \pm 0,33$	$2,12 \pm 0,78$
Beta fruktofuranozidaza (enot/kg)	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$7,72 \pm 12,28$	$14,23 \pm 11,41$
Absorbanca (mAU)	$368,33 \pm 28,38^a$	$454,17 \pm 58,81^b$	$373,70 \pm 43,11^a$	$375,83 \pm 49,81^a$	$432,50 \pm 22,53^b$
L*	$54,46 \pm 2,04^b$	$50,60 \pm 3,56^{ab}$	$50,49 \pm 3,78^{ab}$	$49,52 \pm 4,53^a$	$46,50 \pm 1,33^a$
a*	$-1,64 \pm 0,34^B$	$1,94 \pm 2,97^C$	$-2,07 \pm 1,22^B$	$-4,41 \pm 1,78^{AB}$	$-6,12 \pm 1,85^A$
b*	$32,52 \pm 1,12^b$	$33,96 \pm 2,5^b$	$28,88 \pm 2,44^a$	$28,11 \pm 2,7^a$	$28,23 \pm 1,95^a$

Vrednosti, označene z različnimi malimi črkami, se glede na Duncanov test razlikujejo statistično značilno ( $p < 0,05$ ), vrednosti, označene z velikimi črkami, pa glede na neparametrične teste.

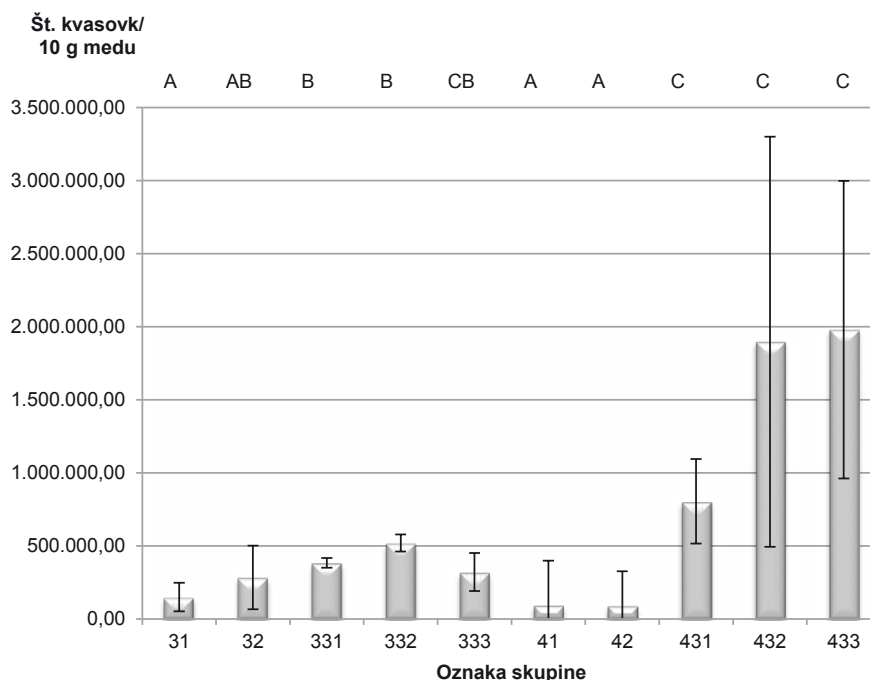
medišče. Povprečne vrednosti rezultatov analiz so prikazane v preglednici 3.

Aktivnost encima beta fruktofuranozidaze (BFF), ki je znak za nepristen med, smo zaznali samo v vzorcih medu iz skupin 432 in 433. V teh vzorcih je bilo tudi največ kvasovk. Med aktivnostjo BFF in količino kvasovk obstaja pozitivna korelacija, zato so kvasovke dober pokazatelj potvorjenosti medu. Metoda določanja kvasovk v medu je preprosta, zato bi jo lahko uporabili tudi kot hitro metodo za odkrivanje potvorb medu. Večjo količino kvasovk so vsebovali tudi vzorci iz skupine 431. Če bi količino kvasovk označevali z oznakami, uvedenimi v melisopalinološki metodi (Russmann, 1998), bi se izkazalo, da je bila količina kvasovk v skupinah 41 in 42 majhna, v skupini 431 velika, v skupinah 432 in 433 pa zelo velika. Če je v 10 g medu več kot 100.000 kvasovk, to že zbuja sum potvorbe s krmo, če jih je v 10 g medu več kot 1.000.000, pa je sum potvorbe upravičen (slika 3). Tudi v vzorcih iz leta 2013 se količina kvasovk povečuje v skladu s številko skupine, izjema so le vzorci iz skupine

333, v katerih je bilo manj kvasovk kot v skupinah 331 in 332. Ker ne vemo, kolikšna količina kvasovk je bila v pogačah, saj teh nismo pripravljali sami, tega parametra v vzorcih iz leta 2013 ne moremo vzeti za merilo.

Absorbanca vzorcev medu iz skupin 41, 431, 432, 433 se povečuje; največjo absorbanco pa smo izmerili v vzorcih iz skupin 42. V družinah iz skupine 42 je bil tudi neiztočen med oz. zimska krma prejšnje sezone, kar lahko pojasni, zakaj je bila absorbanca večja. Visoka absorbanca v vzorcih iz skupine 433 je posledica obarvane krme za čebele, ki je zašla v med. V vzorcih medu iz skupine 431 s prostim očesom opazimo rahel odtenek zelene barve; ta je nekoliko bolj izrazita v vzorcih medu iz skupine 432, najbolj intenzivna pa je v vzorcih iz skupine 433 (slika 4).

Intenzivneje zeleno obarvani vzorci medu iz skupin 432 in 433 imajo večjo absorbanco in so manj svetli, kar je pokazal parameter L\*, izmerjen s krometrom Minolta CR 200B. Parameter a\*, ki v negativnem delu kaže na vsebnost zelene barve v medu, je največji v vzorcih



**Slika 3:** Količina kvasovk v vzorcih medu iz leta 2014. Vrednosti, označene z različnimi velikimi črkami, se glede na neparametrični test razlikujejo statistično značilno ( $p < 0,05$ ).

**Figure 3:** Yeast levels in the honey samples. Different superscript capital letters indicate significant differences according to nonparametric tests ( $P < 0.05$ ).

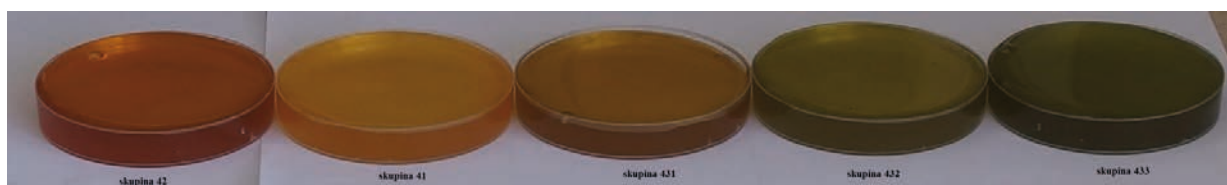
medu iz skupine 433, nasprotno pa je v vzorcih iz skupine 42 (torej v medu iz skupine družin, katerih medišča niso bila izpraznjena) ta parameter pozitiven in kaže na vsebnost rdeče barve. To je znak, da je med teh družin drugega izvora, oziroma da vsebuje tudi med oz. krmo prejšnje sezone. V parametru  $b^*$ , ki v pozitivnem delu kaže na vsebnost rumene barve, se družine, ki so bile krmljene, razlikujejo od družin iz skupin 41 in 42. Rumena barva je že s prostim očesom opazna v vzorcih medu iz skupin 41 in 42.

Z metodo linearne diskriminantne analize smo ugotovili, da so po analiziranih parametrih vsi vzorci (100-odstotno ujemanje) uvrščeni v skupino, ki ji tudi v resnici pripadajo. Z metodo glavnih komponent smo ugotovili, da so za razlikovanje vzorcev med skupinami čebeljih družin, ki so bile krmljene, najprimernejše metode določanja  $\delta^{13}C_{\text{fru}}$ ,  $\delta^{13}C_{\text{bulk}}$ ,  $\delta^{13}C_{\text{disaharidi}}$ , določanja

vsebnosti sladkorjev C4 ter vsebnosti kvasovk in encima beta fruktofuranozidaza.

#### 4 SKLEPI

Metode dokazovanja pristnosti medu so precej drage in težko dostopne, saj ustrezne analize izvajajo le nekateri laboratoriji. Za čebelarstvo bi bilo zato zelo koristno, če bi lahko utemeljen sum nepristnega medu preverili s preprosto in hitro metodo, kot je npr. določitev količine kvasovk v medu. Ta metoda se je namreč v raziskavi izkazala kot dober pokazatelj potvorjenosti medu. Poleg dodajanja kvasa v krmo za čebele je dober pokazatelj potvorjenosti tudi dodajanje barve v krmo, saj je ta opazna že s prostim očesom, dokažemo pa jo lahko tudi z laboratorijskimi analizami. Parameter  $a^*$ , določen s kro-



**Slika 4:** Barva vzorcev medu iz skupin 41, 431, 432, 433

**Figure 4:** Colours of the honey samples from experimental groups 41, 431, 432, and 433



mometrom Minolta, in količina kvasovk sta v negativni korelaciji – kolikor bolj je med zelen, toliko več kvasovk vsebuje. To je tudi v skladu z zastavitvijo poskusa, kajti v družinah, ki so prejemale več krme, je bilo več kvasovk in tudi med je bil bolj zeleno obarvan.

Čebelarji morajo biti pri svojem delu izjemno previdni, saj so spomladansko krmljenje, neizpraznjena medišča in tehnika prevešanja v AŽ-panjih lahko vzroki za pridelavo nepristnega medu. Med družinami so sicer velike razlike, ki so odvisne tudi od sezone. Vsekakor morajo čebelje družine imeti v plodišču na voljo zadostno količino hrane. Kot je videti, krmljenje ob zadostni količini hrane v družinah ne zagotavlja njihove večje živalnosti, brez dvoma pa s tem postavljamo na kocko pristnost medu.

## 5 ZAHVALA

Rezultati naloge so bili delno pridobljeni v okviru Programa javne svetovalne službe v čebelarstvu in v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2011–2013 ter v letih 2014–2016, delno pa v okviru doktorskega študija na Biotehniški fakulteti.

## 6 VIRI

- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 4: 549–562. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
- Association of Official Analytical Chemists 1998.12. C4 plant sugars in honey: Internal standard stable carbon isotope ration method, 1999. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. Vol. 2. Cunniff, P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 27–30
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytical Chimica Acta*, 533, 2: 185–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>
- Cordella C., Militão J.S.L.T., Clément M.-C., Drajnud P., Cabrol-Bass D. 2005. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 531, 2: 239–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.018>
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133–149. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037\(57\)90024-8](http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037(57)90024-8)
- Crane E. 1950. The effect of spring feeding on the development of honey bee colonies. *Bee World*, 31: 65–72. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.1950.11094644>
- Elflein L., Raezke K.P. 2008. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - isotope ratio mass spectrometry ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{CEA/LC-IRMS}}$ ). *Apidologie*, 39, 5: 574–587. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008042>
- Farrar C.L. 1937. The influence of colony populations on honey production. *J. Agric. Res.*, 54: 945–954
- Hrassnigg N., Craillsheim K. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 36: 255–277. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2005015>
- Korošec M. 2012. Določitev fizikalnih in kemijskih parametrov za ugotavljanje pristnosti medu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151 str.
- Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.*, 142: 2369–2372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.007>
- Padovan G.J., De Jong D., Rodrigues L.P., Marchini J.S. 2003. Detection of adulteration of commercial honey samples by the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82: 633–636. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00504-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00504-6)
- Russman H. 1998. Hefen und Glycerin in Blütenhonigen-Nachweis einer Garung ode einer Abgestoppten Garung. *Lebensmitedchemie*, 52: 116–117
- Schmickl T., Craillsheim K. 2004. Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie*, 35: 249–263. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004019>
- Standifer L.N. 1980. Honey bee nutrition and supplemental feeding. *Agricultural handbook*, 335: 39–45
- Valkov V., Elflein L., Raezke K.P. 2010. Determination of foreign enzymes in honey to detect adulterations with sugar syrups. Bremen, Intertek Food Service, GmbH: 1–5
- White J.W., Winters K. 1989. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. *Journal of AOAC International*, 72: 907–911



# THE ANALYSIS OF COSTS RELATED TO BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY DISEASE OCCURRENCE IN THE CZECH REPUBLIC IN 2001–2014

Richard POSPÍŠIL<sup>1</sup>

Received May 20, 2015; accepted June 30, 2015.  
Delo je prispelo 20. maja 2015, sprejeto 30. junija 2015.

## *The analysis of costs related to bovine spongiform encephalopathy disease occurrence in the Czech Republic in 2001–2014*

This paper pays attention to analysis of the economic impacts of the bovine spongiform encephalopathy (BSE) occurrence in the Czech Republic, namely the financial compensations to the farmers whose herds had been affected and the costs of animal killing and carcass disposal in the rendering plant. Between February 2001 and the end of 2014, a total of 1 879 749 cows were examined and 30 cases of the BSE were detected. Consequently, 4 243 cows in cohorts were killed and their carcasses were safely disposed of. The farmers whose herds had been affected were provided compensations for the losses suffered. The total of the compensations in this period reached EUR 7 752 000. Of these, 83.3 % (EUR 6 458 000) were compensations for the value of the killed animals, 9.7 % (EUR 752 000) for the related costs, i.e., killing, safe disposal of carcasses and the examination for the BSE, and 6.9 % (EUR 535 000) for the losses due to non-materialised production. The average costs per 1 BSE-positive animal were EUR 258 400 and the average costs per 1 cohort animal were EUR 1 827. In the rendering plant responsible for killing the infected and cohort animals and safely disposing of their carcasses, the total of 2 342 tons of raw material was processed between March 2003 and 2009, and this cost EUR 363 777. The fact that there were only two last cases of the BSE in 2009 suggests a trend towards the disease eradication, which is in agreement with the situation in the other EU countries.

**Key words:** cattle / infectious diseases / bovine spongiform encephalopathy / BSE / economics / costs / financial compensation / Czech Republic

## *Analiza stroškov, povezanih z bovino spongiformno encefalopatijo v Češki republiki v obdobju 2001–2014*

Prispevek obravnava ekonomske posledice pojava bovine spongiformne encefalopatije (BSE) v Češki republiki, namreč denarna nadomestila rejcem, katerih črede so bile prizadete, ter stroške klanja živali in odstranitve klavnih trupov v kafileriji. Med februarjem 2001 in koncem leta 2014 je bilo testiranih 1,879.749 goved in v 30 primerih je bil odkrit BSE. V čredah, kjer se je pojavil BSE, je bilo izločenih 4.243 živali. Kmetom, katerih črede so bile prizadete, so ponudili nadomestila za izgube, ki so jih utrpeli. Vsota nadomestil v tem času je dosegla znesek 7,752.000 evrov. Od tega je bilo 83,3 % (6,458.000 evrov) nadomestil za zaklane živali, 9,7 % (752.000 evrov) za s tem povezane stroške, kot je klanje, varna odstranitev trupov in stroški diagnostike, ter 6,9 % (535.000) nadomestil za izpad proizvodnje. Povprečni stroški za žival, ki je bila pozitivna za BSE, so znašali 258.400 evrov in za žival iz črede z živaljo, ki je bila pozitivna za BSE, 1.827 evrov. V kafileriji, ki je bila odgovorna za klanje okuženih živali in živali iz čred, kjer je bila ugotovljena okužba, ter za varno odstranitev trupov, je bilo med marcem 2003 in marcem 2009 predelanih 2.342 ton surovin, kar je stalo 363.777 evrov. Dejstvo, da sta bila zadnja dva primera BSE v letu 2009, nakazuje trend eradikacije bolezni, kar je v skladu s stanjem v drugih državah EU.

**Ključne besede:** govedoreja / govedo / nalezljive bolezni / goveja spongiformna encefalopatija / BSE / ekonomika / stroški / povračilo stroškov / Češka

<sup>1</sup> Palacký Univ. of Olomouc, Fac. of Arts, Dept. of Applied Economics, Křížkovského 12, CZ-771 80 Olomouc, Czech Republic, e-mail: richard.pospisil@upol.cz

## 1 INTRODUCTION

For more than two decades, the European beef demand was affected by the existence of bovine spongiform encephalopathy (BSE) because of its potential danger to human health. The bovine spongiform encephalopathy (BSE) is an infectious disease caused by prions and was first detected in Great Britain in 1985/1986. In 1988, it was ascertained that the major source of infection was the use of meat and bone meal from the fallen stock animals (Wilesmith *et al.*, 1988). In the Czech Republic, feeding meat and bone meal to ruminants was banned in 1991 (Anonym, 1991).

In the industrialized countries, for the sake of public health cattle slaughtered at 30 months and older was examined for the presence of prions in the brain tissue. In the Czech Republic, the regular examination of animals came into effect on 1st February 2001 and, by 31st December 2014, a total of 1 879 749 cattle were examined, of which 30 animals were tested positive. Only two outbreaks of the bovine spongiform encephalopathy in 2009 and no case of the BSE within the last five years confirm that in the Czech Republic the disease incidence has definitely a decreasing trend, which is in agreement with the situation in the other EU countries. Because of 30 positive BSE findings, the total of 4 243 cows were killed and their carcasses were destroyed. The animals selected to be killed in relation to each BSE occurrence constitute a cohort, which is a group of animals born in the same herd within 12 months preceding or following the date of birth of the affected bovine animal.

Nowadays according to rules of World Organization for Animal Health, each of 180 member countries registered for this organization has assigned a risk status with the degree of risk of BSE. As the official BSE status of a country or zone is determined based on an overall assessment of risk, the occurrence of a new BSE case implies a re-assessment of the official risk status only in the event

of a change in the epidemiological situation indicating failure of the BSE risk mitigating measures in place.

Member countries recognised as having a negligible BSE risk in accordance with Chapter 11.4. of the Terrestrial Code of World Organization for Animal Health shows Table 1.

According to Regulation EU No. 2013/76/EU (from 4<sup>th</sup> February 2013) it is not necessary to investigate in healthy animals in these countries (from 1<sup>st</sup> July 2013). Table 2 shows countries with controlled BSE risk that are required to test all animals aged over 30 months.

In the Czech Republic, the procedure for the destruction of the killed animals developed over years. At the first, 2001 BSE occurrence, the animals were killed on the farm and buried within its boundary. However, this proved difficult in terms of hygiene and sanitation and was ethically unacceptable. Therefore, on the following five occasions, the animals were killed and their carcasses disposed of at the regular rendering plants. This, however, carried a risk of contaminating both the premises and products and thus, in 2003, the rendering plant Asanace Žichlínek Ltd. was assigned by the State Veterinary Administration to become an institution specialized in killing all the BSE suspected animals, and in processing and disposing of their carcasses in the following years. The meat and bone meal produced was subsequently incinerated in cement works.

In accordance with the EU common Agricultural Policy and farming promotion, the EU provides financial compensations to farmers who have suffered losses due to the BSE. Their allocation is regulated by the Act no. 166/1999 on Veterinary Care and on Amendment of Certain Related Acts (Veterinary Act), with particulars given in the Title IX Compensation of Costs and Losses Incurred in Connection with Dangerous Contagious Diseases (Anonym, 1999). This defines reimbursements to farmers whose cattle herds have been affected by the transmissible diseases specified in the Annexes 3 and 4

**Table 1:** Negligible BSE risk countries

**Preglednica 1:** Države z zanemarljivim tveganjem za BSE

Argentina	Cyprus	Ireland	Netherlands	Slovenia
Australia	Czech Republic	Izrael	New Zealand	Sweden
Austria	Denmark	Italy	Norway	Switzerland
Belgium	Estonia	Japan	Panama	United States
Brazil	Finland	Korea (Rep. of)	Paraguay	Uruguay
Bulgaria	France	Latvia	Peru	
Chile	Hungary	Lichtenstein	Portugal	
Colombia	Iceland	Luxembourg	Singapore	
Croatia	India	Malta	Slovakia	

**Table 2:** *Controlled BSE risk countries***Preglednica 2:** *Države, ki obvladujejo tveganje BSE*

Canada	Germany	Nicaragua	Spain
Chinese Taipei	Lithuania	Poland	United Kingdom
Costa Rica	Mexico	Romania	

to this Act. For 62 specified dangerous transmissible diseases, it outlines the indemnity strategies and the general itemisation of the compensation. The Czech legislation is in full agreement with the Regulation No. 999/2001 of the European Parliament and of the council, of 22nd May 2001, laying down the rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies, as amended (Pospíšil, 2008).

To provide a deeper insight into the legal and economic aspects associated with the BSE in the Czech Republic, the first part of the study was focused on the evaluation of the indemnity policy and quantification of reimbursements provided for farmers according to the Veterinary Act in the period from 2001 to 2014. The total costs were itemised and the cost items broken down to cover the individual operations the farmers were responsible for in the BSE management and for which they were subsequently reimbursed.

In the second part, my aim was to calculate the costs related to the killing and disposal of the animals brought to the rendering plant Asanace Žichlínek Ltd. between October 2003 and 2009. This calculation ends in 2009, because after this year there was no occurrence of BSE in the Czech Republic and no killing and disposal of animals in this rendering plant.

## 2 MATERIAL AND METHODS

The chief method used in the first part was the evaluation of legal rules, i.e. legal acts, regulations and implementing provisions, and their application to the BSE

occurrence in Czech herds. In addition, the EU legislation concerning this issue was analysed and compared with the relevant legislation of the Czech Republic.

The method of economic evaluation was the analysis of statistical data related to the costs of the BSE eradication in the

Czech Republic; this information was provided by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Saksún, 2008). Subsequently, the data was related to the individual cost compensation items, as specified by the Veterinary Act.

The analysis presented in the second part was based on account records provided by the Asanace Žichlínek Ltd. (Nicák, 2008). It included an evaluation of the whole process consisting of animal killing, carcass mechanical processing, heat treatment, sterilisation, drying, hammer-mill pressing and pulverisation, and dispatching of the processed material. The costs of transporting the animals to be killed at the rendering plant were not included. They were born by the farmers who were subsequently reimbursed by the Ministry of Finance in accordance with the Veterinary Act.

## 3 RESULTS

### 3.1 PART 1. ECONOMIC EVALUATION OF LOSS COMPENSATIONS

The reimbursements for the 2001–2014 periods were itemised, analysed and finally summarised.

Table 3 shows the compensations for all costs spent in relation to the BSE between 2001 and 2014. A total of 30 animals tested BSE-positive and, consequently, 4 243 animals coming from 141 herds were killed due to the constitution of cohorts. The total of compensations in this period reached EUR 7 752 000. The average occurrence was 2.14 BSE-positive animals per year, the average

**Table 3:** *Total costs (in EUR thousand) associated with 30 BSE cases in the period 2001 to 2014***Preglednica 3:** *Skupni stroški (v tisočih evrov), povezani s 30 primeri BSE v obdobju 2001 do 2014*

Period	Number of herds by cohort size	Number of animal killed	Value of animals	Killing	Safe carcas disposal	Examina-tion for BSE	Related costs*	Observ. of emerg. veter. measur.	Non-material production	Total
2001	A. 109	219	383.4	8.6	39.9	6.0	3.8	0.0	5.0	446.6
to	B. 17	854	1 164.5	16.2	90.1	34.7	6.3	4.0	97.4	1 413.2
2014	C. 15	3170	4 910.1	55.1	321.2	130.8	27.0	15.3	432.6	5 892.1
	Σ 141	4243	6 458.0	79.9	451.2	171.5	37.1	19.3	535.0	7 752.0

A = 1–10 animals in a cohort; B = 11–100 animals in a cohort; C > 100 animals in a cohort

\* Costs related to killing and safe disposal of carcasses and farm decontamination

costs per 1 BSE-positive animal were EUR 258 400, and the average costs per 1 cohort of animals (killing and carcass disposal) were EUR 1 827.

Of these, 83.3 % (EUR 6 458 000) were compensations for the value of the killed animals, 9.7 % (EUR 752 000) for the related costs, i.e., killing, safe disposal of the carcasses and examination for the BSE, and 6.9 % (EUR 535 000) for the losses due to the non-materialised production.

The number of cohorts is not in agreement with the total of 141 herds affected, as shown in Table 3. This is because there were instances when an animal from the original cohort was transferred or sold to another herd. Its new keeper, having to comply with the Emergency Veterinary Measures, then had this cows killed and thus one cow was reported in association with two or more herds.

### 3.2 PART 2. EVALUATION OF THE COSTS ASSOCIATED WITH ANIMAL KILLING AND CARCASS PROCESSING AT THE ASANACE ŽICHLÍNEK LTD.

In the period from October 2003 to the end 2014, a total of 3 793 cattle were killed and their carcasses destroyed and disposed of at the rendering plant. This included 701 cows in 2003; 1 167 in 2004; 1 262 in 2005; 288 in 2006; 131 in 2007, 23 in 2008 and 221 animals in 2009. In the terms of the cohort size, the largest one (7<sup>th</sup>) included 875 cows, the smallest (27<sup>th</sup>) had only three animals. The average was 126 animals per 1 cohort. The animals of 27<sup>th</sup> cohort derived from the BSE case detected on 19th December 2007 were gradually identified and destroyed early in 2008. The selected economic items and their distribution in the years 2003 to 2009 are shown in Table 4. Table ends in 2009, because after this year there was no occurrence of BSE in the Czech Republic.

According to Table 4 a total of 2 342 tons of raw material was processed at costs ranging from EUR 0.15 to EUR 0.30 per 1 kg between 2003 and 2009. The gradual increase in the cost per 1 kg was due to a rise in operation costs including higher wages and increased energy prices. Based on the cost per 1 kg processed material, the total costs associated with animal killing and carcass disposal reached EUR 53 807 in 2003, EUR 91 911 in 2004, EUR 145 684 in 2005, EUR 35 379 in 2006, EUR 14 670 in 2007, EUR 3 534 in 2008 and EUR 18 792 in 2009. The total costs for the whole period of 2003–2009 amounted to EUR 363 777.

## 4 DISCUSSION

Due to early and stringent veterinary precautions and the ban on feeding meat and bone meal (MBM) to cattle in 1991, the first case of the BSE in the Czech Republic was detected in 2001. The most probable cause was an indirect contamination of cattle feed with the imported MBM or with the MBM intended for feeding pigs and poultry and allowed for use before 2003 (Semerád, 2007). In the period from 1<sup>st</sup> February 2001 to 31<sup>st</sup> December 2014, 30 BSE-positive cases were identified by the active monitoring for the BSE involving 1 879 479 cows. The detection was effective thanks to the well coordinated laboratory diagnostic procedures carried out in the laboratories of the State Veterinary institutes in Prague, Jihlava and Olomouc.

To reduce the economic impact of the BSE on farmers, legal means have been established to reimburse farmers for the losses both direct and related. The latter involve costs of the examination for the BSE, transport of animals to a specialised rendering plant, their killing and safe disposal of their carcasses, and cleaning and disinfection of the holding and its equipment, though this procedure is questionable, because the BSE is not a truly contagious disease. In addition, the farmer is reimbursed for losses due to the non-materialised production. However, not all these compensations can completely cover the costs incurred in relation to the BSE.

In the first place, the producer-consumer relations, usually taking a long time to establish, are destroyed and the return to the market is difficult; also, large costs are necessary to build up the herd again. These costs are difficult to calculate and their compensation cannot be claimed because they are not treated by the legislation. A BSE incident is also associated with several adverse consequences, such as loss of jobs in an agricultural enterprise, which can have a deep impact on rural populations. The ensuing problems in the broadest sense of the word can partly be eased by the commercial insurance policy. The experience showed that most of the farmers were insured. Any payment of insurance benefit has no effect on the amount of cost compensation based on the Veterinary Act. Since a farmer-insurance company relationship is a business one, it was not possible to find out the information on benefit payments and to include it in this study.

The total amount of compensations paid was EUR 203 704 in 2001, EUR 59 259 in 2002, EUR 1 740 741 in 2003, EUR 1 474 074 in 2004, EUR 3 403 704 in 2005 and EUR 411 111 in 2006. In 2007, it was only EUR 6 278, because the 27<sup>th</sup> case was an eleven-year-old cow whose cohort included only three animals left due to slaughtering of the other cows. Compensations provided in rela-

**Table 4:** Selected costs of BSE-related cattle disposal at the rendering plant Asanace Žichlínek Ltd. and their distribution over the period 2001 to 2009**Preglednica 4:** Izbrani stroški, povezani z odstranjevanjem z BSE okuženih živali v kafileriji Asanace Žichlínek Ltd., in njihova porazdelitev v obdobju 2001 do 2009

		Quarter 1	Quarter 2	Quarter 3	Quarter 4	Total
2003	EUR/kg				0.15	
	kg processed				415 080	415 080
	animal killed				701	701
	total costs				53 807	53 807
2004	EUR/kg	0.15	0.15	0.15	0.15	
	kg processed	362 869	60 800	190 951	94 410	709 030
	animal killed	607	101	310	149	1 167
	total costs	47 039	7 881	24 753	12 238	91 911
2005	EUR/kg	0.17	0.17	0.17	0.17	
	kg processed	257 220	293 200	146 800	115 200	812 420
	animal killed	397	454	240	171	1 262
	total costs	42 870	54 296	27 185	21 333	145 684
2006	EUR/kg	0.19			0.19	
	kg processed	158 426			32 620	191 046
	animal killed	236			52	288
	total costs	29 338			6 041	35 379
2007	EUR/kg	0.19				
	kg processed	79 220				79 220
	animal killed	131				131
	total costs	14 670				14 670
2008	EUR/kg	0.25				
	kg processed	14 680				14 680
	animal killed	23				23
	total costs	3 534				3 534
2009	EUR/kg	0.30				
	kg processed	62 660				62 660
	animal killed	221				221
	total costs	18 792				18 792
Total costs for 2003 to 2009						363 777

tion to the 28<sup>th</sup> BSE-positive case detected on 19<sup>th</sup> December 2007 were paid in March 2008 and reached EUR 50 222. The last two cases of BSE occurrence in 2009 cost 402 907. The total costs associated with the BSE occurrence in the Czech Republic amounted to EUR 7 752 000. The average costs per 1 BSE-positive animal were EUR 258 400 and the average costs per 1 cohort of animals (killing and disposal of the carcasses) were EUR 1 827.

To ease the negative economic impacts of the BSE, the EU provides financial support for all member states. For instance, in 2007 the Czech Republic received EUR

1 640 000 for the active monitoring and EUR 2 500 000 for the eradication (EU-Dg-Sanco, 2006).

It is interesting that the amounts of reimbursement presented in the international literature are reported only as the total costs per certain period, including the data from the Great Britain that suffered most. The calculation of cost compensations is based on tables prepared in advance in which, for each cattle age category, the amount of compensation is given without any respect to the animal's actual productivity (Defra, 2007). The British government study has reported that the total net cost

of the BSE crisis to the Exchequer by the end of the fiscal year 2001/2002 reached £ 4.2 billion, to which the EU contributed £ 487 million, which is 11.6 % (Brinkle, 2002). It is evident that this high sum of money was relevant to the exceptionally high number of the BSE-positive cows that had exceeded 187 000 animals by that fiscal year. This sum also included £ 720 million to compensate for the loss of markets in the EU countries, because the European Commission banned beef export in March 1996 (in the USA, import of British beef was banned in the late 1980s). The beef production accounts for about 0.5 % of the British gross domestic product and the British beef industry has over 130 000 employees. With the decrease in beef meat prices, the prices of all other kinds of meat increased in the Great Britain. This chiefly concerned poultry and lamb meat, which increased in price approximately by 5 %, with pork price remaining generally unchanged (Leeming and Turner, 2004).

In Northern Ireland, the beef producing industry employs over 5 000 workers and the additional 600 000 are employed in the related industrial branches (Caskie *et al.*, 1998). Thus, the rate of employment in this industry has a deep social impact. The costs of re-qualification for workers who had lost their jobs due to the reduced beef production were estimated to be 7.9 % of all costs related to the BSE crisis (Muth *et al.*, 2005).

This study paid attention to the costs of animal killing and their carcass disposal in the rendering plant specialised for this purpose. The evaluation was based on the cost per 1 kg of the processed material, which ranged from EUR 0.15 in 2003 to EUR 0.30 in 2009. Between March 2003 and the end 2009, the total of 3 793 bovine animals associated with the BSE occurrence were killed there and their carcasses were destroyed and disposed of; this accounted for 2 342 tons of the processed material. The total costs for the whole period amounted to EUR 363 777. The considerable increase in costs during this period is in agreement with the inflation development (wagepush, energy price increase) in the domestic economy and is also related to the increased financial demands for the hygienic and technological quality of the rendering plant operation (septic and aseptic units, disinfecting fords, separation of processing routes) after the Czech Republic joined the EU.

Costs described here did not include the costs of transporting the animals to be killed to the rendering plant. These were covered by the farmer who was subsequently reimbursed by the Ministry of Finance in accordance with the Act no. 166/1999 on Veterinary Care and on the Amendment of Certain Related Acts. The costs greatly varied depending on the distance between the farm and the rendering plant and on whether the farmers had their own transporting facilities or had to hire it.

In one instance, no long-distance transport was needed. It occurred when the first BSE case was discovered in 2001 in the village of Dušejov in the Jihlava district. All 134 cows of the cohort were killed on the farm and buried in its vicinity. The carcasses were placed four metres deep in the ground and were covered up with a 1.5–2 m layer of soil (Meloun, 2006). Although this method of disposal may seem complicated, the total costs were only EUR 2 866 (hydrogeological expert report EUR 300, wages EUR 478, local transport EUR 1 593, fencing EUR 495) (Saksún, 2008), which was much less than what the process of disposal would have cost in a rendering plant.

However, for the public health and environmental reasons it was not possible to continue with this method of disposal. Moreover, the cohorts derived from the later BSE cases were larger in size than the first cohort buried in Dušejov. For instance, the cohort from the 7<sup>th</sup> case in 2003 had 875 cows and that from 22<sup>nd</sup> case in 2005 had 333 cows, and the burial of so many animals would not have been feasible.

The rendering process produces meat and bone meal; one kilogram of raw material gives 0.28 to 0.29 kg of it. In addition, 0.08 to 0.09 kg of animal fat is obtained; the residual fat content in meat and bone meal is 13 % to 18 % and residual moisture is 2.8 %.

The meat and bone meal produced is transported to cement works for incineration at the temperature of about 1 200 °C. One kilogram of meat and bone meal gives about 0.25 kg ash. By the process carried out at the rendering plant and by the subsequent incineration in a cement factory, 30 to 40 kg ashes are produced. The ashes are included in the cement production and become a part of the final product. Considering that the total number of cows killed and disposed of at the rendering plant Asanace Žichlínek was 3 793, the total amount of ashes produced in the cement works was 637 tons.

The rendering plant paid 5 cents the cement works for 1 kg meat and bone meal to be incinerated, and claimed an equal compensation from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. The funds to cover the expenses related to the disposal of meat and bone meal had been included in the state budget (the “general Treasury Administration” chapter) until 2007. Since 2007, the funds have no longer been available and the meat and bone meal have been incinerated in the cement works free of charge. However, the cement works can utilize the caloric power of the meat and bone meal, because its 18 MJ per kg equals to the fuel efficiency of 1 kg lignite (Anonym, 2008). Considering that the average price of 1 ton of lignite is EUR 125, the 637 tons of burnt meat and bone meal contributes about EUR 79 625 to the cement factory’s budget.



## 5 CONCLUSION

Between February 2001 and the end of 2014, the total of 1 879 479 cows were examined and 30 cases of the BSE were detected. Consequently, 4 243 cows in cohorts were killed and their carcasses were safely disposed of. The total of compensations in this period reached EUR 7 752 000. Of these, 83.3 % (EUR 6 458 000) were compensations for the value of the killed animals, 9.7 % (EUR 752 000) for the related costs, i.e., killing, safe disposal of carcasses and examination for the BSE, and 6.9 % (EUR 535 000) for the losses due to the non-materialised production. The average costs per 1 BSE-positive animal were EUR 258 400 and the average costs per 1 cohort of animals were EUR 1 827. In the rendering plant in Žichlínek responsible for killing of the infected and cohort animals and safely disposing of their carcasses, the total of 2 342 tons of raw material were processed between March 2003 and 2009, and this cost EUR 363 777.

## 6 ACKNOWLEDGEMENTS

Work on this article was supported by the grant from Philosophical Faculty of Palacký University, IGA\_FF\_2015\_014, Continuities and Discontinuities of Economy and Management in the Past and Present.

## 7 REFERENCES

- Anonym. 1991. Vyhláška č. 413/1991 Sb., o registraci některých druhů krmiv, jejich dodavatelů a o odborné státní kontrole (Decree No. 413/1991 Sb., about registration of feed, its suppliers and specific state control). Mze ČR, Praha.
- Anonym. 1999. Zákon č. 166/1999 o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (Act no. 166/1999 coll. on Veterinary Care and on Amendment of Certain Related Acts). Mze ČR, Praha.
- Anonym. 2008. Protokol č. 383/2007/PoV (record no. 383/2007/PoV). Laboratoř paliv, odpadů a vod VÚHU, a.s. Most.
- Brinkle J. 2002. Impact of BSE on the UK Economy. National Audit office, NC, USA.
- Caskie P., Moss J.E., Davis J. 1998. The beginning of the end or the end of the beginning for the BSE crisis? *Food Policy*, 23: 231–240. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-9192\(98\)00035-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-9192(98)00035-9)
- EU-Dg SANco E.2. 2006. Hygiene and control measures. Annual Activity report: 42–43
- DEFRA. 2007. Compensation for Bovine TB, BSE, Brucellosis and Enzootic Bovine Leukosis. *Information Bulletin*, ref: 238/07
- Leeming J., Turner P. 2004. The BSE crisis and the price of red meat in the UK. *Applied Economics*, 36: 1825–1829. <http://dx.doi.org/10.1080/0003684042000227868>
- Meloun V. 2006. Výskyt BSE v České republice do roku 2006 (BSE occurrence in the Czech Republic till 2006). [Dissertation Thesis.] Státní veterinární správa ČR, Brno.
- Nicák J. 2008. Osobní sdělení, [Personal communication]. Účetní doklady Asanace, spol. s r.o. Žichlínek.
- Pospíšil R. 2008. Hlavní zásady a struktura náhrad poskytovaných chovatelům s výskytem bovinní spongiformní encefalopatie v chovech skotu (Majority of compensations to Breeders with BSE occurrence in breeding cattle). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 56: 257–261; iSSn 1211-8516.
- Saksún J. 2008. Informace Ministerstva zemědělství ČR k výskytu BSE v ČR (Ministry of Agriculture information on BSE occurrence in the Czech Republic). Mze, ČR.
- Semerád Z. 2007. Osobní sdělení, [Personal communication]. SVS, ČR.
- Wilesmith J.W., Wells G.A.H., Cranwell M.P., Ryan J.B.M. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Veterinary record*, 123: 638–644; ISSN 0042-4900. Arrived on 10th November 2008.



# PRED ODHODOM NA DUNAJ NAJ BI BIL ANTON JANŠA NA KOROŠKEM?

Andrej ŠALEHAR<sup>1</sup>, Janez GREGORI<sup>2</sup>, Anton KOŽELJ<sup>3</sup>, Peter DOVČ<sup>4</sup>

Delo je prispelo 15. aprila 2015, sprejeto 20. maja 2015.  
Received April 15, 2015; accepted May 20, 2015.

## *Pred odhodom na Dunaj naj bi bil Anton Janša na Koroškem?*

Mnenja in trditve, da je bil Anton Janša od leta 1765 do odhoda na Dunaj v letu 1766 na Koroškem, da je bil član koroške kmetijske družbe in podobno, so novost v poznavanju življenja in dela prvega c. k. čebelarkega učitelja na Dunaju. Prva objava s to trditvijo je v knjigi Ehrenfelsa iz leta 1829 in druga v knjigi Heinricha iz leta 1832. Objavi se ponovita v drugih delih. Objave sporočajo, da je Anton Janša Korošec, da je na Dunaj prenesel koroški način čebelarjenja, da izhaja iz Koroške kmetijske družbe, ki ga je tudi priporočila na Dunaju, da ga je na Dunaj poklicala cesarica Marija Terezija in podobno. Med slovenskimi avtorji sta na nekatere od teh zapisov opozorila Perc (1925a,b) in Stabej (1955). Janša v svojih knjigah piše in poudarja svoje gorenjsko poreklo, gorenjski način čebelarjenja in gorenjski leseni panj ter nikjer ne omenja svojega bivanja in delovanja na Koroškem. Za potrditev teh zapisov in objav o Antonu Janši na Koroškem je treba poiskati arhivske listine v celovškem deželnem arhivu, s katerimi bo teza potrjena oz. ovržena.

**Ključne besede:** čebelarstvo / čebele / Janša, Anton / biografije

## 1 UVOD

Letos praznujemo 240 letnico izida druge Janševe knjige *Vollständige Lehre von der Bienenzucht* (Popolni nauk o čebelarstvu). V počastitev sto petdesete obletnice je Perc (1925b) napisal in v samozaložbi v nemškem jeziku izdal knjigo Anton Janscha: erster kaiser. königl. Lehrer der Bienenzucht in Wien: 1775–1925 (Anton Jan-

## *Before going to Vienna could Anton Janša be in Carinthia?*

The opinions and arguments, claiming that Anton Janša stayed in Carinthia from 1765 until his departure for Vienna in the year 1766, that he was a member of the Carinthian agricultural society and similar, are a novelty in the knowledge of the life and work of the first c. k. beekeeping teacher in Vienna. This statement was for the first time published in the book of Ehrenfels in 1829 and for the second time in the book of Heinrich in 1832. This notice was later reproduced in other works. The message of these publications is: Anton Janša was a Carinthian, he brought the Carinthian way of beekeeping to Vienna, he originates from the Carinthian agricultural society, which also recommended him in Vienna, so he was invited by the Empress Maria Theresia to Vienna and so on. Among Slovenian authors Perc (1925a,b) and Stabej (1955) drew attention to these records. Janša describes in his books and stresses his Carniolan origin, Carniolan way of beekeeping and Carniolan wooden hive and does not refer to his life and work in Carinthia. To confirm these records and publications on Anton Janša in Carinthia, it is necessary to find archival documents in provincial archive in Klagenfurt to confirm or to reject this hypothesis.

**Key words:** apiculture / bees / Janša, Anton / biographies

ša: prvi cesarsko kraljevi učitelj čebelarstva na Dunaju: 1775–1925). Uvodoma piše, da želi s to knjigo popraviti vse napake, ki so zapisane o življenju in delu Antona Janše. Podatke je zajemal v številnih objavah o Janši, še posebej pa se je opiral na deli Navratila (1883) in Wytopila (1900). Obdobje od Janševoga rojstva leta 1734 do odhoda na Dunaj leta 1766 je Perc opisal v dveh poglavjih: *Des Anton Janscha Jugendjahre* (Janševa mladost) in *Des*

1 Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-naslov: andrej.salehar@bf.uni-lj.si

2 Podkoren 71, SI-4280 Kranjska Gora, Slovenija

3 Adamičeva 5, SI-1293 Šmarje - Sap, Slovenija

4 Isti naslov kot 1

Anton Janscha Bienen- und Geburtshaus (Janšev čebelnjak in rojstna hiša).

Perc (1925a) je istega leta v Slovincu objavil članek Pri Anton Janševih sorodnikih na Dunaju, kjer je zapisal, da »...baron Ehrenfels, ki v svoji imenitni knjigi od leta 1829 Janšo dosledno Korošca imenuje ...«. V zadnjih letih se o Antonu Janši pogosteje pojavljajo in ponavljajo take in podobne trditve. Večinoma so omejene na leti 1765 in 1766. Spodbudile so raziskavo, ki naj bi odkrila zapise o povezanosti Antona Janše s sosedno Koroško, jih kritično presodila in potrdila oz. ovrgla. Prvi rezultati so predstavljeni v tem sestavku.

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

Na simpoziju o Juriju Jonkeju, ki je bil 22. 3. 2013 na Čebelarški zvezi Slovenije, smo se seznanili s tezo, da naj bi bil Anton Janša pred odhodom na Dunaj na Koroškem. Ustanovili smo delovno skupino (Janez Gregori, prof. biol., prof. dr. Peter Dovč, prof. dr. Andrej Šalehar, Anton Koželj), ki je opravila prva proučevanja gradiv o Antonu Janši (AJ). Navezala je tudi stike z enim od avtorjev teze, Ernestom Fuchsom (Celovec) in ga 14. 10. 2013 obiskala na njegovem domu. V daljšem, poglobljenem razgovoru je Ernest Fuchs izročil kopije štirih objav in nekaj strani svojih tipkopisov. Sledilo je proučevanje teh gradiv: knjige, iz katerih so objave, smo poiskali v naših knjižnicah, eno knjigo kupili ter poiskali s temi objavami in tipkopisi povezane podatke na spletu.

Na spletu in v slovenskih knjižnicah smo poiskali tudi druge knjige in serijske publikacije, ki poročajo o Janši kot čebelarju in kot prvem učitelju čebelarstva na Dunaju. Proučili smo tudi obe Janševi knjigi, v Arhivu republike Slovenije poiskali ohranjene Glavarjeve rokopise in gradiva zbrali ter uredili v študiji »Pred odhodom na Dunaj naj bi bil Anton Janša na Koroškem? Prvo poročilo.«, ki je objavljena v Digitalni knjižnici Slovenije (dLib).

## 3 KRANJSKO ČEBELARSTVO PRED IN V ČASU ANTONA JANŠE

Že Valvasor (1689) obširno piše o čebelarjenju na Kranjskem in poudarja, da je zelo razširjeno in priljubljeno. V besedilu so opisana tudi nekatera dogajanja, povezana s čebelami – recimo o rojenju. Rihar (1998) poroča, da je med študijskem bivanjem na poskusni čebelarški postaji Montlavet pri Avignonu ob študiju strokovnih piscev iz 16., 17. in 18. stoletja v njihovi bogati knjižnici spoznal, da v 18. stoletju nobena Evropejcem znana dežela ni imela tako izdelanega načina čebelarjenja, kot je

bilo čebelarstvo na Gorenjskem. Naprednost takratnega kranjskega čebelarjenja naj poudarimo s primerom oprave matice v zraku, kar so poznali že stari gorenjski čebelarji in ga je kot prvi na svetu opisal Scopoli (1763). O prahi matice so pisali tudi Peter Pavel Glavar (1768), Furlan (1768/1771 (?)) in Hummel (1773) ter Janša (1771, 1775). Opozarjamo še na študijo »Kratek pregled čebelarstva zgodovine do 21. stoletja«, ki jo je objavil Gregori (2011), kjer podrobneje opisuje tudi kranjsko čebelarstvo pred in v času Antona Janše. Napredno kranjsko čebelarstvo je poznal in priznal tudi Schirach (1770), ki je v svoji knjigi zapisal: »Ausländer, die solche beträchtliche Summen aus ihrem Bienen lösen, müssen unsere Lehrmeister werden (prevod: Tujci, ki imajo od svojih čebel tako veliko koristi, morajo postati naši učitelji):«

## 4 ANTON JANŠA V LETIH 1765–1766 – OBJAVE IN ZAPISI, POVEZANI S KOROŠKO

Poleg zapisov o povezanosti Antona Janša s Koroško, ki jih je posredoval Ernest Fuchs (2013), smo našli še druge objave, ki jih predstavljamo skupaj po letih:

1829

- Ehrenfels: ... Auch die von Janscha aus seiner Vaterlande Kärnthen übertragene Bienenpflege in hölzernen Lagerstöcken ... Janscha, der ein Kärnther war ...  
(Prevod: tudi od Janše iz njegove domovine Koroške preneseno gojenje čebel v lesenih panjih... Janša je bil Korošec...)

1832

- Heinrich (a,b): ... Der Professor und Schriftsteller über die Bienenzucht in Wien ist von dieser Gesellschaft ausgegangen ...  
(Prevod: ... profesor in pisatelj o čebelarstvu na Dunaju je izhajal od te družbe (Koroške)... – (v dveh objavah)
- Wiener Zeitung: ... Eine Bienenzucht wurde jedoch im Augarten als Schule und dabei ein eigener Professor, in der Person des Hrn. Janscha aus Kärnthen ... Janscha wählte die in seinem Vaterlande Kärnthen üblich gewesene Art Bienen zu vermehren...  
(Prevod: ... čebelarstvo je vendarle v Augartnu kot šola in pri tem lastni profesor, v osebi gospoda Janše s Koroške ... Janša je izbral v svoji domovini Koroški način razmnoževanja čebel ...)
- Economische Neuigkeiten: ... Eine Bienenzucht wurde jedoch im Augarten als Schule und dabei ein eigener Professor in Person des Herrn Janscha aus Kärnthen angestellt... Janscha wählte

die in seinem Vaterlande Kärnthen üblich gewesene Art, Bienen zu vermehren, zu benützen und zu erhalten, hatte zugleich den in Kärnthen gangbaren, aber besonders für die Wanderzucht um Wien nicht anwendbaren hölzernen Lagerstock ...

(Prevod: ... čebelarstvo je vendarle v Augartnu kot šola in pri tem nastavljen lastni profesor, v osebi gospoda Janše s Koroške ... Janša je izbral v svoji domovini Koroški način razmnoževanja čebel, za uporabo in ohranjanje, istočasno na Koroškem uporabljene lesene panje, posebej za pašno čebelarjenje, ki na Dunaju niso v rabi ...)

1833

- Blätter für Landwirtschaft .... den in Kärnthen wegen seiner zweckmässig, und in Bezug auf die damalige Zeit rationel betriebenen Bienenzucht, rühmlichst bekannten Herrn Janscha, als professor der Bienenzucht und als practischen Bienenzüchter nach Wien berief ...

(Prevod: ... zaradi svoje smotrnosti in za tisti čas racionalnega čebelarstva na Koroškem so slavnega in poznanelega gospoda Janšo poklicali na Dunaj kot profesorja za čebelarstvo in praktičnega čebelarja ...)

1853

- Heinrich: Isti zapis kot leta 1832

1867

- Kraft: ... Als erster Lehrer an die von Maria Theresia gegründete Hauptlehrschule für Bienenzucht im Belvedere zu Wien wurde Anton Janscha aus Kärnten berufen ...

(Prevod: ... Za prvega učitelja za od Marije Terezije ustanovljene glavne šole za čebelarstvo v Belvedere je bil poklican gospod Janscha s Koroške ...)

1925

- Perc (a,b): ... Nasprotno pa baron Ehrenfels, ki v svoji znameniti knjigi od leta 1829 Janšo dosledno Korošca imenuje ...

1955

- Stabej:

Na navedenem mestu, str. 72, kjer opisuje na kratko prizadevanje Kmetijske družbe v Celovcu za razširjanje čebelarstva, je zapisal Hermann še tole, nam novo, a z ničemer podprto trditev: *Professor in pisatelj o reji čebel na Dunaju, Janša, je izšel iz te družbe. (Izviriak: ... der Professor und Schriftsteller über die Bienenzucht in Wien, Janscha, ist von dieser Gesellschaft ausgegangen.)*

2003

- Erker: ... Professor und Schriftsteller der Bienenzucht in Wien namens Janscha, der aus der Kärntner Gesellschaft kam...

(Prevod: ... profesor in pisatelj o čebelarstvu na Dunaju po imenu Janša prihaja iz Koroške družbe ...)

2013

- Fuchs: ... Der spätere Bienenlehrer Janscha aus Krain stammend kam bereits 1765 in der Ackerbaugesellschaft nach Klagenfurt, lernte hier gut deutsch und wurde von dieser Gesellschaft der Kaiserin direkt empfohlen. Mit ihm begann die Kaiserin das imkerliche Lehr- und Bildungswesen systematisch aufbauen ...

(Prevod: ... poznejši učitelj čebelarstva Janša, ki izvira iz Kranjske, je prišel že 1765 v kmetijsko družbo v Celovec, tu se je naučil dobro nemško, ta družba pa ga je neposredno priporočila cesarici. Z njegovo pomočjo je začela cesarica graditi čebelarske učne in izobraževalne ustanove ...)

## 5 PRESOJA OBJAV IN ZAPISOV

Največ zapisov, da je bil Janša na Koroškem, da je Korošec in podobno, izvira od Ehrenfelsa (4) in Heinricha (4). Dva sta Fuchsova, po eden pa Kraftov in iz tedanjega časopisja. Veliko zapisov, ki so predvsem v Fuchsovih tipkopisih, pa ni potrjenih. Odkrili smo, da so še nekateri drugi tipkopisi, katerih avtor je Fuchs, a nam jih ni posredoval, ali pa smo dobili iz njih le posamezne strani, ki so brez navedbe virov. Med zapisi v prejšnjem poglavju so najbolj vprašljivi vsi tisti, ki govore, da je bil Janša Korošec ter da je Janša prinesel na Dunaj koroški način gojenja čebel skupaj s prevozi čebel na pašo in panjem. To je povsem v nasprotju z zapisi v obeh Janševih knjigah (Abhandlung vom Schwärmen der Bienen – 1771 in Vollständige Lehre von der Bienenzucht – 1775), kjer piše o gorenjskem čebelarjenju. Pri opisu čebelarjenja je dobesedno zapisal »Pri nas na Gorenjskem ... (1771, str. 58). Nič in nikjer pa ne omenja, da bi bil pred prihodom na Dunaj na Koroškem. Tega ne omenjata niti Navratil (1883) niti Mihelič (1934), ki sta do sedaj najnatančnejše raziskovala Janševo življenje in delo, tudi v dunajskih arhivih. Ni pa znano, kdo je njega in njegovega brata Lovrenca leta 1766 napolnil na bakrorezno risarsko šolo na Dunaj.

Zanimive rezultate je dal pregled zapisov oz. biografij o Antonu Janši (skupaj 20), ki so bili objavljeni v času od leta 1771 do danes in le v enem je posredni podatek o povezavi Janše s Koroško, v ostalih pa ni nobenega podatka, ki bi potrdil njegovo bivanje in čebelarjenje na Koroškem.

## 6 DOSEDANJE UGOTOVITVE IN PREDLOGI

- a. V knjigah ali revijah ali časopisju je objavljenih skupaj 11 zapisov ter dodatno še ena trditev v tipkopisu, da je bil Janša povezan s Koroško.
- b. Objave sporočajo, da je Anton Janša Korošec, da je na Dunaj prenesel koroški način čebelarjenja, da izhaja iz Koroške kmetijske družbe, ki ga je tudi priporočila na Dunaju, da ga je na Dunaj poklicala cesarica Marija Terezija in podobno.
- c. Glavni avtorji večine od teh trditev oz. zapisov so Ernest Fuchs, Ehrenfels in Heinrich.
- d. Med slovenskimi avtorji sta na nekatere od teh zapisov opozorila Perc (1925a,b) in Stabej (1955).
- e. Janša v svojih knjigah piše in poudarja svoje gorenjsko poreklo, gorenjski način čebelarjenja in gorenjski leseni panj ter nikjer ne omenja svojega bivanja in delovanja na Koroškem.
- f. Za nadaljnjo presojo je potrebno pridobiti tudi Fuchsove tipkopise (navedeni so v knjigi Von Maria Theresia zur EU, str. 869) in ga povprašati o izvoru zapisanih informacij. Za dokončno potrditev ali zavrnitev teze pa je potreben pregled arhivskih dokumentov v celovškem deželnem arhivu in v arhivu krško-celovške škofije.

## 7 VIRI

- Blätter für Landwirtschaft und Industrie. 1833. Zweites Heft. Klagenfurt: 175 str.; članek: Ueber die kärntnerische Bienenzucht: 88–98
- Ehrenfels J.M. 1829. Bienenzucht nach Grundsätzen der Theorie und Erfahrung. Erster Theil. Prag : 334 str. [http://books.google.si/books?id=maw1AAAAMAAJ&dq=ehrenfels&hl=sl&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.si/books?id=maw1AAAAMAAJ&dq=ehrenfels&hl=sl&source=gbs_navlinks_s) (29.1.2014)
- Ökonomische Neuigkeiten und Verhandlungen. 1832. Über die Bienenzucht Oesterreich. Ökonomische Neuigkeiten und Verhandlungen. 83: 657–660
- Erker K. 2003. Die Gründung der Kärntner Ackerbaugesellschaft. V: Von Maria Theresia zur EU. Klagenfurt, Verlag des Kärntner Landesarchivs: 44–60
- Fuchs E. 2013. Gradiva ob obisku 14. 10. 2013. Celovec
- Furlan M. 1768/1771 (?). Praktično čebelarstvo ali kratek pouk o čebelah in kako naj se zaradi posebnega dobička in koristi z njimi ravna. Napisano verjetno med leti 1768–1771(?). Iz nemškega rokopisa prevedel in uvodne besede napisal Leopold Debevec. V: Ob 200-letnici pisane besede o slovenskem čebelarstvu. Mencej M. (ur). Ljubljana, Zveza čebelarških društev Slovenije, 1976: 261–317
- Glavar P.P. 1768. Odgovor na predlog za izboljšanje čebelarstva v c. kr. dednih deželah. Prevod Mihelič Stane. V: Anton Janša : slovenski čebelar : njegovo življenje, delo in doba. Mihelič S. (ur). Ljubljana, Čebelarstvo društvo za Slovenijo. 1934: 11–38
- Gregori J. 2011. Kratek pregled čebelarstva zgodovine do 21. stoletja. Ljubljana: 9 str. [http://863.gvs.arnes.si/fck\\_files/image/Dogodki11/TE/zgodovina.pdf](http://863.gvs.arnes.si/fck_files/image/Dogodki11/TE/zgodovina.pdf) (25. jul. 2012)
- Heinrich H. 1832a. Bildungsanstalten. V: Klagenfurt, wie es war und ist. Klagenfurt: 214–239
- Heinrich H. 1832b. I. Klagenfurt, die jetzige Hauptstadt Kärntnes, historisch und topographisch dargestellt. V: Kärntnerische Zeitschrift: 1–21. [https://download.digitale-sammlungen.de/BOOKS/pdf\\_download.pl?id=bsb10011884](https://download.digitale-sammlungen.de/BOOKS/pdf_download.pl?id=bsb10011884) (8. jul. 2014)
- Heinrich H. 1853. Handbuch der Geschichte des Herzogthumes Kärnten in Vereinigung mit den österreichischen Fürstenthümern. II. Band, 2. Heft. Klagenfurt: 423 str. <http://books.google.si/books?id=ZWdAAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=sl#v=onepage&q&f=false> (30. jan. 2014)
- Humel A. 1773. Physische Erfahrung, dass der Weysel wirklich von den Drohnen ausser den Bienenstock befruchtet werde. V: Gemeinnützige Arbeiten der Churfürstl. Sächsis. Bienengesellschaft in Oberlausitz : die Physik und Oeconomie der Bienen betreffend, nebst andern dahin einschlagenden natürlichen Dingen. Erster Band. Berlin in Leipzig: 64–71. [http://reader.digitale-sammlungen.de/de/fs2/object/display/bsb10293787\\_00090.html](http://reader.digitale-sammlungen.de/de/fs2/object/display/bsb10293787_00090.html) (31. dec. 2013)
- Janša A. 1771. Abhandlung vom Schwärmen der Bienen. Wien, 1771, 1774: 140 str. <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-GQIOTNUU> (27. sep. 2013)
- Janša A. 1775. Vollständige Lehre von der Bienenzucht. Wien: 204 str. <http://www.dedi.si/dediscina/401-popoln-nauk-o-cebelarstvu> (8. avg. 2012); Wien, 1790: 204 str. <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-NNKCA1Z6> (27. sep. 2013)
- Janša A. 1906. Popolni nauk o čebelarstvu. Po Jož. Münzbergovi izdaji prestavil za slovenske čebelarje Francišek Rojina, nadučitelj v Šmartnem pri Kranju in urednik Slov. Čebelarja. S 45 podobami. Ljubljana, Slovensko osrednje čebelarstvo v Ljubljani: 139 str. <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-91XPSB31> (29. sep. 2013)
- Kraft Q. 1867. Vom munteren Immenvolk. Allgemeines land- und forstwirtschaftliche Zeitung, 17, 44: 1103–1106
- Navratil I. 1883. Anton Janša, slavni kranjski čebelar. V: Spomenik o šeststoletnici začetka Habsburške vlade na Slovenskem. Ljubljana, Matica Slovenska, 139–166
- Perc M. 1925a. Pri Anton Janševih sorodnikih na Dunaju. Slovenec, 53, 212: 2, 213: 2–3
- Perc M. 1925b. Anton Janscha: erster kaiser. königl. Lehrer der Bienenzucht in Wien: 1775–1925. Celje: 23 str.
- Schirach A.G. 1770. Bayerischer Bienen-Meister: oder deutliche Anweisung zur Bienen-Wartung. München: 244 str. [http://books.google.si/books/about/Bayerischer\\_Bienen\\_Meister\\_oder\\_deutlich.html?id=5Vc7AAAACAAJ&redir\\_esc=y](http://books.google.si/books/about/Bayerischer_Bienen_Meister_oder_deutlich.html?id=5Vc7AAAACAAJ&redir_esc=y) (23. dec. 2014)
- Stabej J. 1955. Stari zapisi o čebelah in čebelarstvu. Slovenski čebelar: 55(1953)6, str. 145–148 in št. 7–8, str. 181–185 in št. 9. str. 232–237 in št. 10, str. 262–266 in št. 11, str. 297–302 in št. 12, str. 321–327 in 56(1954)5–6, str. 133–140 in št. 7–8, str. 188–191 in št. 9–10, str. 238–241 in št. 11–12, str. 286–287 in 56(1955)1–2, str. 30–32 in št. 3–4, str. 83–86 in št. 9–10, str. 224–226 in št. 11–12, str. 269–272. <http://dlib.si> (27. jun. 2014)
- Valvasor J.V. 1689. Čast in slava vojvodine Kranjske (slovenski prevod Die Ehre des Herzogthums Crain; prevod Doris Debenjak in drugi), 4 zv. Ljubljana, Zavod dežela Kranjska, 2009–2013
- Wiener Zeitung. 1832. Über die Bienenzucht Oesterreich. Wiener Zeitung, 228: 913
- Wytopil F. 1900. Die Kaiserl. Königl. Bienenschule in Wien 1770–1781. Bienen-Vater: 32, 6: 109–118

# SUBJECT INDEX BY AGROVOC DESCRIPTORS

## PREDMETNO KAZALO PO DESKRIPTORJIH AGROVOC

Tomaž BARTOL<sup>1</sup>

---

adulteration	31–39	honey bees	31–39, 49–52
agricultural societies	49–52	honey	31–39
animal feeding	31–39	identification	5–12
animal husbandry	13–20	impact assessment	41–47
animal performance	13–20	infectious diseases	41–47
animal tissues	13–20	land races	49–52
apiculture	31–39, 49–52	location	49–52
apis mellifera	31–39, 49–52	losses	41–47
bee colonies	31–39	methane emission	21–29
biofuels	21–29	methane	21–29
biogas	21–29	microbiological analysis	5–12
biographies	49–52	microorganisms	5–12
biomass	21–29	molecular biology	5–12
bovine spongiform encephalopathy	41–47	molecular genetics	5–12
cattle	13–20	new technology	5–12
chickens	13–20	nucleic acids	13–20, 5–12
colour	31–39	organic wastes	21–29
compensation	41–47	polymorphism	13–20
costs	41–47	prion diseases	41–47
education	49–52	provenance	49–52
evaluation	41–47	quality	31–39
food adulteration	31–39	rna	13–20, 5–12
fuel crops	21–29	sheep	13–20
fungi	5–12	surveys	41–47
gene expression	13–20	swine	13–20
genomics	5–12	teachers	49–52
greenhouse effect	21–29	traditional technology	49–52
history	49–52	yeasts	31–39
hives	49–52		

---

<sup>1</sup> Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac, Dept. of Agronomy, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: tomaz.bartol@bf.uni-lj.si





# SUBJECT INDEX BY AGRIS CATEGORY CODES

## VSEBINSKO KAZALO PO PREDMETNIH KATEGORIJAH AGRIS

Nataša SIARD<sup>1</sup>

---

Production economics – E16	41–47
Animal husbandry – L01	49–52
Animal feeding – L02	31–39
Animal genetics and breeding – L10	13–20
Animal diseases – L73	41–47
Renewable energy resources – P06	21–29
Food composition – Q04	31–39

---

<sup>1</sup> Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Dept. of Animal Science, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, e-mail: natasa.siard@bf.uni-lj.si



## ABECEDNO KAZALO AVTORJEV AUTHOR'S INDEX

Št. No.	Avtor Author	Stran primarnega prispevka Page of the primary source
1.	BARTOL Tomaž	53
2.	BOŽIČ Janko	31–39
3.	DOVČ Peter	49–52
4.	GREGORI Janez	49–52
5.	KANDOLF BOROVSŠAK Andreja	31–39
6.	KOREN Simon	5–12
7.	KOROŠEC Mojca	31–39
8.	KOVAČ Minka	5–12
9.	KOŽELJ Anton	49–52
10.	KUNEJ Tanja	13–20
11.	LILEK Nataša	31–39
12.	MARINŠEK LOGAR Romana	21–29
13.	NOČ Boštjan	31–39
14.	NOVAK Neža	21–29
15.	OGRINC Nives	31–39
16.	POGOREVC Neža	13–20
17.	POSPÍŠIL Richard	41–47
18.	SIARD Nataša	55
19.	ŠALEHAR Andrej	49–52
20.	TOPLAK Nataša	5–12
21.	VODOVNIK Maša	21–29
22.	ZORC Minja	13–20



# NAVODILA AVTORJEM

## PRISPEVKI

Sprejemamo izvirne znanstvene članke, predhodne objave in raziskovalne notice s področja zootehnike (genetika, mikrobiologija, imunologija, prehrana, fiziologija, ekologija, etologija, mlekarstvo, ekonomika, bioinformatika, živalska proizvodnja in predelava živalskih proizvodov, tehnologija in dokumentalistika) v slovenskem in angleškem jeziku, pregledne znanstvene članke pa samo po poprejšnjem dogovoru. Objavljamo tudi prispevke, podane na simpozijih, ki niso bili v celoti objavljeni v zborniku simpozija. Če je prispevek del diplomskega, magistrskega ali doktorskega dela, navedemo to in tudi mentorja v sproti opombi na dnu prve strani. Navedbe morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku.

Pri prispevkih v slovenskem jeziku morajo biti preglednice, grafikon, slike in priloge dvojezični, povsod je slovenščina na prvem mestu. Naslovi grafikonov in slik so pod njimi. Preglednice, slike in grafikon so v besedilu. Grafikon morajo biti črno-beli. Latinske izraze pišemo ležeče. V slovenščini uporabljamo decimalno vejico, v angleščini decimalno piko.

Prispevki naj bodo strnjeni, kratki, največ 12 strani, napisani z urejevalnikom besedil in oddani v doc ali rtf formatu (Windows). Izgled strani naj bo čim bolj enostaven; v besedilo ne vstavljajte glave in noge. Pisava v besedilu in preglednicah je Times New Roman, velikost črk 12, v obsežnih preglednicah je lahko 10, pisava v grafikonih in slikah je Ariel, velikost črk najmanj 8, pisava za primerjave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij je Courier; zunanji rob 2,0 cm, notranji 2,5 cm.

## PRVA STRAN

Na prvi strani prispevka na desni strani označimo vrsto prispevka, sledi naslov prispevka, pod njim avtorji. Ime avtorjev navedemo v polni obliki (ime in priimek). Vsakemu avtorju dodamo sproti opombo, ki je vidna na dnu strani, in vsebuje polni naslov ustanove ter znanstveni in akademski naslov; vse v jeziku prispevka. Navedemo sedež ustanove, kjer avtor dela. Če je raziskava opravljena drugje, avtor navede tudi sedež te inštitucije. Na željo avtorjev bomo navedli naslov elektronske pošte.

Pod imeni avtorjev je datum prispetja in datum sprejetja prispevka, ki ostaneta odprta. Sledi razumljiv in poveden izvleček v enem odstavku (skupaj s presledki do 1400 znakov). Vsebuje namen in metode dela, rezultate, razpravo in sklepe. Sledijo ključne besede.

Izvlačku v jeziku objave sledi naslov in izvleček s ključnimi besedami v drugem jeziku.

## VIRI

V besedilu navajamo v oklepaju avtorja in leto objave: (priimek, leto). Če sta avtorja dva, pišemo: (priimek in priimek, leto), če je avtorjev več, pišemo: (priimek in sod., leto). Sekundarni vir označimo z »navedeno v« ali »cv.«.

Seznam virov je na koncu prispevka, neoštevilčen in v abecednem redu. Vire istega avtorja, objavljene v istem letu, razvrstimo kronološko z a, b, c. Primer: 1997a. Nekaj primerov navajanja virov:

Vodovnik M., Marinšek-Logar R. 2008. Način delovanja in učinki probiotikov v prehrani živali. *Acta agriculturae Slovenica*, 92, 1: 5–17

- Fraser A.F., Broom D.M. 1990. Farm animal behaviour and welfare. London, Bailliere Tindall: 437 str.
- Hvelplund T. 1989. Protein evaluation of treated straws. V: Evaluation of straws in ruminant feeding. Chenost M., Reiniger, A. (ur.). London, Elsevier Applied Science: 66–74
- Žgajnar J., Kermauner A., Kavčič S. 2007. Model za ocenjevanje prehranskih potreb prežvekovalcev in optimiranje krmnih obrokov. V: Slovensko kmetijstvo in podeželje v Evropi, ki se širi in spreminja. 4. konferenca DAES, Ljubljana, 8.–9. sep. 2007. Kavčič S. (ur.). Domžale, Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije: 279–288
- ISO 5534 / IDF 4. Cheese and processed cheese – Determination of the total solids content – Reference method. 2004: 1–7
- Frajman P., Dovč P. 2004. Milk production in the post-genomic era. *Acta agriculturae Slovenica*, 84, 2: 109–119. <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/84-2004/PDF/84-2004-2-109-119.pdf> (15. mar. 2009)

Prispevke recenziramo in lektoriramo. Praviloma pošljemo mnenje prvemu avtorju, po želji lahko tudi drugače. Če urednik ali recenzenti predlagajo spremembe oz. izboljšave, vrne avtor popravljeno besedilo v 10 dneh v natisnjem in elektronskem izvodu. Ko prvi avtor vnese še lektorjeve pripombe, odda popravljeno besedilo v natisnjem in elektronskem izvodu.

Pri oddaji končne verzije avtor priloži jasno označene izvornike slik (ločene grafične datoteke ali fotografije). Datoteke slik poimenuje enako kot v tekstu (npr. Slika1.jpg, Slika2.eps, Slika3.bmp ...). Originalne fotografije na avtorjevo željo vrnemo. Vektorske slike sprejemamo samo v eps (Encapsulated Postscript) formatu, s tekstom, ki je spremenjen v krivulje. Rasterske slike morajo biti v enem od običajnih formatov (npr. tiff, jpg, bmp). Ločljivost naj bo vsaj 300 dpi.

Prispevke sprejemamo vse leto.

## ODDAJA

Avtorji prispevke oddajo v natisnjem in elektronskem izvodu. Priložijo tudi izjavo s podpisi vseh avtorjev, da avtorske pravice v celoti odstopajo reviji.

# NOTES FOR AUTHORS

## PAPERS

We publish original scientific papers, preliminary communications and research statements on the subject of animal science (genetics, microbiology, immunology, nutrition, physiology, ecology, ethology, dairy science, economics, bioinformatics, animal production and food processing, technology and information science) in Slovenian and English languages while scientific reviews are published only upon invitation. Reports presented on conferences that were not published entirely in the conference reports can be published. If the paper is part of BSc, MSc or PhD thesis, this should be indicated together with the name of the mentor at the bottom of the front page and will appear as foot note. All notes should be written in Slovenian and English language.

Papers in Slovenian language should have tables, graphs, figures and appendices in both languages, Slovenian language being the first. Titles of graphs and figures are below them. Figures and graphs are part of the text. Clearly marked original figures should be added (photographs or separate graphic files); they can be returned upon request. Latin expressions are written in italics. Decimal comma is used in Slovenian and decimal point in English.

The papers should be condensed, short and should not exceed 12 pages, edited with word processor and submitted as doc or rtf file (Windows). Text formatting should be as simple as possible, without headers and footers. Font Times New Roman, size 12 should be used for text and tables (in large tables size 10 is allowed), Ariel should be used for graphs and figures (letter size at least 8) and Courier for nucleic- and amino acid sequence alignments. Right margin is 2.0 cm, left margin 2.5 cm.

## FIRST PAGE

The type of the paper should be indicated on the first page on the right side following by the title of the paper and authors. Full names of the authors are used (first name and surname). Each name of the author should have been added an index, which is put immediately after the author's name and displayed in the footnote. It contains address of the institution and academic degree of the author, in the language of the paper. The address of the institution in which the author works is indicated. If the research was realised elsewhere, the author should name the headquarters of the institution. E-mail is optional.

Under the address of the authors some space for dates of arrival and acceptance for publishing should be left. A comprehensive and explicit abstract in one paragraph (up to 1400 characters, including spaces) follows indicating the objective and methods of work, results, discussion and conclusions. Key words follow the abstract.

The abstract in the language of the paper is followed by the title, abstract and key words in the alternative language.

## REFERENCES

References should be indicated in the text by giving author's name, with the year of publication in parentheses, e.g. (surname, year). If there are two authors, the following form is used: (surname and surname, year). If there are more than two authors, we use (surname *et al.*, year). Secondary sources should be quoted in the form

“cited in”. The references should be listed at the end of the paper in the alphabetical order and not numbered. If several papers by the same author and from the year are cited, a, b, c, etc. should be put after the year of the publication: e.g. 1997a. Some examples:

Simončič M., Horvat S., Stevenson P.L., Bünger L., Holmes M.C., Kenyon C.J., Speakman J.R., Morton N.M. 2008. Divergent physical activity and novel alternative responses to high fat feeding in polygenic fat and lean mice. *Behavior Genetics*, 38, 3: 292–300

Fraser A.F., Broom D.M. 1990. *Farm animal behaviour and welfare*. London, Bailliere Tindall: 437 p.

Hvelplund T. 1989. Protein evaluation of treated straws. In: *Evaluation of straws in ruminant feeding*. Chenost M., Reiniger, A. (eds.). London, Elsevier Applied Science: 66–74

Žgajnar J., Kermauner A., Kavčič S. 2007. Model za ocenjevanje prehranskih potreb prežvekovalcev in optimiranje krmnih obrokov. In: *Slovensko kmetijstvo in podeželje v Evropi, ki se širi in spreminja*. 4. konferenca DAES, Ljubljana, 8.–9. sep. 2007. Kavčič S. (ed.). Domžale, Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije: 279–288

ISO 5534 / IDF 4. Cheese and processed cheese – Determination of the total solids content – Reference method. 2004: 1–7

Frajman P., Dovč P. 2004. Milk production in the post-genomic era. *Acta agriculturae Slovenica*, 84, 2: 109–119. <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/84-2004/PDF/84-2004-2-109-119.pdf> (15. mar. 2009)

## DELIVERY

Papers should be delivered as a printed and electronic copy. A statement signed by all authors transfers copy rights on the published article to the Journal.

Papers are reviewed and edited. First author receives a review if not defined otherwise. If reviewers suggest some corrections, the author should forward them within 10 days in printed and electronic form. After the first author considers the referee's notes, the corrected paper should be sent in printed and electronic form to the Editor.

Submission of the final version must contain properly labelled original figures (separate files or photographs). The figure files should be labelled as they appear in the text (Figure1.jpg, Figure2.eps, Figure3.bmp ...). Original photographs can be returned to the author upon request. Vector graphics have to be in eps (Encapsulated Postscript) format with the text transformed in curves. Raster figures and photos should be in one of common formats (e.g. tiff, jpg, bmp) with at least 300 dpi resolutions.

Papers are accepted all the year.





## Acta agriculturae Slovenica

ISSN 1581-9175 · letnik / Volume 106 · številka / Number 1 · 2015

### VSEBINA / CONTENTS

<i>Simon Koren, Minka Kovač, Nataša Toplak</i> , Who lives in our dishwasher? Preliminar results of fungal metagenomic analysis of household dishwashers / Kdo živi v našem pomivalnem stroju? Preliminarni rezultati metagenomske analize gliv v gospodinjskih pomivalnih strojih .....	5
<i>Neža Pogorevc, Minja Zorc, Tanja Kunej</i> , Raziskave mikro RNA pri govedu, prašičih, ovcah in kokoših / Micro RNA research in cattle, pig, sheep, and chicken .....	13
<i>Romana Marinšek Logar, Neža Novak, Maša Vodovnik</i> , Prispevek bioplinskih naprav v Sloveniji k zmanjševanju toplogrednega učinka iz kmetijskega sektorja / The contribution of Slovenian biogas plants to the reduction of agricultural sector green house emissions .....	21
<i>Andreja Kandolf Borovšak, Nives Ogrinc, Nataša Lilek, Boštjan Noč, Janko Božič, Mojca Korošec</i> , Vpliv krmljenja čebeljih družin na njihovo živalnost in pristnost medu / Influence of feeding bee colonies on colony strenght and honey authenticity .....	31
<i>Richard Pospíšil</i> , The analysis of costs related to bovine spongiform encephalopathy disease occurrence in the czech republic in 2001–2014 / Analiza stroškov, povezanih z bovino spongiformno encefalopatijo v Češki republiki v obdobju 2001–2014 .....	41
<i>Andrej Šalehar, Janez Gregori, Anton Koželj, Peter Dovč</i> , Pred odhodom na Dunaj naj bi bil Anton Janša na Koroškem? / Before going to Vienna could Anton Janša be in Carinthia? .....	49
<i>Tomaž Bartol</i> , Subject index by Agrovoc descriptors / Predmetno kazalo po deskriptorjih Agrovoc .....	53
<i>Nataša Siard</i> , Subject index by Agris category codes / Vsebinsko kazalo po predmetnih kategorijah Agris .....	55
Abecedno kazalo avtorjev / Author's index .....	57
Navodila avtorjem .....	59
Notes for authors .....	61