

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



FORORD

Denne masteroppgaven markerer slutten på min mastergrad i Matvitenskap, retning matvarekvalitet, trygghet og hygiene ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB). Arbeidet med oppgaven ble utført hos Nofima Mat, Ås.

Først og fremst vil jeg takke mine to veiledere på Nofima; hovedveileder Solveig Langsrud og biveileder Even Heir, for god oppfølging, veiledning og verdifulle innspill. Jeg er utrolig takknemlig for all den tid og energi dere har satt av til meg.

Takk til Anette Wold Åsli og Merete Rusås Jensen for all praktisk hjelp på laboratoriet, samt øvrige ansatte ved avdelingen for mikrobiologi mat på Nofima Mat, Ås.

Takk til Bjørn Ivar Vold for korrekturlesing!

Jeg vil også rette en stor takk til min hovedveileder ved UMB, Hilde Marit Østlie, for god oppfølging.

Den aller største takken går til venner, kjæreste og familie for støtte og oppmuntrende ord. Børnen og Basse Mafioso; Tusen takk for all kjærighet og omsorg - dere er fantastiske!!

Ås, juni 2012

Marie Løype

SAMMENDRAG

Intensjonen med oppgaven var å bestemme bakteriefloraen i produksjonsmiljøet for laksefilet og oppnå mer kunnskap om samspill mellom *Listeria monocytogenes* og disse bakteriene i produksjonsmiljøet. Overflateprøver ble samlet inn fra fire lakseslakterier, og bakterieflora identifisert ved 16S rDNA sekvensering med dyrkningstrinn. Floraen på overflater med utilstrekkelig renhold viste generelt høyere diversitet og gjenspeilet bakteriefloraen på råvarene. Ved ordinært renhold var det mindre diversitet, med *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. som dominerende populasjon.

Ved bestemmelse av bakterieflora med 454 pyrosekvensering (uten dyrkningstrinn) ble det observert forskjeller i bakteriesammensetning sammenlignet med bakteriefloraen identifisert med 16S rDNA sekvensering (med dyrkningstrinn). Det ble registrert en mer divers flora og høyere andel Gram-positive bakterier enn ved 16S rDNA sekvensering med dyrkningstrinn.

Valg av isolater fra bakgrunnsfloraen til biofilm-forsøk ble basert på følgende kriterier: 1) Identifisert i prøvepunkt med *Listeria* 2) Dominerende populasjon etter renhold 3) Fant i flere prøvepunkter. Utvalgte isolater ble dyrket opp i laksebuljong med *L. monocytogenes* og *Listeria* sp. i multikultur ved 12 °C (+/- 5 % NaCl) og 20 °C (+/- 5 % NaCl). *Listeria monocytogenes* og *Listeria* sp. ble dyrket opp i duokultur biofilm under samme vekstbetingelser. Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon ble undersøkt ved hjelp av tradisjonelle mikrobiologiske teknikker og 454 pyrosekvensering (ett forsøk).

Siden det var få endringer i celletall ved de ulike vekstbetingelsene i multikultur, ble det ikke funnet noen tydelig sammenheng for betydningen av bakgrunnsflora med hensyn på overlevelse av *L.monocytogenes* i biofilm. Resultatene viste høyere celletall for *L. monocytogenes* i duokultur enn i multikultur og også større effekter av temperatur og salt. Det var lavere celletall av *L.monocytogenes* ved tilgang på salt både ved 12 og 20 °C i duokultur. I multikultur fant man ingen effekt av salt og inkuberingstemperatur på celletall av *Listeria monocytogenes* i biofilm. *Listeria* sp. dominerte i nærvær av salt, og lå stort sett 2 log over *L.monocytogenes* i multikultur ved samtlige betingelser, både i suspensjon og i biofilm. Det ble også registrert høyere celletall for *Listeria* sp. i duokultur, noe som indikerer at *Listeria* sp. (i dette forsøket) har større konkurranseevne enn *L.monocytogenes*.

Resultatene i labforsøkene tyder på at *L.monocytogenes* kan etablere seg på overflater i produksjonsmiljøet med færre konkurrenter tilstede og at konkurranse om næringsstoffer kan føre til at bakterien vokser langsommere. Både i produksjonsmiljø og i labforsøk utgjorde *L.monocytogenes* en liten del av totalfloraen. Det ble vist at det var større sannsynlighet for å finne *L.monocytogenes* på overflater med smuss og fuktighet.

ABSTRACT

The intention of this thesis was to determine the bacterial flora in the production environment for salmon fillets and gain more knowledge about the interaction between *Listeria monocytogenes* and these bacteria. Surface samples were collected from four salmon farms after cleaning, and the bacterial flora identified by 16S rDNA sequencing. The microflora on surfaces with inadequate cleaning showed higher diversity and reflected the microflora of raw materials. After ordinary cleaning, it was less diversity and *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. were the dominant populations. When determining the bacterial flora with 454 pyro-sequencing (without culturing step) it was observed differences in bacterial composition compared to bacterial flora identified by 16S rDNA sequencing (with cultivation step). By using 454 pyro-sequencing without cultivation step, the results show a more diverse flora and a higher proportion of Gram-positive bacteria than 16S rDNA sequencing with the cultivation step.

Selection of microorganism for biofilm experiments was based on the following criteria: 1) Microorganism isolated from the same sample as *Listeria* 2) Dominating microorganisms after cleaning 3) Microorganisms found in several sample points. Selected isolates were grown in salmon broth with *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. in multispecies at 12 °C (+ / - 5% NaCl) and 20 °C (+ / - 5% NaCl). *Listeria monocytogenes* and *Listeria* sp. were grown in dualspecies under the same cultivation conditions. Determination of biofilm and growth in suspension was investigated using traditional microbiological techniques and 454 pyro-sequencing (one experiment).

Since there were few changes in cell numbers of the various growth conditions in the multispecies biofilm, it was no clear correlation of the importance of background flora with respect to the survival of *L.monocytogenes* in biofilm. However, the results show higher cell numbers of *L. monocytogenes* in dualspecies than in multispecies biofilms. It was also observed large variations in cell numbers for *L.monocytogenes* in dualspecies of the various conditions. The results showed lower cell number of *L.monocytogenes* with supply of salt, both at 12 and 20 °C in dualspecies. This was not observed in multispecies biofilms. *Listeria* sp. dominated in the presence of salt, and was generally 2 log higher than *L.monocytogenes* in multispecies at all conditions, both in suspension and in biofilm. The results also show higher cell numbers of *Listeria* sp. in dualspecies, suggesting that *Listeria* sp. (in this study) are more competitive.

This study indicates that *L.monocytogenes* grows better on surfaces in production environment with fewer competitors present and that competition for nutrients may cause the bacteria grow more slowly. In the production environment and in laboratory experiments *L.monocytogenes* constituted only a small fraction of the total flora. It was more likely to find *L.monocytogenes* on soiled or humid surfaces.

INNHold

1. INNLEDNING	1
2. TEORI	2
2.1 Naturlig bakterieflora hos fisk	2
2.2 Slekten <i>Listeria</i>	5
2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.2.2 Listeriose	6
2.2.3 Virulens	7
2.3 Forekomst av <i>Listeria monocytogenes</i> i akvatiske miljøer	8
2.4 Forekomst og overlevelse av <i>Listeria monocytogenes</i> i næringsmidler	9
2.5 Potensielle smitteveier for <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.6 Forebygging av <i>Listeria monocytogenes</i> i produksjonsmiljøet	12
2.6.1 Hygienisk design	13
2.6.2 Vask og desinfeksjon	14
2.7 Resident husflora	17
2.7.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	17
2.7.2 <i>Serratia</i> spp.	18
2.7.3 <i>Acinetobacter</i> spp.	18
2.8 Biofilm	19
2.8.1 Biofilm i næringsmiddelindustrien	22
2.8.2 <i>Listeria monocytogenes</i> i biofilm	23
3. MATERIALER OG METODER	24
3.1 Prøvetaking	24
3.2 Bestemmelse av totalkim i svaberprøver	26
3.3 Identifisering av bakterieflora – 16S rDNA sekvensering	27
3.3.1 PCR (Polymerase kjedereaksjon)	28
3.3.2 Gel-elektroforese	30
3.3.3 Pre-sekvensering	30
3.3.4 Sekvensering	31
3.3.6 Redigering og analyse av sekvenser	32
3.3.7 Lagring av identifiserte bakterieisolater	33
3.4 Bakteriesamfunnsanalyse – 454 Pyrosekvensering	33
3.4.1 DNA isolering av svaberprøver	34
3.4.2 NanoDrop	35

3.4.3 PCR.....	35
3.4.4 Rensing	36
3.4.5 Kvantifisering	37
3.4.6 Fortynning av fragment og sammenslåing.....	38
3.4.7 Emulgering og amplifisering	39
3.5 Biofilm på stål i fuktkammer.....	41
3.5.1 Buljong basert på fersk laks	42
3.5.2 Uttesting av medier/dyrkningsbetingelser for utvalgte bakteriestammer	42
3.5.3 Vekst i suspensjon.....	43
3.5.4 Forkultur	43
3.6. Biofilm-produksjon	44
3.6.1 Multikultur	45
3.6.2 Duokultur	45
3.6.3 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon dag 2, 5 og 10.....	45
3.7 Bakteriesamfunnsanalyse av forforsøk multikultur – 454 Pyrosekvensering	46
4. RESULTATER	47
4.1 Bedriftsbesøk (bedrift B).....	47
4.2 Sammenligning av vekstmedie	50
4.3 16S rDNA sekvensering	53
4.3.1 Rendyrkning.....	53
4.3.2 Bakterief flora på overflater etter utilstrekkelig renhold.....	54
4.3.3 Bakterief flora på overflater etter ordinært renhold	57
4.3.3 Sammenligning av bakterief flora ved ulike renholdsforhold.....	61
4.4 Bakteriesamfunnsanalyse av miljøprøver vha. 454 pyrosekvensering.....	62
4.5 Funn av <i>Listeria monocytogenes</i>	64
4.6 Innledende forsøk til biofilm	65
4.6.1 Laksebuljong.....	65
4.6.2 Uttesting av medier/dyrkningsbetingelser for utvalgte bakterieisolater	66
4.6.3 Forforsøk- bestemmelse av biofilm i multikultur	68
4.6.4 Bakteriesamfunnsanalyse vha. 454 pyrosekvensering av multikultur forforsøk	70
5 Biofilm hovedforsøk	72
5.1 Multikultur.....	72
5.1.1 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 12 °C	72
5.1.2 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 12 °C og 5 % salt	74

5.1.3 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 20 °C	75
5.1.4 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 20 °C og 5 % salt	76
5.1.5 Hovedtrekk – multikultur.....	77
5.2 Duokultur.....	78
5.2.1 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 12 °C.....	78
5.2.3 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 12 °C og 5 % salt.	80
5.2.4 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 20 °C.....	81
5.2.5 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur 20 °C og 5 % salt.....	82
5.2.6 Hovedtrekk - duokultur.....	80
6 DISKUSJON	81
6.1 Renhold.....	81
6.2 Bakteriefloa	83
6.3 Bakteriesamfunnsanalyse av miljøprøver vha. 454 Pyrosekvensering	88
6.4 Biofilm.....	89
6.4.1 Uttesting av medier/dyrkningsbetingelser	89
6.4.2 Forforsøk multikultur.....	90
6.4.3 Laksebuljong som vekstmedie	91
6.4.4 Multikultur	91
6.4.5 Duokultur	93
7. KONKLUSJON	94
8. VIDERE ARBEID	96
9. REFERANSER	97
10 VEDLEGG	103
10.1 Skriftlig vedlegg	103
10. 2 Elektroniske vedlegg (vedlagte Excel og Fasta filer).....	103

1. INNLEDNING

Det foreligger svært få studier på den generelle mikrofloraen på overflater i produksjonsmiljøet for lakseslakterier. Imidlertid er det behov for økt kompetanse på dette området, da enkelte bakterier kan produsere ekstracellulære materialer som polysakkarider, lipider, proteiner og/eller DNA som legger til rette for vekst av patogene bakterier som *Listeria monocytogenes* i produksjonsmiljøet. Kunnskap om mikroflora på overflater er også viktig med tanke på etablering av vaske- og desinfeksjonsrutiner, da enkelte mikroorganismer kan utvikle resistens mot desinfeksjonsmidler og forårsake kontinuerlig kontaminering av råvarer under produksjon.

Risikoen for sykdomsutbrudd gjør at arbeid for en bedret matvarehygiene er et prioritert satsningsområde. En kartlegging av bedriftspraksis i norske laksebedrifter utført av Nofima Mat AS i 2010 viste store forskjeller mellom ulike laksebedrifter ved forekomst av *Listeria*, samt utstyr og rutiner for å unngå bakterien i produksjonsmiljøet. I undersøkelsen ble det avdekket behov for mer kunnskap for å kunne bekjempe kontaminering av *Listeria* under produksjon.

Intensjonen med denne oppgaven er å bestemme bakteriefloraen i produksjonsmiljøet for laksefilet og oppnå mer kunnskap om samspill mellom *L. monocytogenes* og disse bakteriene i produksjonsmiljøet. Hensikten er å studere dynamikken i bakteriesamfunn under forhold som simulerer produksjonsmiljøet i en laksebedrift ved å se på effekt av ytre faktorer som temperatur og salt. Videre er målet å undersøke betydningen av bakgrunnsflora med hensyn på overlevelse av *L. monocytogenes* i biofilm.

Oppgaven er en del av prosjektet ”Tiltak for økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen”, et samarbeid mellom Fiskeri- og havbruksnæringens forskingsfond (FHF), Norske sjømatbedrifters Landsforening (NSL) og Nofima.

2. TEORI

2.1 Naturlig bakterieflora hos fisk

Bakteriefloraen hos fisk er relatert til flere faktorer; blant annet fiskens vekststadie og fordøyelsessystem, vanntemperatur, område, næringstilgang og fiskens fysiologisk tilstand (Zmysłowska et al. 2000). Foreløpig er det svært få studier som tyder på at bakterieflora hos fisk er arts-avhengig. I nyfanget fisk reflekterer floraen snarere hvor rent vannet er (Austin 2002). Fisk i kalde og svært rene farvann har lavere bakterietall enn fisk fra varmere og forurenset vann (Huss et al. 1995). I rene arktiske farvann kan bakterietallet være så lavt som 10 bakterier /cm² (Lynum 2005). Derimot er bakterietall så høyt som 10⁷ CFU/cm² påvist på overflaten hos fisk i varmere og forurenset vann (Huss 1995). Zmysłowska et. al (2001) bekreftet dette gjennom en bakteriologisk undersøkelse av forurenset vann, hvorav bakterietallet på skinn hos fisk reflekterte nivå av forurensing i vannet. Flere studier har også påvist høyere bakterietall i mage-tarmkanalen enn i omkringliggende vann, noe som også indikerer at fordøyelseskanaalen utgjør en gunstig nisje for vekst av mikroorganismer. Selv om det er vanskelig å si noe om opprinnelsen til akvatiske bakterier, er det en utbredt oppfatning om at bakterier i akvatiske miljøer stammer fra jord, regn og utilsiktet introduksjon enten naturlig eller som en konsekvens av menneskelige aktiviteter (Sousa & Silva-Souza 2001).

I følge Lynum (2005) domineres bakteriefloraen i fisk fra nordlige farvann hovedsakelig av psykrofile, Gram-negative stavbakterier fra slektene *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* og *Vibrio*. Psykrofile (kuldeelskende) bakterier kan vokse ved 0 °C, har en optimal veksttemperatur ved 15 °C og maksimal veksttemperatur rundt 20 °C (Huss 1995).

Fisken eksponeres for mikroorganismer til stede i vann og bunnfall. Denne floraen vil influere bakteriefloraen på ytre overflater, inkludert gjeller. Bakterieflora isolert fra egg, skinn, gjeller og tarmer har blitt beskrevet for et begrenset antall fiskearter (Cahill 1990). Det er vist at mange av bakteriene isolert fra skinn og gjeller kun er sporadisk til stede. Bakteriefloraen i slimlaget og skinnen (10² -10⁴ CFU/cm²) er svært beskjeden sammenlignet med antall bakterier i tarmen (10⁸ CFU/cm² heterotrofe og 10⁵ CFU/cm² anaerobe) (Austin 2002). Etter sløyning, vil bakterietallet i gjellene og på overflaten øke. Dette skyldes at fisken blir smittet under prosessering (Lynum 2005).

Gergoala (1958) analyserte bakterievekst på skinn hos torsk i Nordsjøen over en periode på to år og fant at bakteriefloraen bestod av *Pseudomonas* spp. (44 %), *Achromobacter* spp. (32 %), *Corynebacterium* spp. (9 %), *Flavobacterium* spp. (6 %), *Vibrio* spp. (6 %), *Micrococcus* spp. (1 %) og uidentifisert (2 %). Det ble også vist at sammensetningen av bakterier ikke var konstant, men varierte med sesong. *Achromobacter* spp. ble påvist med høyere frekvens om vinteren, mens forekomst av *Pseudomonas* spp. økte på sommeren. I senere undersøkelser av bakteriesammensetning på slimlag og skinn er det gitt liknende resultater som bekrefter årstidsvariasjonene. Dette omfatter medlemmer av *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium/Cytophaga*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* (Hansen & Olafsen 1999), *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Fusarium* og *Bacteroides* (Nayak 2010).

Tarmfloraen til fisk består av aerobe eller fakultativt anaerobe bakterier som blant annet *Aeromonas* spp., *Clostridium sporogenes*, *Clostridium botulinum* (type E) og *Vibrio parahaemolyticus* (Lynum 2005). Bakteriefloreaen synes å være mer variabel enn først antatt, særlig i studier der det er brukt molekylære metoder (Hovda et al. 2012). Sesongvariasjoner som temperaturendringer, bakteriesammensetning og nivå i vannet kan ha innvirkning på den bakterielle sammensetningen i tarmen (Hovda et al. 2012). Hovda et al. (2012) undersøkte bakteriefloreaen i tarm hos Atlantisk laks (*Salmon salar* L.) med hensyn på sesongvariasjoner under en periode på ett år. Temperatur og saltinnhold ble målt daglig. Temperaturen i vannet varierte fra 18,8 °C (august) til 5,5 °C (mars), mens saltinnholdet ble målt til 3 % (oktober) og 2,6 % (mars). Det ble samlet inn fem fisker i måneden fra august til juni. Bakteriefloreaen ble identifisert ved hjelp av molekylære metoder som polymerase kjede reaksjon (PCR) og Denaturerende Gradient Gel Elektroforese (DGGE). Undersøkelsen viste at enkelte bakterier var til stede i tarmen gjennom hele året. De Gram-positive melkesyrebakteriene *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* og *Weisella* spp. ble isolert fra samtlige prøver, mens Gram-negative bakterier som *Vibrio* spp. og *Photobacterium phosphoreum* og Gram-positive *Bacillus* spp. kun var sporadisk til stede. Samtidig mener andre forskere at bakteriefloreaen i tarmfloraen også reflekterer fôrinntak og -sammensetning (Austin 2002; Huss 1995; Ringø et al. 2006). Ringø et al. (2006) undersøkte effekt av diett på bakterieflorea i tarm på atlantisk torsk og observerte en bakterieflorea med dominans av Gram-positive bakterier som *Brochothrix* spp. og *Carnobacterium* spp. ved inntak av fiskemel, mens *Psychrobacter* spp., *Chryseobacterium* spp. og *Carnobacterium* spp. ble isolert fra fisker med en diett basert på soyabønner.

Nivået av sykdomsfremkallende bakterier er forholdsvis lavt men det er nesten alltid mulig å finne sykdomsfremkallende bakterier på fisk som ikke har vært gjennom en bakteriedrepende behandling (Huss & Gram 2004). Noen av disse utgjør en naturlig del av floraen, men fisk som i utgangspunktet er fri for patogene mikroorganismer, kan også kontamineres under transport eller produksjon. Forekomst av patogene mikroorganismer hos prosessert fisk kan deles inn i tre grupper:

Patogene mikroorganismer som vanligvis er vidt distribuert i akvatisk miljø; *Clostridium botulinum* type B, E og F, *Aeromonas* spp. og *Vibrio* spp. (Huss et al. 1995).

Patogene mikroorganismer generelt i miljøet; *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* type A og B, *Clostridium perfringens* og *Bacillus* spp. (Huss & Gram 2004).

Patogene mikroorganismer tilhørende dyre- og menneske reservoaret, og som ikke naturlig er til stede på fisk, men tilføres fisken som et resultat av forurensing under behandling; *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* og *Staphylococcus aureus* (Huss et al. 1995).

2.2 Slekten *Listeria*

Slekten inneholder seks arter; *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, med subspecies *ivanovii* og *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L.welshimeri* og *L. grayi*. *Listeria* er en Gram-positiv, kokkoid og ikke sporedannende stavbakterie. *Listeria* er katalase-positiv, oksidase-negativ og fermenterer glukose. Alle *Listeria*-artene er morfologiske like, men kan skilles ved tester som; hemolyse og syreproduksjon fra D-xylose, L-rhamnose, alpha methyl-D-mannoside, og mannitol. *Listeria* vokser godt på de fleste medier, men veksthastigheten øker ved tilgang på fermenterbart sukker (særlig glukose). Veksten stimuleres av tilstedeværelse av Fe³⁺ og phenylalanine (Ryser & Marth 2007). Av artene er kun *L. monocytogenes* rapportert å gi sykdom hos mennesker. Det er 13 serovarianter av *L. monocytogenes* som kan forårsake sykdom, men 95 % av de humane isolatene tilhører serovariantene 1/2a, 1/2b og 4b (Doyle 1997).

2.2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes er vidt utbredt i miljøet. Den er isolert fra jord, planterester, fôr, vann og kloakk, og både mennesker og dyr kan være friske smittebærere (Rørvik 2008). *Listeria monocytogenes* skiller seg fra andre patogene bakterier ved at den kan tolerere høye saltkonsentrasjoner (opptil 10 %) (Huss et al. 2000). Den har en optimal veksttemperatur på 30-37 °C, men kan vokse i et temperaturområde mellom 1 - 45 °C (Ryser & Marth 2007). *Listeria monocytogenes* kan vokse i et pH intervall mellom 4,5 - 9,5, er fakultativ anaerob og mikroaerofil (Huss et al. 2000).

Bakterien vokser godt på de fleste vanlige laboratoriemedier, og opptrer som regel i form av gråhvite og transparente kolonier. Bakterien er observert i form av enkle kjeder eller arrangert i korte kjeder liggende parallelt i "V-form" eller "Y-form". *Listeria monocytogenes* produserer β-hemolysin som gir utslag som klare soner på blodagar (Ryser & Marth 2007).

2.2.2 Listeriose

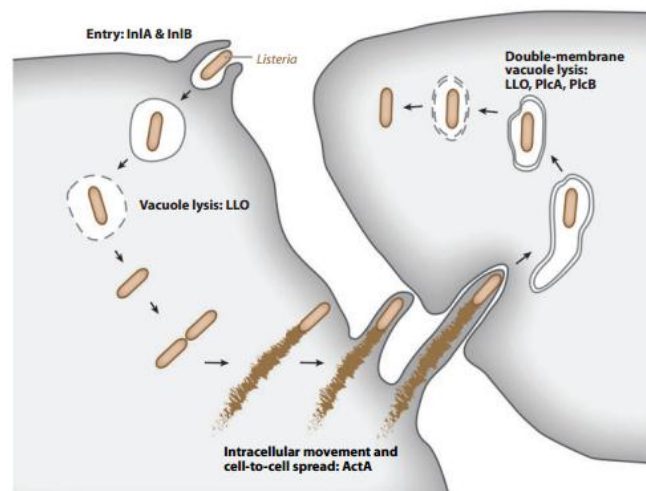
Listeriose er en alvorlig sykdom forårsaket av bakterien *L. monocytogenes* (Tompkin et al. 1999). Sykdom forårsaket av *Listeria* har hatt en gradvis økning i Europa i løpet av de siste årene. En medvirkende årsak kan være økt eksponering av matvarer med *Listeria*, men også bedre diagnostikk og at antall personer i risikogruppen øker. I Norge blir vanligvis 10-30 tilfeller av denne sykdommen rapportert hvert år, hovedsakelig blant personer med redusert immunforsvar. Det er imidlertid usikkert hvor stort det egentlige antallet er, da det kan forekomme mildere tilfeller som ikke blir registrert (Folkehelseinstituttet 2007). Selv om antall tilfeller av listeriose er mye lavere enn sykdom forårsaket av *Salmonella* og *Campylobacter*, er *Listeria* fortsatt et prioritert område innen EU, da den kan forårsake alvorlig sykdom med dødsfall hos utsatte grupper (Folkehelseinstituttet 2011). Personer i risikogruppen er gravide i siste trimester og deres fostre, nyfødte, eldre og personer med nedsatt immunforsvar av ulike årsaker (Tompkin et al. 1999). Underliggende tilstander kan være kreft, diabetes, HIV/AIDS, alkoholisme eller behandling med forskjellige immunsuppressive medikamenter. Symptomer på listeriose kan variere fra en influensalignende sykdom til hjernebetennelse og blodforgiftning. Gravide kvinner med listeriose kan overføre sykdommen til sine fostre uten selv å få merkbare symptomer. Smitte til fostre kan føre til abort, for tidlig fødsel, dødfødsel eller infeksjon hos det nyfødte barnet. Den relativt lave forekomsten av sykdommen tyder på at infeksjonsdosen er høy. Opptil 10^7 - 10^9 CFU/g av bakterien er påvist i smitekilder hvor friske personer har blitt syke. Det antas at infeksjonsdosen er lavere for risikogruppene (Rørvik 2008).

Den alvorligste typen infeksjon forårsaket av *L.monocytogenes* er invasiv listeriose. Denne arter seg som sepsis (blodforgiftning) eller hjernehinnebetennelse. Den andre typen infeksjon forårsaket av *L.monocytogenes* er febril gastroenteritt, og vanlige symptomer er diaré med feber. Inkubasjonstid ved invasiv sykdom er angitt å være omtrent 30 dager, mens inkubasjonstiden for febril gastroenteritt angis til 20 timer. Inkubasjonstiden avhenger sannsynligvis også av infeksjonsdose og mottakelighet hos pasienten (Rørvik 2008).

2.2.3 Virulens

Listeria monocytogenes er en fakultativ intracellulær bakterie, og har dermed evnen til å invadere, overleve og formere seg også i ikke-fagocyterende celler (se figur 1) (Pizarro-Cerdá & Cossart 2009). Ved å oppholde seg inne i celler er mikroben beskyttet mot antistoffenes virkning (Lea 2006), og på denne måten kan bakterien spre seg fra celle til celle. Overflateproteinet internalin (A og B) er ansvarlig for at bakterien trenger inn i ikke-fagocyterende celler, som epitelceller. Bakteriene blir fanget i fagosomet inne i cellen, men frigjøres ved hjelp av listeriolysin O, og formerer seg i cytoplasmaet til korte filamenter som omgir bakterien. Aktinet danner etterhvert en halelignende formasjon, som skyver bakterien fremover. Ved hjelp av pseudopodiellignende utposning kan bakterien komme seg over til nabocellen (Rørvik 2008).

Virulensen hos *L.monocytogenes* er knyttet til hemolysen (listeriolysin O), men enkelte hemolystiske stammer har vist seg å være avirulente. Siden virulente og ufarlige stammer ikke kan skilles ved tradisjonell diagnostikk, betraktes derfor alle *L.monocytogenes* som virulente (Rørvik 2008). Det er antydnet at virulens av *L.monocytogenes* er relatert til veksttemperatur og at virulensen øker ved lavere temperatur. Varmesjokk og andre stressfaktorer skal også ha en betydning for virulensegenskapene til bakterien. I et forsøk hvor bakterien ble utsatt for høy varme (48 °C) i 2 timer, ble listeriolysin O inaktivert. Inkubering av de utsatte bakteriecellene ved 37 °C resulterte i nærmere 40 ganger så høy produksjon av listeriolysin O (Kim et al. 1994; Ryser & Marth 2007).



Figur 1 Virulens hos *L. monocytogenes*

(Pizarro-Cerdá & Cossart 2009; Tilney & Portnoy 1989)

2.3 Forekomst av *Listeria monocytogenes* i akvatiske miljøer

Tabell 1 viser en oversikt over forekomst av *Listeria sp.* og *L. monocytogenes* i ulike akvatiske miljøer. Tabellen viser at *L.monocytogenes* ikke er isolert fra sjøvann, ferskvann, eller hos levende fisk fra oppdrettsanlegg hvor vannet var rent. Til tross for dette ble bakterien ofte påvist på ferdig prosesserte produkter, noe som indikerer kontaminering under prosessering.

Tabell 1 Forekomst av *Listeria* i røkt laks og i det akvatiske miljø

Prøver	Antall		% positive	
	Undersøkelser	Prøver	<i>Listeria spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Bunnfall ferskvann	3	79	20-30	0-17
Sjøvann				
<i>Rent</i>	3	121	0-3	0
<i>Forurenset</i>	3	32	25-52	14-33
Ferskvann				
<i>Bunn</i>	1	24	0	0
<i>Overflatevann</i>	4	236	33-100	0-62
Levende fisk				
<i>Bunn</i>	1	60	21	0
<i>Overflatevann</i>	1	30	3	30
<i>Rent vann</i>	1	30	0	0
Spiseklart produkt-røkt laks	10	986	0-80	0-75

(Huss et al. 1995)

2.4 Forekomst og overlevelse av *Listeria monocytogenes* i næringsmidler

Flere egenskaper gjør at *L.monocytogenes* er en spesiell utfordring i næringsmiddelindustrien. *Listeria monocytogenes* kan vokse både aerobt og anaerobt og ved temperaturer ned til 0 °C, og kan dermed oppformerer i enkelte næringsmidler ved kjølelagring. Bakterien er isolert fra rå kylling, kjøtt, rå fisk, røkt, raket og gravet fisk, skalldyr, grønnsaker, bløtoster, iskrem og varmebehandlet kjøttpålegg (Rørvik et al. 1995). Hovedutfordringen med *L.monocytogenes* er spiseklare produkter med lang holdbarhetstid og som kjølelagres (Rocourt et al. 2000). I slike produkter vil forekomst av *L.monocytogenes* gi opphav til høye kimtall på relativt kort tid (Rørvik et al. 1991). Dette er spesielt et problem i produkter der konkurrerende flora blir drept ved for eksempel varmebehandling og produktet blir smittet før pakking. Det er rapportert at *L. monocytogenes* har en kortere generasjonstid i sjømat (pH 6,1-7,6) enn i andre produkter. Dette skyldes at bakterien har en høyere veksthastighet nær nøytral pH (Gudbjörnsdóttir et al. 2004; Shineman & Harrison 1994).

I de siste årene har tilsynsmyndighetene opplevd økt pågang fra myndigheter i forskjellige eksportmarkeder i forbindelse med påvisning av *L. monocytogenes* i norsk sjømat. Dette gjelder særskilt ved eksport av sjømat til Kina, Russland, USA og andre land med nulltoleranse for *L. monocytogenes*. Tilbakekallelse av produkter etter påvisning av *L. monocytogenes* resulterer i store økonomiske tap for produsentene, og tap av tillit til produkt (Haldorsen et al. 2003).

En landsdekkende undersøkelse utført av Mattilsynet Yndestad og Hauge (2006) viste en forekomst av *L. monocytogenes* i norsk produsert røkelaks på ca. 9 % hvor 1,2 % av prøvene overskred grenseverdien på 100 bakterier/g. Hyppighet av påvisning av *Listeria* økte utover i holdbarhetstiden. Da den sensoriske kvaliteten til røkt laks ikke blir influert av vekst av *L.monocytogenes* er det ikke alltid mulig å vite at produktet inneholder uønskede konsentrasjoner (Rørvik et al. 1991). Det er derfor viktig for enhver bedrift å etablere rutiner i produksjonen som sikrer at det ferdige produktet til enhver tid holder en bakteriologisk standard som tilfredsstillter kundens krav og samtidig gjør det trygt for konsumentene.

Det antydes at *L. monocytogenes* er mer tolerant for stress (salt, vannaktivitet og temperatur) fra omgivelsene enn mange andre bakterier (Ryser & Marth 2007). *Listeria* er en av få patogene bakterier som har evnen til å vokse ved a_w under 0,93. Salting, kaldrøyking og

vakuumpakking vil hemme mange bakterier, men i liten grad *Listeria*. Siden *L.monocytogenes* er en fakultativ anaerob og mikroaerofil bakterie vokser den også godt i vakuumpakninger og modifisert atmosfære (Ryser & Marth 2007).

Flere studier har vist at hovedproblemet er *Listeria* som kommer etter røykeprosessen og ikke *Listeria* fra råvarene, men *Listeria* på råvarene vil også øke faren for *Listeria* i produkt (Huss et al. 1995; Huss et al. 2000). Guðbjörnsdóttir et al. (2004) undersøkte forekomst av *Listeria* i kjøtt-, fiske- og fjærkre bedrifter. Totalt 2522 prøver tatt fra prosesslinjer og miljø, ansatte, råvarer og spiseklare produkter ble analysert for *L. monocytogenes*. Undersøkelsen viste at *L.monocytogenes* ble påvist i høyere frekvens i spiseklare produkter. Basert på gjennomsnittsverdier utgjorde forekomst av *L. monocytogenes* i spiseklare fiskeprodukter 4,8 %.

2.5 Potensielle smitteveier for *Listeria monocytogenes*

Under bearbeiding av råvare til ferdig produkt kan kontaminering forekomme i alle ledd i produksjonen. Smittekilder kan være råvarer, produksjonslokalet, utstyr eller de ansatte. Sannsynligheten for kontaminering under produksjon er høyere i fisk- og fjærkreindustri, noe som trolig skyldes det høye forbruket av vann. Det er vist at *L.monocytogenes* har gode vekstmuligheter i fiske-lakterier med mye blodsøl (Gudbjörnsdóttir et al. 2004). Eksempler på andre kilder til kontaminasjon er gammelt utstyr som er slitt eller vanskelig å demontere og derfor vanskelig å holde rent, samt områder hvor det er vanskelig å komme til for rengjøring, som for eksempel vakuumentstyr, innsiden av maskiner, trange lokaler eller utstyr som er for høyt plassert (Tompkin et al. 1999). Transportbånd utgjør et spesielt kritisk punkt i prosesslinjen. Produktrester kan ofte bli liggende på undersiden eller inneklemt i skjøter og andre trange åpninger (Sundheim 1999). *Listeria* påvises også ofte på kondensflater og i vakuumentstyr hvor drypp og tilbakeslag kan gi smitte til fisken. Sluk og gulv er ikke produktkontaktflater (Langsrud et al. 2010), likevel er dette viktige punkter med tanke på indirekte smitte. Figur 2 viser eksempler på kilder til kontaminering i et produksjonsmiljø.



Figur 2 Eksempler på kilder til kontaminering i et produksjonsmiljø 1) Blodsøl
2) Truck-hjul 3) Transportbånd 4) Kondens over transportbånd 5) Urene sluk og gulv
6) Leddet transportbånd

2.6 Forebygging av *Listeria monocytogenes* i produksjonsmiljøet

Med unntak av varmebehandling og skikkelige vaske- og desinfeksjonrutiner, er det få alternativer som fører til langsiktig eliminasjon av *L. monocytogenes* fra råvarer og utstyr (Huss et al. 2000). Forekomst av *L. monocytogenes* har særlig vært knyttet opp mot utilstrekkelig renhold (CAC 2007). Opptørking, hygienisk design og temperatur kontroll er derfor viktige faktorer i kontroll av bakterien (Tompkin et al. 1999). Bedriften bør overvåke forekomsten av *L. monocytogenes*, og ta ansvar for opplæring av ansatte. Dette innebærer hygieniske tiltak i bedriftene, som å sikre hensiktsmessige, godt vedlikeholdte lokaler og gode arbeidsrutiner for å hindre spredning av bakterien i produksjonsmiljøet. I tillegg bør enhver bedrift sørge for å ha tydelige skiller mellom ren og uren sone for å unngå forurensninger til ferdig prosesserte produkter (CAC 2007). I Norge er godkjenning av slakterier underlagt Fiskeridirektoratet. Kravene til smittehygiene ved fiskeslakterier og tilvirkingsanlegg er nedfelt i "Forskrift om smitteforebyggende tiltak ved fiskeslakterier, tilvirkingsanlegg mv" og har følgende krav:

§ 8. Ren og uren avdeling, avfallssystemer

- Skille mellom ren og uren del, samt mellom avfall og avløp.
- Produksjonslokalene skal ha drenering til eget, lukket avløpssystem.

§ 9. Andre bygningskrav

- Gulv, vegger og tak skal ha overflate som er vanntett, ikke absorberende og lett å vaske og desinfisere. De samme krav stilles til maskiner, arbeidsbord og øvrig utstyr.
- Anlegg skal ha tilstrekkelig rom for omkledding og oppbevaring av arbeidstøy og fottøy. Disse rommene skal ha opplegg for hensiktsmessig vask og personlig renhold.

§ 13. Rengjøring og desinfeksjon

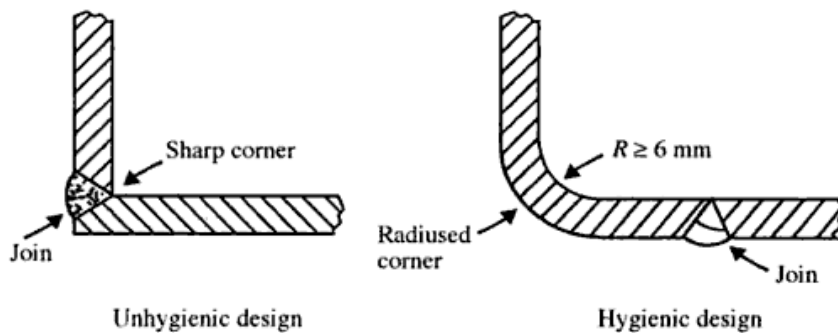
- Produksjonslokaler og redskaper skal rengjøres daglig. Rengjøring og desinfeksjon skal gjennomføres etter fastsatt driftsplan.
- Anleggene pålegges å ha en egenkontroll som kan dokumentere at forskriftens krav blir etterfulgt.

§ 14. Arbeidstøy

- På alle anlegg som § 4 gjelder for skal det benyttes særskilt arbeidstøy, inkl. fottøy. Det er bedriftens ansvar å påse at slikt tøy finnes, samt at det blir regelmessig rengjort. Arbeidstøyet skal ikke brukes utenfor anlegget.

2.6.1 Hygienisk design

En forutsetning for et effektivt rengjøringsprogram er at utstyr og lokalet er designet med tanke på hygiene (CAC 2007). Skarpe hjørner (90°), sprekker, kløfter, pakninger, ventiler og ledd er sårbare punkter for biofilm akkumulering (Chmielewski & Frank 2003; Simões et al. 2010). Med slike forhold kan heller ikke et effektivt hygieneprogram gjøre opp for grunnleggende feil og mangler (Simões et al. 2010). Figur 3 gir en illustrativ forklaring på god og dårlig utforming med tanke på renhold. Slitasje og/eller ruhet gjør også renholdet vanskeligere. Chaturongkasumrit et. al (2011) undersøkte betydningen av ruhet på polyurethane- og polyesterbånd, med tanke på *L.monocytogenes* evne til å danne biofilm. Ved redusert ruhet avtok evnen til å danne biofilm. Resultater fra studiet indikerte også at overflateruhet hadde betydning for vask og desinfeksjon.



Figur 3 Eksempel på uhygienisk og hygienisk utforming av hjørne (Lelieveld et al. 2003)

Overflater i kontakt med råvarer bør være laget av giftfritt, ikke porøst, ikke absorberende og rustfritt materiale (Banwart 1989). Et hygienekrav til utstyr i næringsmiddelindustrien er at utstyr skal være bestandig mot korrosjon. Utstyr som er korrodert vil lettere kunne gi oppsamling av smuss og kan dermed være en kilde til kontaminering. Det mest praktiske materialet er rustfritt stål, da materialet kan behandles med mekanisk sliping, børsting, pussing og mekanisk polering uten å ta skade (Simões et al. 2010). Rustfritt stål beskyttes mot korrosjon på grunn av en selvreparerende overflatefilm, bestående av kromoksid. Når denne filmen brytes ned ved vask, kan kontakt med oksygen føre til at filmen gjenopprettes (Banwart 1989). Plast må være fritt for frie-fenoler, formaldehyd eller andre substanser som kan overføres til råvaren og endre kvaliteten.

2.6.2 Vask og desinfeksjon

Vask og desinfeksjon av anlegg og utstyr er viktige og nødvendige tiltak for å redusere risikoen for spredning og kontaminering av patogene bakterier eller andre uønskede bakterier, som for eksempel forringelsesbakterier (Gram et al. 2007). Bakterier innkapslet i ekstracellulære forbindelser er motstandsdyktige mot ytre påvirkning som for eksempel desinfeksjon. Daglig vask og desinfeksjon med god opptørking kan redusere dette problemet (Gudbjörnsdóttir et al. 2004). Det er vanlig å lage en detaljert renholdsplan som beskriver hva som skal rengjøres, når det skal rengjøres og hvordan renholdet skal utføres. I tillegg bør anlegget ha en renholdsmetode som beskriver en generell framgangsmåte for vask og desinfeksjon av utstyr. Minstekravet til renhold er at det er synlig-, kjemisk- og mikrobiologisk rent (Sundheim 1999). Da smuss kan redusere kontakten mellom desinfeksjonsmiddelet og eventuelle mikroorganismer, bør anlegg og utstyr være grundig rengjort før desinfeksjon (Simões et al. 2010).

Vask

Hovedhensikten med vask er å fjerne smuss. Prosessen innebærer ikke direkte drap av mikroorganismer, men vil som regel redusere forurensningen ved at mikrober fjernes mekanisk. Den kjemiske vaskeeffekten avhenger av faktorer som smusstype, type underlag smusset er festet til, bakterieflora, vannkvalitet, temperatur, konsentrasjon av vaskeløsningen, pH, og kontakttiden til den tilsmussede overflaten (Gram et al. 2007). Det finnes flere vaskemetoder i næringsmiddelindustrien. Eksempler på metoder er skumvask, skumlegging, trykkvask og CIP-vask. Skumvask benyttes på utilgjengelige områder og der en ønsker å redusere volumet av vaske- og skyllemedium. Skumlegging brukes på flater der skummet kan ligge og ha en viss virkningstid. Trykkvask benyttes til rengjøring av grovere forurenset gulv, maskiner og utstyr. Metoden kan forårsake mekanisk slitasje på mindre robust utstyr og må brukes med stor forsiktighet. En annen ulempe med trykkvask er muligheten for at forurensningene spres til andre steder i anlegget på grunn av det høye trykket (Tompkin et al. 1999). Sirkulasjonsvask (CIP-vask) brukes oftest i lukkede systemer beregnet for flytende materialer. En stor fordel med CIP-vasken er at den kan benyttes uten at utstyret må demonteres på forhånd og man kan bruke sterkere rengjøringskjemikalier (Sundheim 1999).

Generelle punkter i et vaskeprogram:

- Oppsamling av råvarerester og produktrester minsker faren for tette sluk og reduserer utslipp av organisk stoff.
- Forskylling for å fjerne løst smuss og bløtlegge smuss som sitter godt fast. Temperaturen bør ikke overstige 40 - 50 °C, da høy temperatur fører til denaturering av proteiner, slik at de fester seg til overflaten.
- Resterende smuss fjernes ved hjelp av kjemiske og mekaniske krefter.
- Vaskemiddel- og smussrester fjernes ved skylling.
- Fjerne overflødig vann, da gjenværende mikroorganismer kan oppformeres på fuktige områder. Opptørkingshastigheten avhenger av ventilasjon og romtemperatur (Sundheim 1999).

Siden smuss kan danne ulike typer bindinger til ulike materialer, er det viktig å kjenne til forurensingens sammensetning når man skal velge vaskemiddel og vaskemetode. Moderne vaskemidler er sammensatt av flere komponenter; alkalisk middel eller syre, tensider, vannforbedrere, korrosjonshemmere og andre kjemikalier som stabiliserer eller hindrer skum og danner gel. De alkaliske vaskemidlene brukes generelt til å fjerne organisk smuss. Sterkt alkaliske midler egner seg gjerne til å løse fett og protein som er brent fast. Nøytrale midler brukes helst til håndvask og lette vaskejobber. Sure vaskemidler løser resterende mineralbelegg, men virker dårlig på fett og protein. I forurensinger som fett er grenseflatespenningen mot vann spesielt stor, og det er i slike tilfeller at tensidene er spesielt viktige. Tensider emulgerer olje ved at den lipofile delen løses i oljen og den hydrofile delen ut mot vannet. Det finnes mange ulike tensider med svært ulike skum- og vaskeegenskaper. De viktigste oppgavene er å redusere overflatespenning slik at smusset fuktes, finfordele olje og flytende fett slik at det stabiliseres i vannfasen, stabilisere smusset i vannfasen slik at det kan skylles vekk, og danne skum, stabilisere eller hindre skum (Sundheim 1999).

Desinfeksjon

Hensikten med en desinfeksjonsprosess er å redusere levedyktige mikroorganismer og hindre mikrobiell vekst på overflater (Dosti et al. 2005; Simões et al. 2010). Desinfeksjon kan utføres ved hjelp av varme og kjemiske midler (Simões et al. 2010). Effekten av desinfeksjonen avhenger av vask, overflatetype, slitasje, konsentrasjon, temperatur, vannkvalitet og eventuelle vannrester som kan fortynne desinfeksjonsmidlet, samt egenskapene til de mikroorganismene man ønsker å eliminere (Simões et al. 2010; Sundheim 1999). De viktigste desinfeksjonsmidlene er de oksidative (klorbaserte, pereddiksyre), tensidbaserte (kvarternære ammoniumforbindelser, amfotære forbindelser) og alkoholer (etanol) (Møretrø et al. 2012). Klor inngår som den aktive komponenten i en rekke desinfeksjonsmidler. Hypokloritt foreligger som udisosiert syre (HOCL) med fire OCL-ioner i en pH- avhengig likevekt. Hypokloritt reagerer med organiske smuss, særlig med proteiner. Bakterier blir vanligvis ikke resistente ovenfor klor, men det er vist at bakterier kan omgi seg med et slimlag som beskytter mot klor (Mead et al. 1989). Kvarternære ammoniumforbindelser er svært populære i næringsmiddelbedrifter da midlene er lite korrosive, lite toksiske for mennesker og enkle å bruke. Ulempen er imidlertid at Gram-negative bakterier kan være resistente mot midlene. Denne egenskapen kan øke betraktelig hvis bakteriene overlever kontakten (Hegstad et al. 2010). For å hindre utvikling av resistens bør det veksles mellom bruk av oksiderende middel og kvarternære ammoniumforbindelser (Sundheim 1999). Pereddiksyrepreparater som hydrogenperoksid, pereddiksyre og pulver basert på persulfat er svært effektive som desinfeksjonsmidler, og påvirkes ikke av organisk materiale i like stor grad som hypokloritt og overflateaktive desinfeksjonsmidler gjør. Peroksidforbindelser spaltes effektivt til vann, eddiksyre og oksygen og er derfor miljøvennlige. Pereddiksyremidlers drapeseffekt på sporer avhenger av konsentrasjon, temperatur og virketid (Sundheim 1999).

2.7 Resident husflora

Økt bruk av desinfeksjonsmidler vil gi et større seleksjonspress og dermed høyere sannsynlighet for oppblomstring av resistente og multiresistente bakterier (Langsrud et al. 2003a). Bakterier isolert etter desinfeksjon viser seg å ha oppnådd høyere resistens og representerer et større problem enn bakterier som isoleres før desinfeksjon (Langsrud & Sundheim 1997). Generelt tåler Gram-negative bakterier bedre kvarternære ammoniumforbindelser, mens Gram-positive stafylokokker ofte tåler mer klor (Sundheim 1999).

Når man identifiserer mikroorganismer som har overlevd renhold, finner man ofte *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. og *Staphylococcus* spp. samt ulike typer gjær (Langsrud et al. 2003a). I produksjonsmiljøet for laks er det imidlertid ikke så vanlig å finne en større andel *Staphylococcus*, da disse trives bedre i tørt miljø med høyere temperatur (Langsrud 2012). Bagge-Ravn et al. (2003) undersøkte den mikrobielle floraen på overflater i fire ulike fiskebedrifter, under produksjon og etter vask- og desinfeksjon. Hovedsakelig ble mikroorganismer man vanligvis finner hos fisk, også isolert fra produksjonsmiljøet under produksjon. Dominerende populasjon etter vask- og desinfeksjon viste seg å være ulike stammer fra familien *Pseudomonadaceae*, samt gjær.

2.7.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. er en Gram-negativ aerob eller fakultativ anaerob stavbakterie tilhørende familien *Pseudomonadaceae*. Stavene er rette eller svakt buede og 1,5 til 5,0 µm i lengde. Bakterien er bevegelig, og har en eller flere polare flageller avhengig av art (Willey 2009). *Pseudomonas* spp. er ofte isolert fra overflateutstyr i produksjonsmiljøer og er en viktig forringelsesbakterie (Langsrud et al. 2003a). Spesielt er *Pseudomonas fluorescens* viktig ved forringelse av matvarer som melk, kjøtt, egg og sjømat. Dette skyldes at stammene kan vokse ved 4 °C og degraderer lipider og proteiner (Willey 2009). Overlevelsessevne kan relateres til bakteriens egenskap til å danne biofilm (Hood & Zottola 1997; Langsrud et al. 2003a). *Pseudomonas* spp. produserer rikelig mengder ekstracellulære substanser og har vist seg å feste seg godt til overflater av rustfritt stål (Barnes et al. 1999; Chmielewski & Frank 2003).

2.7.2 *Serratia* spp.

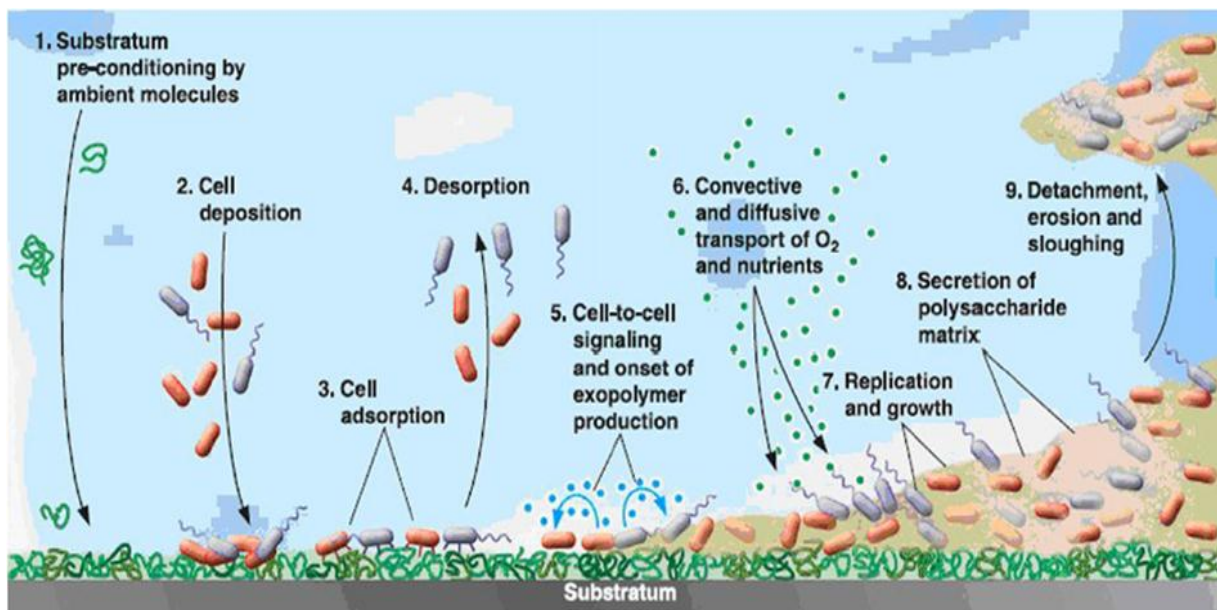
Serratia spp. er en Gram-negativ, fakultativ anaerobe, kjemoorganotrof stavbakterie (0,9 -2 µm lang og 0,5 – 0,8 µm i diameter) tilhørende familien *Enterobacteriaceae*. De fleste av artene har flageller og er bevegelige. Bakterien forekommer vidt spredt i miljøet og er isolert fra vann, jord og planter. *Serratia* spp. er også isolert fra en rekke råvarer og er i likhet med *Pseudomonas* spp. en viktig forringelsesbakterie. I tillegg er bakterien i stand til å kolonisere mange ulike overflater som for eksempel tarmen hos smånagere, insekter, fisk og mennesker (Van Houdt et al. 2007) og kan ha høy resistens mot desinfeksjonsmidler (Langsrud et al. 2003b).

2.7.3 *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter tilhører familien *Neisseriaceae*. Bakterien er en Gram-negativ, aerob, oksidase-negativ, katalase-positiv, ikke-fermentativ og ikke-sporedannende kokk (Bergogne-Berezin & Towner 1996; Towner 2006; Vaneechoutte et al. 2011). *Acinetobacter* spp. tåler uttørking godt, og det er rapportert at bakterien kan overleve på tørre overflater i lenger tid enn *Staphylococcus aureus* (Bergogne-Berezin & Towner 1996). I motsetning til *Pseudomonas* spp. har *Acinetobacter* spp. ikke flageller. Bakterien forekommer vidt spredt i miljøet; jord, kloakk, vann og er ofte en del av den naturlige hudfloraen hos friske mennesker. *Acinetobacter* spp. er isolert fra en lang rekke matvarer som kylling, gris, fisk, melkeprodukter og grønnsaker. Selv om bakterien ofte finnes i råvarer regnes den ikke som en viktig forringer (Towner 2006). Flere studier har vist klare forskjeller på arter isolert fra næringsmidler og klinisk industri, hvorav *Acinetobacter iwoffii* og *Acinetobacter johnsonii* er isolert fra overflater i næringsmiddelindustrien (Towner 2006).

2.8 Biofilm

Biofilm kan defineres som et eget mikrobielt samfunn knyttet til en overflate. De ulike artene organiserer seg slik at de kan utnytte hverandres egenskaper og bygge strukturer som gjør dem motstandsdyktige i miljøet (Veterinærinstituttet 2009). Selve prosessen er dynamisk og involverer transport av organiske- og uorganiske molekyler, mikrobielle celler til overflaten, adsorpsjon og til slutt irreversibel feste som følge av produksjon av ekstracellulære polysakkarider (Beech 2004; Vu et al. 2009). Prosessen er illustrert i figur 4 og beskrevet i påfølgende tekst.



Figur 4 Biofilm dannelse 1) Organisk materiale festet til overflaten 2) Transport av planktoniske celler til overflaten 3) Adsorpsjon av celler til overflaten 4) Reversibel feste av celler 5) Irreversibel feste av bakterieceller til overflaten og produksjon av ekstracellulære polymerer og signalmolekyler 6) Transport av oksygen og næringsstoffer 7) Celledeling og vekst 8) Produksjon av ekstracellulære materialer, som polysakkarider, lipider, proteiner og/eller DNA 9) Planktoniske celler i ytre lag løsner fra biofilmen (Bryers & Ratner 2004).

Det første trinnet, reversibel adhesjon, initieres ved at bakterieceller går over fra en frittsvømmende tilstand (planktoniske celler), til en tilstand der celler er festet til overflaten (Davey & O'toole 2000). Denne overgangen kan reguleres av næringstilgang. Reversibel adhesjon er en svak interaksjon mellom celler og underlag, og involverer van der Waalske krefter, elektrostatiske krefter og hydrofobe interaksjoner (Shi & Zhu 2009). Ved dette stadiet har bakteriene fremdeles Brownske bevegelser og kan dermed enkelt fjernes fra overflater med skylling. Det neste trinnet, irreversibel adhesjon, krever større mekaniske krefter for å fjerne bakteriene fra overflaten (Carpentier & Cerf 1993).

Noen arter er i stand til å feste seg til en overflate på egenhånd. Andre kan forankre seg til matriks eller direkte til mikrokolonier. Tabell 2 viser en oversikt over faktorer med betydning for adhesjon og biofilm-dannelse. Generelt sett vil ru, hydrofobe overflater med organisk materiale øke adhesjon. I tillegg vil en økning i strømningshastighet og vanntemperatur øke adhesjonsevnen ytterligere (Donlan 2002).

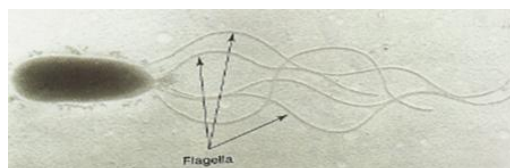
Tabell 2 Faktorer med betydning for adhesjon og biofilm dannelse

Underlaget	Flytende væske	Bakteriecellen
Tekstur	Strømningshastighet	Celleoverflate hydrofobisitet
Hydrofobisitet	pH	Fimbrier
Organisk materiale	Temperatur	Flageller
	Kationer	Ekstracellulære polymere substanser
	Antimikrobielle agenter	

Modifisert utgave (Donlan 2002)

Celle-egenskaper som hydrofobisitet, flageller, fimbrier og produksjon av ekstracellulære polymere substanser har vist seg å ha stor betydning for irreversibel adhesjon til ulike overflater (Donlan 2002; Vu et al. 2009). Enkelte mener at adhesjonsevnen styres av overflateproteiner og ikke flageller. Forandringer i peptidoglykanstrukturen på overflaten av Gram-positive bakterier kan også ha en effekt på binding til overflater. Det er vist at flere peptidoglykan-degraderende enzymer, som for eksempel *hydrolase A* (CwhA) i celleveggen hos *L. monocytogenes* øker feste til rustfritt stål (Monk et al. 2004; Van Houdt & Michiels 2010).

Flageller kan hjelpe cellen med å overkomme frastøtende krefter mellom bakteriecellen og overflaten (Donlan 2002). Dette er svært tynne spiralformede tråder (proteiner) som strekker seg fra cytoplasmaet og ut gjennom celleveggen (figur 5). Hver tråd har en diameter på mellom 0,01 - 0,02 μm og en lengde opptil 10 μm . Både Gram-positive og Gram-negative bakterier kan ha flageller (Simões et al. 2010).



Figur 5 Illustrasjon av flageller (Donlan 2002).

Antall flageller kan varierer både mellom slekt og art.

Fimbrier er observert på mange Gram-negative bakterier, som for eksempel *Pseudomonas*. Dette er fine, trådformede vedheng, 4- 35 nm brede og kortere enn flageller. Trådene er vanligvis rette og er ikke involvert i motilitet slik som flageller, men har som funksjon å gjøre cellene mer klebrige. Det er vist at bakterier med fimbrier fester seg godt til andre bakterieceller og uorganiske partikler (Harbron & Kent 1988; Simões et al. 2010).

Ekstracellulære polymere substanser er ansvarlig for å binde celler og andre partikler sammen til overflaten (Simões et al. 2010) og er en viktig faktor for irreversibel adhesjon. Irreversibel adhesjon kan ta 20 minutter til maksimum 4 timer ved 4 og 20 °C (Shi & Zhu 2009). De ekstracellulære polymere substansene kan variere i kjemisk og fysisk komposisjon og består hovedsakelig av polysakkarider, men også av varierende konsentrasjoner av lipider, proteiner og/eller DNA. Polysakkarider produsert av Gram-negative bakterier er enten nøytrale eller poly-anioniske. Sistnevnte egenskap innebærer at cellen har flere negative ladede områder og favoriserer binding av divalente kationer som for eksempel kalsium og magnesium. Disse kationene utgjør sterke bindingskrefter i en moden biofilm (Donlan 2002).

Etter irreversibel adhesjon vokser biofilmen gjennom en kombinasjon av celledeling og rekruttering. Overgangen fra planktonisk celle til å tilpasse seg et liv i et større samfunn, krever genetisk regulering. Biofilmen reguleres av mekanismen "Quorum sensing" (QS). Dette innebærer celle til celle kommunikasjon basert på produksjon, sekresjon og deteksjon av signalmolekyler. Ved en bestemt celletetthet aktiveres gener involvert i biofilm produksjon (Donlan 2002). Gram-negative bakterier produserer og frigjør A1 molekyler, *N*-acyl homoserine lactone (AHL), som har som funksjon å kontrollere celletetthet. I Gram-positive bakterier, foregår denne kommunikasjonen ved hjelp av modifiserte oligopeptider som genererer signaler, mens den membranbundne sensoren histidine kinaseas fungerer som reseptor (Vu et al. 2009). Når konsentrasjonen av signalmolekyler når et visst nivå vil bakteriene forandre genuttrykk. Dette fører blant annet til sekresjon av virulens faktorer, initiering av biofilmdannelse og dannelse av sekundærmetabolitter (Willey 2009).

Sammensetningen, tykkelsen og strukturen til biofilmen avhenger av bakteriesammensetning (Donlan 2002; Flemming & Wingender 2001; Vu et al. 2009) alder og miljøforhold (temperatur, næringstilgang og underlag) (Vu et al. 2009). Arkitekturen og strukturen gjør at bakterier i biofilm ofte er resistente mot antibiotika, desinfeksjonsmidler eller detergenter.

Den tredimensjonale strukturen består av et nettverk med vannkanaler som sikrer næringsstoffer inn til de dypeste lagene med celler. Kanalene blir beskrevet som et sirkulasjonssystem og beskytter bakteriene ved at den også transporterer avfallsstoffer ut av biofilmen (Davey & O'toole 2000). Enkelte celler lokalisert i utkanten av biofilmen frigjøres til omgivelsene og returnerer til planktonisk form og finner nye overflater for biofilm dannelse. Dette er en aktiv prosess som reguleres av festede celler, men tilgang på næringsstoffer, oksygen og mengde avfallsstoffer påskynder prosessen ytterligere (Shi & Zhu 2009).

2.8.1 Biofilm i næringsmiddelindustrien

Biofilm kan forårsake mange problemer i produksjonsmiljøet, blant annet kan den fungere som et reservoar for ulike bakteriearter og beskytte dem mot ugunstige miljøbetingelser. Vann og matrester kombinert med utstyr som er vanskelig å rengjøre gjør produksjonsmiljøet til et gjestfritt miljø for bakterier og biofilm-dannelse (Grinstead 2009).

Biofilm er vanligvis sammensatt av mange ulike arter (multikultur), og er tykkere i struktur og mer stabile for miljøforandringer enn monokulturer (Donlan 2002). Denne stabiliteten skyldes trolig produksjon av ekstracellulære polymere substanser fra ulike mikroorganismer (Chmielewski & Frank 2003; Kumar & Anand 1998). Hovedsakelig kan biofilm i produksjonsmiljøet deles inn i to grupper; statisk eller dynamisk biofilm.

Statiske biofilmer dannes på flater med kondens, i dødsoner og hulrom, prosessutstyr eller i sprekker på slitte transportbånd. Denne type biofilm er ikke utsatt for skjærkrefter og det er heller ikke kontinuerlig tilførsel av ny næring. Likevel har biofilmen tilgang på næringsstoffer da det ofte samles opp mye organisk materiale i slike nisjer (Møretrø & Habimana 2008).

Dynamiske biofilmer dannes under en væskestrøm. Denne type biofilm blir dermed utsatt for skjærkrefter og kontinuerlig tilførsel av næring. Disse er ofte å finne i rørsystemer og områder der det drypper væske nedover en flate. Ofte dannes biofilmer under vekslende betingelser. Sluk er et eksempel på en nisje som i perioder utsettes for dynamiske forhold og i perioder har statiske betingelser (Møretrø & Habimana 2008).

2.8.2 *Listeria monocytogenes* i biofilm

Listeria monocytogenes kan sammen med andre bakterier feste seg til og danne mikrokolonier og biofilm på overflater som rustfritt stål, glass og ulike typer plastmateriale. Selve koloniseringen vil skje lettere på slitte og mindre glatte overflater (Rørvik 2008). *Listeria monocytogenes* har fire til seks flageller per celle og det antydes at flagelin proteinene er glykosylerte (Lemon et al. 2007; Schirm et al. 2004). I kontrast til flagelldannelse hos mange andre bakterier er syntesen av flageller hos *L.monocytogenes* temperaturavhengig og reguleres av helt andre mekanismer enn Gram-negative bakterier (Schirm et al. 2004).

Tidligere studier har vist at bakterien er i stand til å vokse ved både lave og høye temperaturer. Else et al. (2003) fant at høy fuktighet og høy temperatur (30 °C) var gunstig vekstforhold for *L.monocytogenes* i biofilm, mens Jeong og Frank (1994) undersøkte vekst av *L. monocytogenes* i multikultur med bakterieflora isolert fra meieri- og kjøtt miljøer, og fant at *L.monocytogenes* var i stand til å vokse ved både 10 og 21 °C.

Flere studier har vist at den bakterielle sammensetningen i en biofilm har betydning for vekst av *L.monocytogenes* (Carpentier & Chassaing 2004). Blant annet undersøkte Carpentier et al. (2004) interaksjoner mellom *L.monocytogenes* og andre bakterier i biofilm. Både Gram-positive og Gram-negative bakterier, ble isolert fra produksjonsanlegg etter vask/desinfeksjon og dyrket opp i duokultur med *L. monocytogenes*. Av totalt 29 isolater hadde 53 % av isolatene en negativ innvirkning på *L.monocytogenes*, 34 % hadde ingen effekt og 13 % hadde en positiv effekt på interaksjon.

Enkelte bakteriearter har vist seg å ha en større betydning for vekst og kolonisering av *L.monocytogenes* på overflater. Bremer et al. (2001) undersøkte bakteriens adhesjonsevner til rustfritt stål i renkultur og multikultur, og fant at *L.monocytogenes* festet seg signifikant bedre til overflater av rustfritt stål i multikultur bestående av blant annet *Flavobacterium*. I samme undersøkelse ble det også vist at bakterien overlevde i lenger tid i multikultur enn i monokultur. Flere studier har også vist at enkelte arter av *Pseudomonas* kan være med på øke kolonisering av *L.monocytogenes* og/eller beskytte bakterien mot desinfeksjonsmidler (Sillankorva et al. 2008).

3. MATERIALER OG METODER

Alle forsøk med patogene bakterier ble utført på patogen-laboratoriet hos Nofima Mat, Ås. For detaljert beskrivelse av medier vises det til vedlegg 1.

3.1 Prøvetaking

I perioden 01.03.2011 - 11.01.2012 ble 29 overflateprøver fra produksjonsmiljø samlet inn fra fire forskjellige laksebedrifter. Prøver fra miljø/utstyr hvor *Listeria* ofte påvises, og tilsvarende hvor *Listeria* ikke påvises, var av spesiell interesse. Prøvepunktene ble valgt på grunnlag av dialoger med hver enkelt bedrift, gjennomgang av bedriftens resultater fra eget overvåkingsprogram, samt nisjer som er oppgitt som problemområder i litteraturen og tidligere bedriftsbesøk fra Nofima. Det ble utført ett bedriftsbesøk med prøvetaking i løpet av perioden. Hensikten med besøket var å få et visuelt inntrykk av et lakseslakteri og innhente informasjon om aktuelle prøvepunkter med hensyn på ytre faktorer som temperatur, pH, fuktighet og smuss. Andre prøvetakinger ble utført av bedriftene, etter anvisning fra Nofima.

Prosedyre

Svabring av prøvepunkter ble utført etter renhold/desinfeksjon og før produksjonsstart. Det ble svabret med sterile Q-tips eller kompresser over et område på 10 x 10 cm. For å få med mest mulig prøvemateriale ble tre Q-tips benyttet per prøvepunkt. Ved svabring med sterile kompresser ble to kompresser per prøvepunkt benyttet. Svaberprøvene ble oppbevart i nummerte rør (figur 6) med nøytraliseringsvæske (D/E Neutralizing Broth, Difco™) og fraktet til laboratoriet i isoporkasser med fryseelementer. Ved ankomst laboratoriet ble alle prøver oppbevart på kjølerom (4 °C), og bearbeidet innen ett døgn. Fullstendig oversikt over prøvested, uttaksdato og type prøvepunkter er presentert i tabell 3.



Figur 6 Svaberprøve (kompresser)

Tabell 3 Oversikt over prøvested, uttaksdato og type prøvepunkter

Bedrift	Uttaksdato	Prøvenr	Type prøvepunkt	Avdeling	Listeria/ tidligere ⁱ	Påvist Listeria ⁱⁱ
A	01.03.2011	K96	Transportbånd til kjøletank	Slakteavd.	x	X
A	04.10.2011	K296**	Transportbånd til kjøletank	Slakteavd.	x	
A	04.10.2011	KA	Transportbånd til Baader-maskiner	Slakteavd.		
A	04.10.2011	KB	Transportbånd til innfrysing	Slakteavd.		
B	27.09.2011	F7	Sluk ved manuell sløyning	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F8	Sluk ved trapp	Slakteavd.		
B	27.09.2011	F9	Langsluk ved Baader	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F10	Langsluk ved Baader- u/gul platting	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F12	Vakuumsug til grabb-Baader nr.2	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F15	Vakuumsug til grabb-Baader nr.4	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F17	Bånd nr.4 (etter stigetransportør)	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F19	Transportbånd sløyd fisk	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F22	Bånd nr.1	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F26	Bånd nr. 1 (etter stigetransportør)	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F27	Bånd nr.3 (etter stigetransportør)	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F28	Langsluk, ved frysestativ	Slakteavd.		X
B	27.09.2011	F29	Langsluk	Slakteavd.		X
B	11.01.2012	F219**	Transportbånd sløyd fisk	Slakteavd.		
B	11.01.2012	F226**	Bånd nr. 1(etter stigetransportør)	Slakteavd.		
B	11.01.2012	F227**	Bånd nr.3(etter stigetransportør)	Slakteavd.		
C	06.12.2011	L312	Sluk ved salting	Filetavd.	x	
C	06.12.2011	L315	Start sluk ved salting	Filetavd.		
C	06.12.2011	L 324	Vakuumutstyr	Slakteavd.		
C	06.12.2011	L 333	Røykevogn nederste rist	Røykeavd.		
C	06.12.2011	L337	Vakuumutstyr	Slakteavd.		
D	18.10.2011	Å228***	T. bånd fra Grader til skinnemaskin	Slakteavd.		
D	18.10.2011	Å229	Transportbånd til Baader-maskiner	Slakteavd.	x	
D	18.10.2011	Å262	Transportbånd til Grader	Slakteavd.	x	
D	18.10.2011	Å263	Transportbånd fra skinnemaskin	Filetavd.		

ⁱ Påvist ved tidligere bedriftsbesøk utført av Nofima. ⁱⁱ Påvist ved oppformering i Frasier buljong og utplating på selektive skåler (utført av ingeniør Anette Wold Åsli parallelt med denne oppgaven). ** Runde 2 (oppfølging av tidligere prøvepunkter).*** Problempunkt - *Enterobacteriaceae*.

3.2 Bestemmelse av totalkim i svaberprøver

Bestemmelse av totalkim ble utført for å få en indikasjon på om renhold og temperaturforhold i lokalet var tilfredsstillende. To medier, PCA (Plate Count Agar, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) og jernagar tilsatt L-cystein (Iron Agar, Lyngby, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) ble benyttet. Det ble utført en signifikanttest (en paret T-test) i Mini tab (versjon 16.1.1, Minitab.inc) for alle uttakene for å se om det var en signifikant forskjell i vekst for de to ulike mediene.

Prosedyre

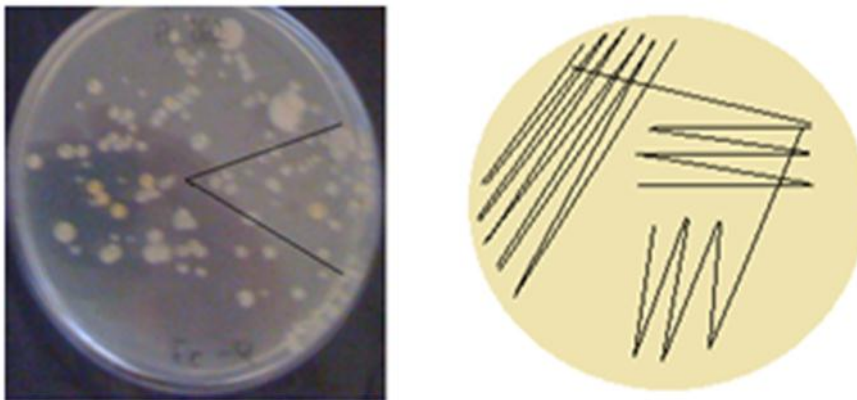
Svaberprøvene ble fortynnet ved tifolds fortynningsrekke i sterile rør med 4,5 ml peptonvann (0,1 %, w/v peptone; 0,05 % w/v saline). Et volum på 100 µl fra hver fortynning ble sådd ut på agarskåler og spredt med en steril vinkelstav. Agarskålene ble inkubert ved 15 °C i fem døgn. Ved avlesning ble skåler med 30-300 kolonier telt, og antall kolonidannende enheter per milliliter (CFU/ml) beregnet ved å multiplisere med gjeldende fortynningsfaktor.

3.3 Identifisering av bakterieflora – 16S rDNA sekvensering

Det har lenge vært behov for en metode hvor det er mulig å teste ut et større antall kolonier direkte med PCR. Metoden brukt i denne oppgaven er utarbeidet av Rob Britton og hans medarbeidere på laboratoriet, Michigan State University. Den er tidligere testet ut på Gram-positive bakterier som *Lactobacillus plantarum* baa-793 og *Lactococcus lactis*, med gode resultater (Britton 2011).

Prosedyre

For å oppnå renkulturer med enkeltkolonier, ble skåler fra bestemmelse av totalkim (kapittel 3.2) benyttet til rendyrkning. Skåler med mellom 30-300 tellbare kolonier ble valgt og 10-20 kolonier med ulik morfologi ble plukket innenfor en bestemt sone på skålen (figur 6), og strøket ut på BHI-skåler (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) med fortynningsutstryk illustrert i figur 7. Det ble valgt å plukke kolonier fra jernagar fordi diversiteten var større enn på PCA. Skåler ble inkubert aerobt ved 20 °C i 2 døgn. Små kolonier ble inkubert ytterligere ett døgn.



Figur 7 Soneinndeling til rendyrkning (venstre) og illustrasjon av fortynningsutstryk (høyre)

3.3.1 PCR (Polymerase kjedereaksjon)

Ved å bruke PCR kan man amplifisere genet som koder for 16S ribosomalt RNA fra DNA-genomet. I starten av hver PCR syklus blir DNA varmet opp. Den høye temperaturen sørger for en denaturering av DNA, til to enkelttråder. I dette steget brytes hydrogenbindinger, noe som krever energi. Smeltetemperaturen er avhengig av forholdet mellom antall A/T bindinger og G/C bindinger i DNA- molekylet. G/C bindes sammen av tre hydrogenbindinger og krever mer energi for å brytes, enn A/T bindinger som kun har to hydrogenbindinger. Etter denaturering av templat DNA, senkes temperaturen slik at primerene binder seg til sine komplementære baser på templat DNA. Primerne angir start- og slutt punktet for kopieringen. Temperaturen heves slik at DNA polymerasen kan syntetisere en komplementær tråd i 5` til 3` retning. DNA-syntesen skjer ved at dNTP inkorporeres på den frie 3`OH enden på primeren og elongerer DNA tråden i begge retninger (dsDNA). På denne måten blir det dannet to nye dobbeltrådede DNA molekyler som inneholder den sekvensen en ønsker å amplifisere. Hele syklusen repeteres 30 ganger og for hver ny syklus blir mengden DNA doblet (Watson et al. 2008).

Prosedyre

En liten koloni (1-2 mm) ble plukket fra rendyrket skål med en steril pipettespiss, og avsatt nederst i en 96-well PCR-plate (Thermo-Fast®). PCR-platen ble deretter forseglet med blank folie og cellemembran lysert i en mikrobølgeovn på full styrke i ett minutt. Oversikt over primere benyttet i PCR er gitt i tabell 4.

Tabell 4 Primere benyttet i PCR

Primer	Oligonukleotidsekvens (5`-3`)
27 F	AGA GTT TGA TCM TGG CTCA G
1492 R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC T
Mangala F	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T
Mangala R	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT

Et kommersielt kit (Qiagen® Multiplex PCR Kit) ble benyttet ved PCR. Blandingsforhold ble satt opp som vist i tabell 5.

Tabell 5 Qiagen Multiplex PCR

Mastermix	µl
2 x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5
10 pmol/µl primer F	0,5
10 pmol/µl primer R	0,5
dH ₂ O	11,5
Totalt	25,0

PCR ble utført i en PCR maskin (PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Gene Amp®) med temperaturprofil som vist i tabell 6.

Tabell 6 Temperaturprofil i PCR-maskin

95°C	15 min	
94°C	30 sek	} x 30 sykluser
55°C	90 sek	
72°C	90 sek	
72°C	10 min	
4°C	hold	

60 °C er optimal annealingstemperatur for Mangala, i forsøket ble 55 °C testet ut.

3.3.2 Gel-elektroforese

Etter endt PCR-reaksjon ble PCR-produktene kontrollert på en agarosegel ved hjelp av elektroforese. Tydelige, rene bånd indikerte en vellykket DNA-isolering.

Prosedyre

5 µl PCR-produkt ble tilsatt 5µl loadingbuffer for å øke tettheten og viskositeten til prøven i gelen. 1 % agarosegel ble laget ved at 1 gram agarose (Multi ABgarose) og 100 ml 0,5 X TBE buffer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA, pH 8.3) ble blandet sammen i en flaske og varmet i mikrobølgeovn til agarose-pulveret var oppløst. Agaroseløsningen ble avkjølt til 50 °C, før 8 µl Gel Red ble tilsatt. Løsningen ble tilsatt i et elektroforesekar (Wide Mini- Sub™ Cell, BIO-RAD) med to kammer, slik at 2 x 20 brønner ble dannet i gelen. TBE-buffer ble tilsatt karet med anode og katode. En størrelsesstandard, Standard IV, ble tilsatt i første brønn på hver gel for å estimere størrelsen på PCR-produktene. Elektroforesen ble utført ved at karet ble koblet til en strømkilde (Power-Pac 200, BIO-RAD) ved 80 V i 45 min. Gelen ble fotografert under UV-lys (Gel Doc™ EZ Imager, BIO-RAD).

3.3.3 Pre-sekvensering

Pre-sekvenseringen ble utført for å bli kvitt rester av primere og nukleotider, slik at de ikke skulle interferere i de neste reaksjonene. ExoSap-IT ble fortynnet 5 x i dH₂O og 2 µl av fortynningsløsningen ble fordelt i et nytt PCR-brett. Tabell 7 viser benyttet blandingsforhold, mens tabell 8 viser temperaturprofilen i PCR maskinen.

Tabell 7. Blandingsforhold

ExoSap-IT	2 µl
PCR produkt	5 µl
Totalt	7 µl

Tabell 8. Temperaturprofil i PCR-maskin

37°C	30 min
80°C	15 min
4°C	hold

3.3.4 Sekvensering

Ved å sekvensere 16S rDNA kan isolatene identifiseres på slekts- og noen ganger artsnivå gjennom å sammenlikne sekvensen med dem man finner i en sekvensdatabase. Sekvensanalyser av 16s rDNA er et naturlig valg til bakterieidentifisering da dette er et tilstrekkelig stort molekyl til å se sekvensvariasjoner store nok til å skille ulike bakteriearter fra hverandre. Det benyttes universalprimere mot de konserverte områdene, mens sekvensene av de variable områdene benyttes som sammenligningsgrunnlag. Hovedprinsippet bak metoden er at den bruker dideoxynukleotid trifosfatene (ddNTPs) som DNA kjede terminatorer.

I sekvenseringen vil man i motsetning til PCR lage bare en enkelttråd. Dette er årsaken til at kun en primer er med i reaksjonen. Primeren leser av templatet, men stopper ved dideoxynucleotide triphosphatet. Dideoxynukleotider har ikke frie hydroksylgrupper i 2' posisjon på ribose og kan derfor ikke danne fosfodiesterbinding med neste dideoxynukleotid. Dideoxynukleotidene terminerer dermed DNA-sekvensen der de blir satt inn. Primeren kan imidlertid bygge videre på dNTP. Lengden på kjeden avhenger av sekvensen til DNA templatet og hvilke dideoxynucleotider som er involvert (Watson et al. 2008).

Prosedyre

MicroAmp Optical 96 well reaction plate (MicroAmp™, Applied Bio systems) ble benyttet. Reagenser og blandingsforhold for pre-sekvensering er gitt i tabell 9. Tabell 10 viser temperaturprofilen i PCR-maskinen.

Tabell 9. Blandingsforhold

Mastermix	µl
Big Dye Buffer 5x	1,5
Big Dye 1.1	1,0
Mangala F, 3.2 µm	1,0
dH ₂ O	5,5
Pre-sekvenseringsprodukt	1,0
Totalt	10

Tabell 10. Temperaturprofil i PCR-maskin

96°C	15 sek	} x 25 sykler
60°C	4 min	
4°C	hold	

Ved pre-sekvenseringen ble det dannet ekstensjonsprodukt fra primeren. Overskudd ble fjernet, slik at det var mulig å lese sekvensen helt inntil primeren. Blandingsforholdet benyttet ved felling vises i tabell 11.

Tabell 11. Blandingsforhold

Mastermix	µl
X-Terminator Solution	10
SAM Solution	45
Totalt	55

Platen ble forseglet med strips og vortexet i 30 minutter ved 1500 rpm, før sentrifugering ved 2500 rpm i 2 minutter. Sekvenseringen ble utført med et automatisert instrumentsystem (ABI 3130xl Genetic Analyser), som er i stand til å bestemme sekvenser, eller størrelse og kvantitet av DNA fragmenter. Instrumentet benytter kapillær elektroforese til å separere PCR produkter av ulik lengde, med fluormerkede primere.

3.3.6 Redigering og analyse av sekvenser

Starten av sekvensen inneholder en del uønsket støy i området hvor primeren fester seg, og mot slutten av sekvensen kan det være en del åpne felter der bestemmelsen av nukleotider vil være upresis. Starten og slutten av sekvensen ble derfor redigert bort. Dette ble utført i BioEdit, en biologisk sekvenseditor for protein- og nukleinsyre editering, sammenstilling, manipulering og analyse. BioEdit kan lastes ned gratis på nettet (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). De redigerte sekvensene i BioEdit ble lagret som Fasta-files og deretter lastet opp i en database RDP (Ribosomale Database Project) tilgjengelig på nett (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

3.3.7 Lagring av identifiserte bakterieisolater

Isolater ble langtidslagret i glyserol (17,4 %) ved -80 °C. Frysekulturer ble laget ved å tilsette 300 µl 87 % glyserol til 1200 µl ON bakteriekultur. Glyserol ble tilsatt for å hindre at bakteriene sprekker som følge av den lave temperaturen. Ved bruk, ble nye medier podet med en loop av frysekulturen.

3.4 Bakteriesamfunnsanalyse – 454 Pyrosekvensering

Hensikten med dette forsøket var å se om det er mulig å bestemme bakteriesammensetningen direkte fra svaberprøver uten å bruke et dyrkingstrinn. For å gjøre dette ble det benyttet 454 pyrosekvensering.

Forskjellen fra Sanger metoden er at man kan se at DNA-polymerasen er festet på enkelt nukleotider på en nysyntetisert DNA-tråd. Fragmentet har en spesifikk adapter A ytterst i 3`enden og en spesifikk adapter B ytterst på 5`enden. Adapteren i 5`enden har et biotin molekyl koblet til seg noe som medfører at fragmentene kan binde seg til streptavidin-kuler slik at enkeltrådede DNA fragmenter kan genereres fra kulene. Ved inkorporering av et nukleotid ved hjelp av enzymet DNA *polymerase* frigjøres pyrofosfat - PPi, fra dNTP. Sammen med substratet APS (adenosin fosfosulfat) omdannes dette til ATP ved hjelp av enzymet *ATP sulfurylase*. Enzymet *luciferase* katalyserer omdannelsen av substratet luciferin til oksyluciferin og generering av lys (lysblits). Mengde lys er proporsjonalt med antall baser inkorporert og måles av et sensitivt CCD kamera. I praksis blir T-basen tilsatt picotiterplaten først, og kun brønnene med en kule hvor en T kan inkorporeres vil lyse opp. Deretter vaskes platen og neste base, A tilsettes – og deretter base C og så G (Nederbragt & Jakobsen 2008).

Forsøket ble utført etter metoden “Amplicon Library Preparation Method Manual”, “emPCR Amplification Method Manual - Lib-L” og “Sequencing Method Manual”, GS Junior Titanium Series, Roche. Del 3.5 til og med del 3.7 (etter amplifisering) i protokollen “emPCR Amplification Method Manual - Lib-L” og alle stegene i “Sequencing Method Manual”, ble utført av ingeniør, Merete Rusås Jensen, ved Nofima, Ås. For nærmere detaljer vedrørende disse stegene henvises det til protokollene.

Tabell 12 gir en oversikt over svaberprøver med i forsøket.

Tabell 12 Oversikt over svaberprøver

Bedrift	Prøvenummer	Prøvested
A	K296	Transportbånd til kjøletank
A	KA	Transportbånd til Baader
B	F7	Sluk ved manuell sløyting
B	F19	Transportbånd sløyd fisk
B	F22	Bånd nr. 1
B	F26	Bånd nr. 1 (etter stige-transportør)
B	F27	Bånd nr. 3 (etter stige-transportør)
B	F29	Langsluk

3.4.1 DNA isolering av svaberprøver

Ved isolering av DNA direkte fra svaberprøver ble ekstra rensetrinn utført ved start. Hensikten var å unngå hemmestoffer fra eventuelle fiskerester i svaberprøver. 10 ml peptonvann ble tilsatt prøvene, med påfølgende vortexing og sentrifugering ved 700 rpm i 1 minutt i en sentrifuge (RC 5C PLUS Superspeed Centrifuge, SORVALL) med rotor SH 3000. Supernatanten ble overført til sentrifugerør som tålte kraftig sentrifugering. Rensetrinnet ble utført totalt tre ganger. Supernatanten ble deretter resuspendert i 1,5 ml TE buffer, og sentrifugert ved 15000 rpm (14 000 x g). Supernatanten ble kastet, og eventuell pellet resuspendert i 0,5 ml TE buffer (pH 8). Løsningene ble overført til merkede eppendorfrør og prosedyren ble videre utført som beskrevet i påfølgende avsnitt.

Et kommersielt kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) ble benyttet for isolering av DNA. Aktuelle prøver i eppendorfrør ble spunnet ned i en sentrifuge (Biofuge Fresco) i 10 minutter, 5000 x g (7500 rpm) ved 4 °C. Supernatant ble fjernet og pelleten resuspendert i 500 µl lysis buffer (2 x TE 11,2 % Triton). Den oppløste pelleten ble overført til sterile FastPrep-rør. Rørene (2 ml, Sarstedt) var på forhånd tilsatt 250 mg glasskuler (Glass beads, acid washed). Cellemembran ble lysert ved FastPrep 4.0 m/s x 40 sek. 360 µl av løsningene ble deretter overført til nye merkede rør, og 50µl proteinase K (sørger for inaktivering av RNase og DNase) og 400 µl buffer AL (denaturerer proteiner) ble tilsatt og mikset ved vortexing.

Prøvene ble deretter inkubert ved 56 °C i 30 minutter, før 400 µl etanol (96-100 %) ble tilsatt rørene og blandet godt med vortexing. 600 µl av løsningen ble overført til DNase Mini Spin kolonne i et 2 ml rør, og sentrifugert i et 1 minutt ved 6000 x g (8000 rpm). Vesken i røret ble fjernet, kolonnen satt tilbake i røret og de resterende 600 µl av løsningen ble tilsatt kolonnen, og sentrifugert. Kolonnen ble plassert i et nytt 2 ml rør, og 500 µl Buffer AW1 ble tilsatt med påfølgende sentrifugering i et 1 minutt ved 6000 x g (8000 rpm). Hensikten var å skille proteiner og DNA. Kolonnen ble plassert i et nytt rør, og 500 µl Buffer AW2 ble tilsatt, for så å sentrifugere i 3 minutter ved 20 000 x g (14 000 rpm) for å tørke DNase membranen. DNase Mini Spin kolonnen ble overført til nytt sterilt 2 ml eppendorfrør, og 100 µl Buffer AE ble tilsatt direkte på DNase membranen for å felle ut DNA. Rørene ble inkubert ved romtemperatur i ett minutt før sentrifugering i 1 minutt ved 6000 x g (8000 rpm).

3.4.2 NanoDrop

Det ble valgt å bruke en DNA konsentrasjon på mellom 5-20 ng/µl. Bakgrunnen for dette er at man ikke ønsker å tilsette for mye DNA på grunn av eventuelle hemmestoffer i prøvene. Mengde DNA ble målt ved at 1,5µl ble pipettert ut på NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ND-1000 Spectrophotometer, USA). Prøver med høyere DNA-konsentrasjon enn 20 ng/µl, ble fortynnet.

3.4.3 PCR

PCR ble benyttet som metode for amplifisering av fragmenter av genomisk DNA, og en unik primer ble tilsatt hver prøve. Reaksjonen ble satt opp som vist i tabell 13, og med temperaturprofil som vist i tabell 14.

Tabell 13 Blandingsforhold for PCR

Mastermix	30 µl
Molecular grade water	22,5
Fast Start 10x buffer	23,0
dNTP mix	0,6
Revers primer (454R4)	1,2
Faststart Hifi polymerase	0,3
Totalt	27,6 i hver brønn
1,2 µl forward primer (unik primer til hver prøve)	
1,2 µl DNA	

Tabell 14 Temperaturprofil for PCR

94°C	11 min	} x 20 sykler
94°C	1 min	
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	hold	

Etter endt PCR-reaksjon ble PCR-produktene kontrollert på en agarosegel ved hjelp av elektroforese som beskrevet i kapittel 3.3.2. Gelen ble fotografert under UV-lys (Gel Doc™ EZ Imager, BIO-RAD), hvor bånd på gelen viste en vellykket PCR-reaksjon, og størrelsen av fragmentet ble kontrollert mot en størrelsesmarkør.

3.4.4 Rensing

PCR-produktene ble sentrifugert i 30 sekunder ved 900 x g. Molecular Biology Grade Water (22,5 µl) ble pipetert over i en polypropylen plate (96-brønner). Deretter ble 22,5 µl av hvert PCR produkt pipetert over i respektive brønner i platen. AMPure kuler ble vortexet og 72 µl tilsatt til hver brønn og resuspendert minst 12 ganger til løsningen var homogen. Platen ble deretter inkubert i 10 minutter ved romtemperatur, for så å bli plassert på en “96-brønn magnet” og inkubert 5 minutter i romtemperatur til supernatanten var klar. Hensikten med dette var å binde en viss mengde DNA, slik at ikke mindre fragmenter ble med. Med platen stående på magneten ble supernatanten fjernet uten å røre kulene.

Platen ble deretter fjernet fra magneten og 100 µl med 70 % etanol ble tilsatt hver brønn. For å blande løsningen, ble det tappet 10 ganger på platen. Platen ble deretter plassert på magnetplaten, inkubert i 1 minutt og supernatant fjernet. Etanol ble tilsatt som tidligere og rensessteg utført som beskrevet over. Platen og magneten ble videre plassert på en varmeblokk ved 40 °C i ca. 10 - 20 minutter til pelleten var passe tørr. Platen ble sammen med magneten fjernet fra varmeblokken (for å sikre at pelleten holdt seg stabil), og 20 µl av 1x TE ble tilsatt hver brønn. Platen ble så fjernet fra magnetringen, og pellet resuspendert ved å tappe forsiktig på platen. Hensikten med dette var å oppnå en effektiv eluering av PCR produktene fra kulene. Videre ble platen plassert på magneten og inkubert 2 minutter ved romtemperatur. Supernatant ble overført fra hver brønn til en ny PCR plate, forseglet med strips, og oppbevart ved -15 til -25 °C inntil kvantifiseringssteget ble utført.

3.4.5 Kvantifisering

Kvantifisering ble utført med bruk av “Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit”. Totalt 8 mikrosentrifugerør (1,5 ml) ble nummerert 1-8. Rør 1 ble tilsatt 594 µl 1 x TE, mens 300 µl ble tilsatt rør 2 til og med 8. Videre ble 6 µl av DNA standard overført til rør 1 (100 x fortyning: 1ng/µl) og vortexet i 10 sekunder. Det ble deretter laget en fortyningsserie som vist i tabell 15, ved å overføre 300 µl fra rør 1 til rør 2, vortexet, 300 µl fra rør 2 ble så overført til rør 3 etc. Rør 8 ble ikke tilsatt DNA standard, men benyttet som kontroll. Til slutt ble 100 µl av hver DNA standard overført til hver sin brønn på en fluorometer plate (96-brønner).

Tabell 15 DNA konsentrasjon per brønn i fluorometer analysen

Rør	Brønn	DNA konsentrasjon ng/brønn
1	A12	100,00
2	A13	50,00
3	A14	25,00
4	A15	12,5
5	A16	6,25
6	A17	3,13
7	A18	1,56
8	A19	0

Et volum på 99 µl 1 x TE Buffer og 1µl rensed DNA ble tilsatt til respektive brønner. Ved overføring av DNA ble løsningen blandet godt ved resuspending. Analysen ble utført som beskrevet av produsenten for Quant-iT Picogreen dsDNA assay Kit, ved å tilføre 100 µl av en 1:100 fortykning av Pico Green reagens til hver brønn. Dette ble blandet godt ved resuspending.

Prøver ble verifisert med henhold til standardkurve, hvor prøver under 5 ng/µl ble vurdert på nytt før videre prosessering.

3.4.6 Fortynning av fragment og sammenslåing

Konsentrasjonen av hvert fragment ble beregnet ved bruk av følgende formel:

$$\text{Molekyler per } \mu\text{l} = \frac{(\text{Prøvekonsentrasjon; ng}/\mu\text{l} \times 6.022 \times 10^{23})}{656.6 \times 10^9 \times \text{amplikon lengde; bp}}$$

Deretter ble hvert enkelt fragment fortynnet til en konsentrasjon på 1×10^9 molekyler / µl i 1 x TE Buffer. Dette ble utført ved å overføre 1 µl av hver prøve til en TE konsentrasjon (µl), beregnet etter følgende formel:

$$\frac{\text{Molekyler per } \mu\text{l}}{10^9} - 1$$

Videre ble fragmentene blandet sammen i like deler til et volum på 10 µl, og fortynnet til en konsentrasjon på 10^7 molekyler/µl ved å tilføre 2 µl av fragmentet til 198 µl Molecular Biology Grade Water. Løsningen ble deretter vortexet og lagret ved -15 til 25 °C.

3.4.7 Emulgering og amplifisering

Amplifiseringen av de genererte enkeltråd-molekylene baseres på emulsjons-PCR. Hensikten er å få DNA molekylene til å binde seg til monodisperse og hydrofile kuler i minireaktorer (vanndråper) i en vann- og oljeblanding, for deretter å amplifisere opp DNA- molekylene inne i vanndråpene.

Alle reagenser (unntatt enzymer og PPIase) ble tint i romtemperatur før bruk og vortexet i 5 sekunder. Reagenset “additive” ble vortexet og varmet ved 55 °C i 5 minutter for fullstendig oppløsning. Alle reagenser, inkludert enzymer ble spunnet ned i en bordsentrifuge i 10 sekunder. Enzymer ble oppbevart i fryser før videre bruk.

Emulsjonsoljen ble vortexet i 10 sekunder ved maksimum hastighet og innholdet overført til et Turrax rør. For å få 1 x Mock Mix ble et volum på 430 µl Mock Mix overført til 1,72 µl Molecular Biology Grade Water og vortexet. Et volum på 2 ml av 1 x Mock Mix ble deretter overført til emulsjonsoljen i Turrax røret og sentrifugert ved 4000 rpm i 5 minutter.

Live Amp Mix ble deretter blandet som vist i tabell 16.

Tabell 16 Blandingsforhold for Live Amp Mix

Reagens	Volum (µl)
Mol.Bio.grade Water	410
Additive	515
Amp Mix	270
Amp Primer	80
Enzyme Mix	70
PPIase	2
Total	1347

Vaskebuffer (1 x vaskebuffer) ble laget ved å blande 0,5 ml vaskebuffer i 4,5 ml Molecular Biology Grade Water. Røret med Capture beads (kuler) ble vortexet og spunnet ned i en bordsentrifuge i 10 sekunder, for så å vri røret 180 °C, og til slutt spinne ned igjen i 10 sekunder. Kulene ble på denne måten samlet nederst i røret, og supernatant (vaskebuffer) ble deretter fjernet. Dette steget ble utført totalt tre ganger.

Ønsket volum av “DNA bibliotek” ble beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$\mu\text{l DNA bibliotek per rør} = \frac{\text{ønskete molekyler per kule} \times 10 \text{ millioner kuler}}{\text{konsentrasjon (molekyler per } \mu\text{l)}}$$

Beregnet volum ble tilsatt røret med kuler og vortexet i 5 sekunder.

Et volum på 1,2 ml Live Amp Mix ble tilsatt røret med kuleløsningen, vortexet, og overført til olje- og emulsjonsløsningen. Blandingen av vann/olje ble satt til risting (IKA Ultra Turrax® Tube drive control) ved 2000 rpm i 5 minutter. Hensikten med dette var å danne en emulsjon med små dråper av vann med de hydrofile komponentene nødvendig for amplifisering (enzym, DNA på kule, og andre reagenser). Hastigheten bidro til at minireaktorene (vanndråpene) fikk en viss størrelse slik at kun en enkelt kule fikk plass i dråpen. På denne måten fikk hver kule millioner av kopier av det opprinnelige molekylet koblet til seg. Amplifisering ble utført ved å overføre 100 µl av emulsjonen til en 96-brønn plate (~64 brønner) og platen ble forseglet med strips. Reaksjonen ble utført med temperaturprofil som vist i tabell 17.

Tabell 17 Temperaturprofil i amplifiseringsreaksjon

94°C	4 min	x 1 syklus
94°C	30 sek	x 50 sykluser
58°C	4.5 min	
68°C	30 sek	
10°C		Hold

3.5 Biofilm på stål i fuktkammer

Hensikten med dette forsøket var å studere dynamikken i bakteriesamfunn, under forhold som simulerer produksjonsmiljøet i et lakseslakteri. Metoden er basert på tidligere erfaringer fra biofilm-forsøk utført ved Nofima Mat, Ås.

Valg av bakterier til multikultur-forsøk ble valgt ut i fra følgende kriterier:

- Prøvepunkter med *L. monocytogenes*.
- Tilhører art som dominerte helt etter renhold.

Det ble også valgt bakterieisolater som fantes i flere prøvepunkter.

En fullstendig oversikt over utvalgte isolater er gitt i tabell 18.

Tabell 18 Oversikt over utvalgte isolater til multikultur-forsøk

Prøvenr.	Bakterietyper	Prøvepunkt med <i>Listeria</i>	Dominerende etter renhold	Fantes i flere prøvepunkter
K96.4	<i>Pseudeomonas fragi</i>	x		x
K96.6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	x		x
K96.7	<i>Stenotrophomonas malthophilia</i>	x		x
K96.9	<i>Brochothrix thermospacta</i>	x		
K96.MF3971	<i>Serratia liquefaciens</i>	x		x
K96.MF3939	<i>Listeria monocytogenes</i>	x		
K96.MF3940	<i>Listeria</i> sp.	x		
K296.13	<i>Acinetobacter</i> sp.			x
K296.14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		x	x
Å228.8	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		x	
Å228.15	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		x	
Å228.20	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		x	
Å262.13	<i>Acinetobacter</i> sp.		x	x
Å262.17	<i>Acinetobacter</i> sp.		x	x
Å263.4	<i>Chryseobacterium</i> sp.			x
Å263.8	<i>Stenotrophomonas malthophilia</i>			x
Å263.16	<i>Chryseobacterium</i> sp.			x

Innledende forsøk

3.5.1 Buljong basert på fersk laks

For å kunne simulere vekstforhold i et lakseslakteri ble det laget vekstmedium av fersk laks. Laksebuljong ble fremstilt på grunnlag av artikkelen (Chandrasekaran et al. 1985). Fremgangsmåte og modifikasjoner er beskrevet i påfølgende tekst.

Fem kilo fersk laksefilet (*Salmo salar*) med skinn på en side, ble delt opp i små biter. 100 gram laks og 100 ml vann ble deretter veid opp i sterile poser i en fortynningsautomat (Dilumat, Mk2), og homogenisert ved bruk av en stomacher (Colworth Stomacher 400). Supernatant ble overført til 200 ml sentrifugerør, og sentrifugert i en sentrifuge (RC 5C PLUS Superspeed Centrifuge, SORVALL) med Rotor SLA 1500 ved 8120 rpm i 30 minutter. Supernatant (laksebuljong) fra sentrifugering ble blandet sammen til en batch. Laksebuljongen ble deretter autoklavert i en Certoclav (GmbH, Austria) ved 121 °C i 15 minutter. Etter autoklaving og avkjøling ble laksebuljongen fordelt i 50 ml rør og oppbevart ved - 40 °C. For å sjekke at mediet var egnet for dyrking av bakterier ble det laget agar. Utvalgte bakteriestammer ble deretter strøket ut på lakseagar og jernagar med 1 µl podenål, og inkubert ved 15 °C i to-tre dager for visuell observasjon.

3.5.2 Uttesting av medier/dyrkningsbetingelser for utvalgte bakteriestammer

Medier som benyttes til dyrking av prøver, er avgjørende for hvilke bakterier som vil vokse. Enkelte medier vil være bedre tilpasset visse bakterier enn andre. I dette forsøket ble det undersøkt om bakteriestammene kunne skilles fra hverandre, *kun* ved bruk av oppdyrking på selektive medier eller ved ulik morfologi på generelle medier.

Prosedyre

Bakteriestammer ble dyrket opp i rør med 5 ml BHI-buljong (Oxoid Ltd.). Det ble utført utstryk på utvalgte medier vha. 1 µl podenål med inkubering ved 10 og 20 °C i to-tre døgn. Rapid *L. mono* skåler ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. For oversikt over medier og blandingsforhold vises det til vedlegg 1.

3.5.3 Vekst i suspensjon

For å standardisere celletall for utvalgte isolater til biofilm-forsøk ble et vekstforsøk i laksebuljong og BHI-buljong utført. Hensikten med dette var å finne ut hvor lenge isolatene måtte inkuberes for å komme opp i celletall på 9 log CFU/ml.

Vekst i laksebuljong etter 1, 3 og 7 døgn ved 20 °C

Respektive bakteriestammer ble podet i 5ml laksebuljong i sterile rør, og inkubert med risting (200 rpm, Innova 4230, New Brunswick Scientific, USA) ved 20 grader. Kvantifisering ble utført etter 1, 3 og 7 døgn. Hver prøve ble fortynnet ved tifolds fortynningsrekke i sterilt peptonvann i, og sådd ut på jernagar ved bruk av en automatisk spiralutplater (Whitley Automatic Spiral Plater WASP, Don Whitley Scientific Limited, Storbritannia). Skålene ble inkubert ved 20 °C i 2-3 døgn. Bestemmelse av antall kolonidannende enheter foregikk ved bruk av automatisk tellemaskin (Acolyte Colony Counter, Synbiosis USA), som oppgir CFU/ml.

Vekst i BHI-buljong etter 1, 3 og 7 døgn ved 15 °C

Respektive bakteriestammer ble podet over i 5ml BHI buljong i sterile rør, og inkubert med risting ved 15 °C. Kvantifisering ble utført etter 1, 3 og 7 døgn, som beskrevet over.

3.5.4 Forkultur

På grunnlag av resultatene i kapittel 3.1.3 ble jernagar-skåler podet med utvalgte isolater og inkubert tre dager ved 15 °C. Tre til fire kolonier fra hver skål ble podet i respektive rør med henholdsvis 2 ml laksebuljong og inkubert med risting ved 15 °C i to dager. Kimtall ble bestemt ved at 0,5 ml av hver bakteriekultur ble fortynnet ved tifolds fortynningsrekke i 4,5 ml sterilt peptonvann. 50 µl av fortynningsløsningene ble sådd ut på jernagar skåler ved bruk av WASP. Skålene ble inkubert ved 15 °C i 2-5 dager og talt ved bruk av en automatisk tellemaskin og celletall ble oppgitt i CFU/ml.

3.6. Biofilm-produksjon

Biofilmdannelse og vekst i suspensjon ved inkubering ved ulike saltkonsentrasjoner og temperatur 12 °C (+/- 5 % NaCl) og 20 °C (+/- 5 % NaCl) ble undersøkt. Utvalgte bakteriestammer (tabell 18), ble dyrket opp i laksebuljong med *L. monocytogenes* og *Listeria* sp. i multikultur. *Listeria monocytogenes* og *Listeria* sp. ble dyrket opp i duokultur under samme vekstbetingelser. Vekstmedie (laksebuljong) ble byttet ut daglig, med unntak av tredje og fjerde dag. For å se på spredningen ble gjennomsnittlig standardavvik (kvadratroten av gjennomsnittlig varians) beregnet ut fra varians for hvert prøvepunkt i minitab for både duokultur og multikultur.

Prosedyre

Sterile rustfrie stålkuponger (AISI 304, 2B, 2x2 cm) ble overført til sterile cellekultur brett (Multi dish, 6 wells, Nunc A/S, Roskilde, Danmark) med en steril pinsett. Oppsettet er illustrert i figur 8.



Figur 8 Biofilm-oppsett 1) Cellekultur Brett tilsatt 3 ml laksebuljong temperert til 20 °C, inkubering 20 °C. 2) Cellekultur Brett tilsatt 3 ml laksebuljong temperert til 12 °C, inkubering 12 °C. 3) Cellekultur Brett tilsatt 3 ml laksebuljong med 5 % NaCl temperert til 20 °C, inkubering 20 °C. 4) Cellekultur Brett tilsatt 3 ml laksebuljong med 5 % NaCl temperert til 12 °C, inkubering 12 °C.

3.6.1 Multikultur

Det ble utført et forforsøk og to hovedforsøk med multikultur biofilm. Utvalgte isolater (tabell 18) ble blandet sammen til en sluttkonsentrasjon på 10^7 CFU / ml. Bakteriesuspensjon (1 ml) ble fryst ned i merkede eppendorfrør til senere bakteriesamfunnsanalyse. Et volum på 5 ml av bakteriesuspensjonen ble overført til respektive brønner og inkubert tre timer ved 15 °C for at bakteriene skulle feste seg til kupongene. Suspensjonen over kupongene ble pipettert av. Peptonvann ble tilsatt mot kanten i hver brønn, blandet inn med rolige sirkelbevegelser, og pipettert av. Tre ml laksebuljong, temperert til henholdsvis 12 °C (+/- 5 % NaCl) og 20 °C (+/- 5 % NaCl), ble tilsatt til kanten av hver brønn. Brettene ble inkubert som illustrert i figur 8. Vekstmedie (laksebuljong) ble byttet ut daglig, med unntak av tredje og fjerde dag.

3.6.2 Duokultur

Listeria monocytogenes og *Listeria* sp. ble fortynnet i laksebuljong til en sluttkonsentrasjon på 10^7 CFU / ml og blandet sammen i like deler. Metoden ble utført som beskrevet for multikultur. Uttak av prøver til bakteriesamfunnsanalyse ble ikke utført.

3.6.3 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon dag 2, 5 og 10

Bestemmelse av vekst i suspensjon over kupongen

En ml suspensjon fra (gjentak 1 og 2) dag 2, 5 og 10 fra hvert Brett ble fryst ned i merkede eppendorfrør til bakteriesamfunnsanalyse. Hver prøve ble fortynnet ved tifoldts fortynningsrekke i sterile rør med peptonvann, og sådd ut på jernagar ved bruk av WASP. Skålene ble inkubert ved 15 °C i 2-5 dager. Parallelt ble de samme fortynningsløsningene sådd ut på RLM, et selektivt medium for *Listeria*. Dette ble utført for å kunne bestemme vekst av *L. monocytogenes* og *Listeria* sp. På denne agaren vokser *L. monocytogenes* med blå/metalliske kolonier, og *Listeria* sp. med en hvit/grå farge. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer, og celletall bestemt ved bruk av automatisk tellemaskin og oppgitt i CFU / ml. For duokultur-forsøk, ble jernagar skåler benyttet som kontrollskåler for eventuelle forurensinger.

Bestemmelse av biofilm

Fem ml sterilt dH₂O ble tilsatt kanten av brønningen, blandet inn med rolige sirkelbevegelser og pipettert av for å skylle av løse celler fra kupongen. Kupongene ble overført til et sterilt glassrør med flat bunn tilsatt 6 ml degasset sdH₂O med biofilm overflaten opp, ved bruk av steril pinsett. Biofilm ble løsnet fra stålkupongene ved hjelp av sonikering (10 minutter ved 20 °C) i ultralyd-bad som vist i figur 9.



Figur 9 Stålkuponger i sterile glassrør med 6 ml degasset sdH₂O (venstre). Ultralyd bad (40 kHz, BRANSON 3510, Branson Ultrasonic Corporation, USA) (høyre).

Prøver fra sonikeringsvann (biofilm) ble fryst ned i merkede eppendorfrør til senere bakteriesamfunnsanalyse. Bestemmelse av celletall ble utført på samme måte som beskrevet for suspensjon, men oppgitt i log CFU / kupong.

3.7 Bakteriesamfunnsanalyse av forforsøk multikultur – 454 Pyrosekvensering

Bakteriesamfunnsanalyse av prøver fra suspensjon og biofilm (gjentak 1 og 2) dag 2 og 5 ble utført. Hensikten var å studere hvordan ytre faktorer som salt og temperatur (12 °C (+/- 5 % NaCl) og 20 °C (+/- 5 % NaCl) påvirket dynamikken i bakteriesamfunnet. Metoden ble utført som beskrevet under kapittel 3.4. Det ble ikke utført ekstra rensetrinn for isolering av DNA for disse prøvene.

4. RESULTATER








4.1 Bedriftsbesøk (bedrift B)

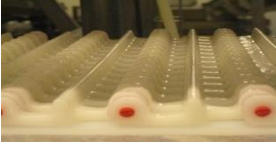




Det ble utført ett bedriftsbesøk med prøvetaking. Hovedsakelig var det ønskelig å ta ut overflateprøver fra produksjonsmiljøet etter vask/desinfeksjon og før produksjonsstart. Da det ikke var utført ordinært renhold av anlegget ble det bestemt at det skulle tas ut overflateprøver til sammenligning mot tilsvarende prøvepunkter med ordinært renhold.

Tabell 19 på neste side viser observasjoner og registreringer utført parallelt med prøveuttakingen. Det var mye smuss i samtlige sluk. Langslukene var verst med tanke på vann, fiskerester og annet avfall. Samtlige transportbånd ble klassifisert som synlig rene, med unntak av prøvepunkt F22 (transportbånd 1 ren sone) hvor det ble observert en god del fiskerester. Videre ble fuktighet observert på alle overflater samt kondens over transportbånd F19. Det ble målt høye temperaturer (>15 °C) i prøvepunktene F7 (sluk ved manuell sløyning) og F12 (sløyemaskin 2-grabb). I prøvepunkt F22 (transportbånd 1 ren sone) og F26 (transportbånd 1 etter stige) ble temperaturen målt til henholdsvis 9,9 og 10,2 °C. Det ble ikke observert noen særlig slitasje på utstyret, med unntak av F27 (transportbånd 3 etter stige), hvor det var noe slitasje i kantene. Gulvet var visuelt sett i dårlig forfatning med tanke på hygiene. Det ble blant annet observert rustflekker og avkuttete skruer.

Det ble ikke registrert informasjon for pH, temperatur, fuktighet og smuss for uttak av prøver etter vask/desinfeksjon for de andre uttakene, da overflateprøvene ble tatt ut av bedriftene selv i samråd med Nofima.

Tabell 19 Informasjon om prøvepunkter i bedrift B

Informasjon om prøvepunkter i bedrift B						
Prøvenummer/type prøvepunkt	Materiale	Areal	Fuktig	°C	pH	Synlig rent
7. Sluk ved manuell sløyving 	Stål	10 x10	x	15,7	6	Ikke rent
8. Sluk under trapp 	Stål	10 x10	x	12,6	5,6	Ikke rent
9. Langsluk ved Baader 	Stål	10 x10	x	13,1	5,9	Ikke rent
10. Langsluk ved Baader 	Stål	10 x10	x	13,1	6,5	Ikke rent
12. Sløyemaskin 2-grabb 	Stål og plast	10 x10	x	15	5,5	Ikke helt rent
15. Sløyemaskin 4-grabb 	Stål og plast	10 x10	x	13,6	5,9	Ikke helt rent
17. Bånd 4 	Plast	30 x 30	x	11,1	6,2	Ikke rent

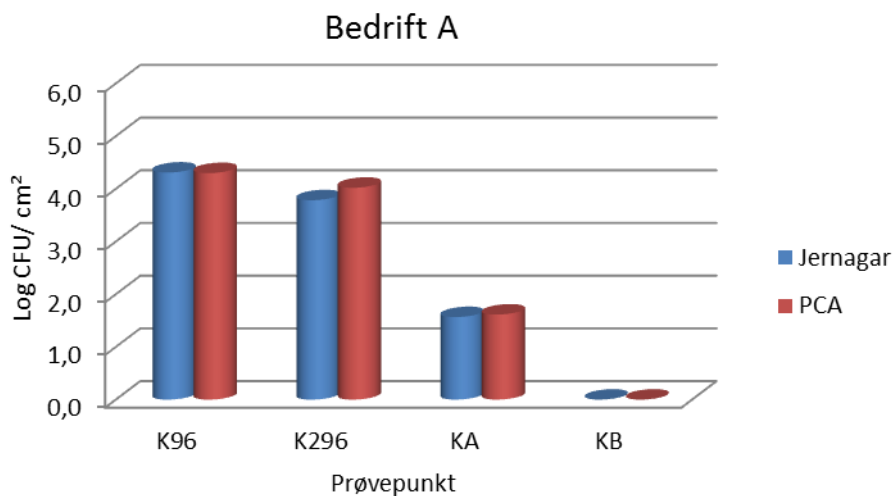
19. Transportbånd for sløyd fisk fra uren sone 	Plast	10x10	x	12,2	5,6	Ikke helt rent
22. Bånd 1 (ren sone) 	Plast	10 x10	x	9,9	Ikke målt	Ikke rent
26. Bånd 1 (etter stige) 	Plast	10 x10	x	10,2	6,2	Rent
27. Bånd 3 (etter stige) 	Plast	10 x10	x	11,9	5,9	Rent
28. Langsluk ved frysefisk 	Stål	10 x10	x	11,5	5,9	Ikke rent
29. Langsluk 	Stål	10 x10	x	12,4	5,9	Ikke rent

4.2 Sammenligning av vekstmedie

Analyser av total antall aerobe mikroorganismer ved 15 °C ble utført og vekst på PCA og jernagar sammenliknet med hensyn på videre bruk.

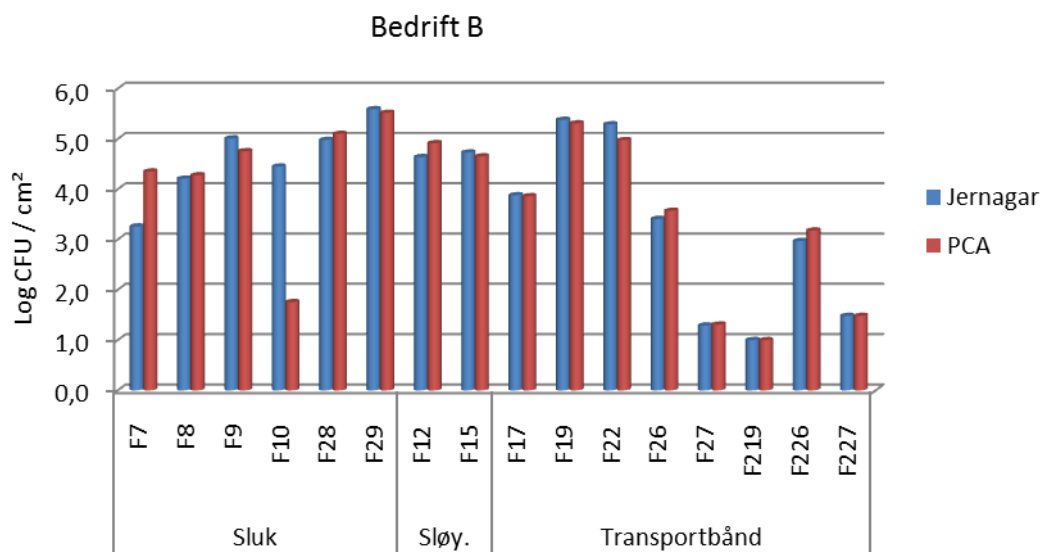
Sorte kolonier på jernagar skyldes utfelling av jernsulfid (FeS) ved omdannelse av den svovelholdige aminosyren L-cystein. Siden man i dette forsøket kun var interessert i kimtallet, er log-verdiene for jernagar basert på summen av hvite og sorte kolonier. Resultatene viste ingen signifikant forskjell i kimtall ($p = 0,365$) på PCA og jernagar.

Figur 10 viser totalkim på PCA og jernagar for de tre prøvepunktene i bedrift A. I prøvepunkt K96 ble det registrert kimtall på henholdsvis 4,3 log CFU /cm² på både PCA og jernagar. I K296 (samme prøvepunkt, men uttak 2) var kimtallene 3,8 - 4,0 log CFU/cm². I prøvepunkt KA ble det registrert et lavere kimtall på henholdsvis 1,6 log CFU/cm² på begge medier. I prøvepunkt KB ble det ikke detektert vekst på verken PCA eller jernagar.



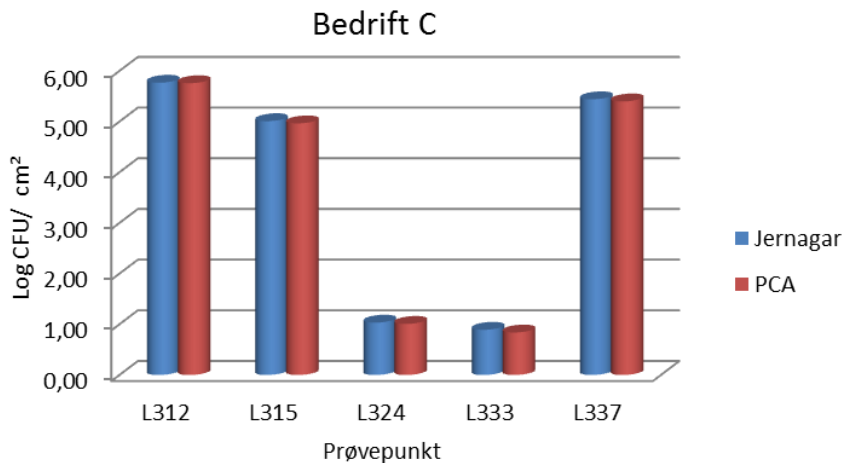
Figur 10 Sammenligning av vekst på PCA og jernagar (inkubert 15 °C i 2-7 døgn), for prøver fra bedrift A. Kimtall for overflateprøvene fra transportbånd er oppgitt i log CFU/cm². K296 er samme prøvepunkt som K96, men er tatt ut sju måneder senere.

Overflateprøver fra bedrift B ble analysert for total antall bakterier (log CFU/cm²) ved bruk av PCA og jernagar for de ulike prøvepunktene, se figur 11. I prøvepunkt 10 ble det registrert en differanse på 2,7 log CFU/cm² på jernagar og PCA. Gjennomsnittlig ble det registrert kimtall høyere enn 4,2 log CFU/cm² i prøvepunktene F7, F8, F9, F28 og F29. I prøvepunktene F12 og F15 (sløyemaskin) ble det registrert kimtall på henholdsvis 4,6 log CFU/cm² og 4,7 log CFU/cm². Resultatene for transportbånd viste lave kimtall for F17 (3,9 log CFU/cm²), F26 (3,4-3,6 log CFU/cm²) og F27 (1,3 log CFU/cm²) sammenlignet med transportbånd F19 (5,3 - 5,4 log CFU/cm²) og F22 (5,0 - 5,3 log CFU/cm²).



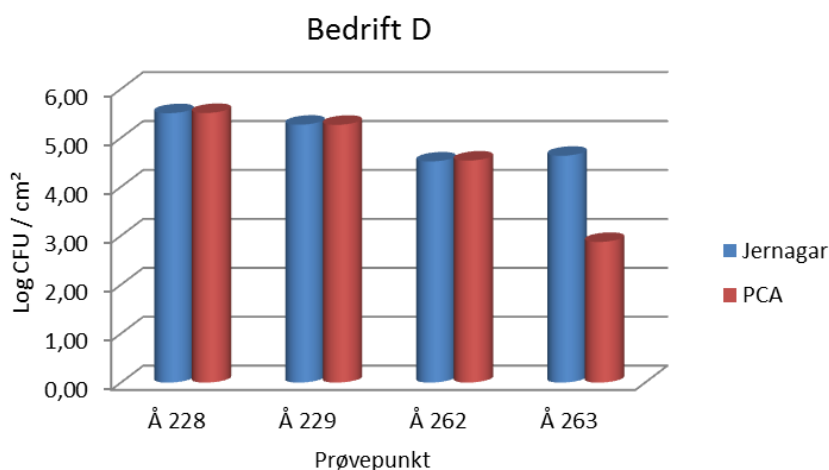
Figur 11 Sammenligning av vekst på PCA og jernagar (inkubert 15 °C i 2-7 døgn), for prøver fra bedrift B. Prøvepunktene er delt inn etter utstyr som sluk, sløyemaskiner og transportbånd. Sløy= sløyemaskin. Kimtall er oppgitt i log CFU/cm².

Overflateprøver fra sluk (L312 og L315), røykevogn (L333) og vakuum-utstyr (L324 og L337) i bedrift C ble analysert for total antall bakterier (log CFU/cm²). Totalkim på PCA og jernagar for de ulike prøvepunktene er vist i figur 12. Prøvepunktene L312 og L315 viste log-verdier mellom 4,97-5,77 log CFU/cm². I prøvepunktene L324, L333 og L337 ble det registrert kimtall mellom 0,8-5,44 log CFU/cm².



Figur 12 Sammenligning av vekst på PCA og jernagar (inkubert 15 °C i 2-7 døgn), for prøver fra bedrift C. Kimtall for overflateprøver fra sluk, røykevogn og vakuumutstyr er oppgitt i log CFU /cm².

Figur 13 viser total antall bakterier (log CFU/cm²) i overflateprøver fra transportbånd i bedrift D. Kimtallene for prøvepunktene Å228, Å229, Å262 og Å263 lå mellom 2,88 - 5,51 log CFU/cm².



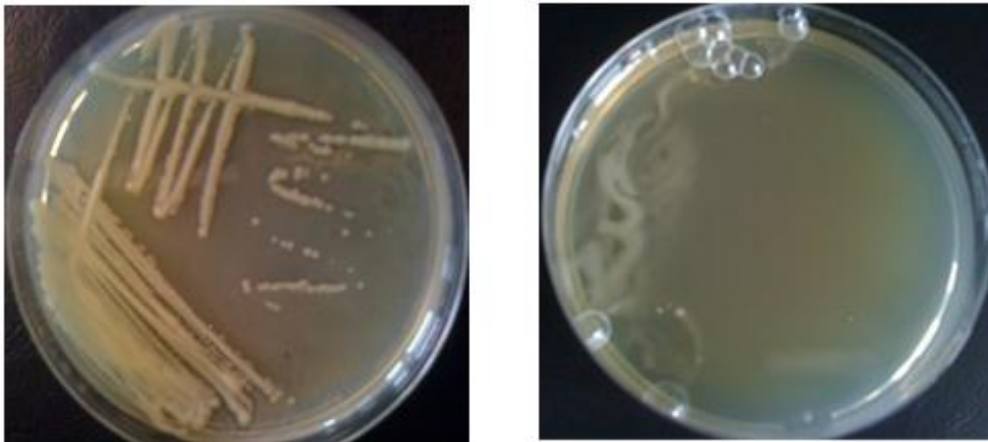
Figur 13 Sammenligning av vekst på PCA og jernagar (inkubert 15 °C i 2- 7 døgn), for overflateprøver i bedrift D. Overflateprøvene er tatt fra transportbånd. Kimtall er oppgitt i log CFU /cm².

4.3 16S rDNA sekvensering

For å kunne si noe om sammensetning av bakterieflora ble 16s rDNA sekvensering av kolonier fra jernagar utført. Siden det ikke var utført ordinært renhold av anlegget ved første uttak i bedrift B, omtales disse resultatene som “etter utilstrekkelig renhold”. Prøver fra bedrifter eller oppfølgingsprøver tatt ut på et tidspunkt hvor det var utført ordinært renhold omtales som “etter renhold”.

4.3.1 Rendyrkning

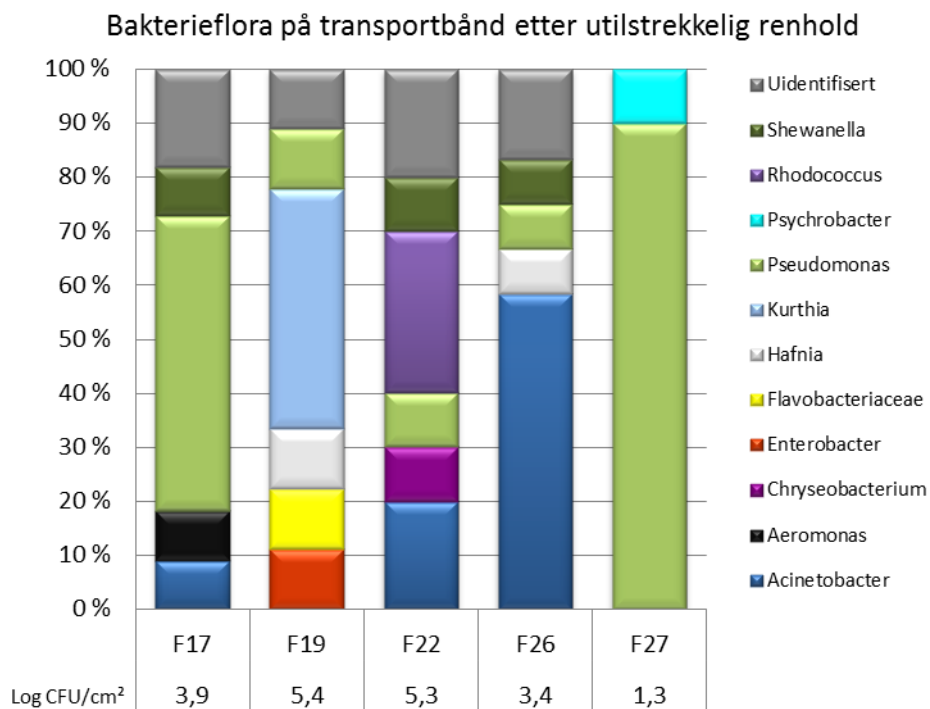
Kolonier til 16S rDNA sekvensering ble isolert fra jernagar skåler med mellom 30-300 tellbare kolonier. I alt ble 446 kolonier plukket til videre artsbestemmelse. Totalt 339 ble identifisert til art/slektsnavn. De resterende 107 koloniene ble ikke identifisert på grunn av dårlige sekvenser (59,8 %), vanskelige kulturer (28,4 %), for lite PCR produkt (8,91 %) og manglende vekst (3,47 %). Figur 14 viser et eksempel på to kulturer som var vanskelig å rendyrke.



Figur 14 Vanskelige kulturer. Kulturer fra prøvepunkt L333.4 (venstre) og L337.8 (høyre) dyrket på jernagar og inkubert 15 °C i to dager. L 333 er isolert fra en rist på røykevogn, mens L337 er isolert fra vakuumbutstyr. Bildet til venstre viser et tynt dekke rundt koloniene. Bildet til høyre viser produksjon av bobler (eventuelt gass). Kulturen hadde en sterk, søtlig lukt.

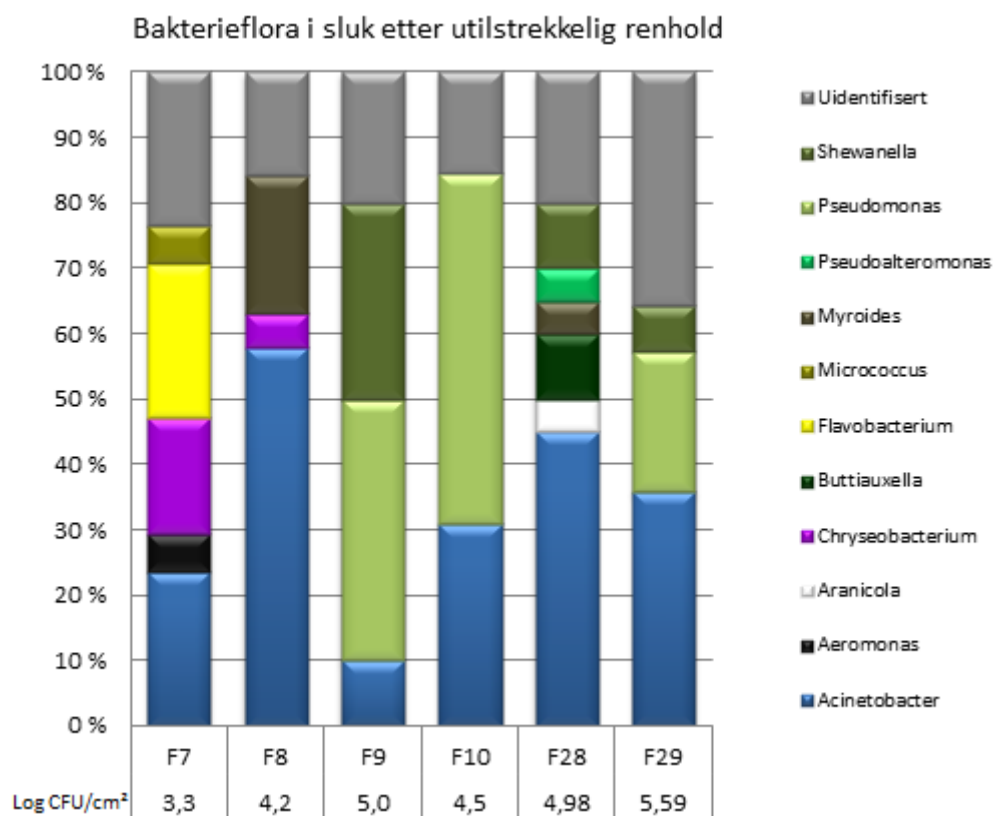
4.3.2 Bakterief flora på overflater etter utilstrekkelig renhold

Figur 15 viser en grafisk fremstilling av bakterief flora i sluk etter utilstrekkelig renhold. Kimtall på jernagar er presentert i samme figur. Det var høy diversitet og høye kimtall i prøvepunktene F17, F19, F22 og F26. *Pseudomonas* spp. ble påvist i alle prøvepunkter. I prøvepunkt F17 utgjorde *Pseudomonas* spp. omtrentlig 55 % av floraen, sammen med bakterier som *Shewanella* sp., *Aeromonas* sp. og *Acinetobacter* sp.. Prøvepunkt F219 utgjorde en helt annet bakteriesammensetning, med *Kurthia* spp. som dominerende populasjon (ca. 40 %) sammen med bakterier som *Pseudomonas* spp., *Hafnia* spp., *Flavobacterium* spp. og *Enterobacter* spp.. I F22 utgjorde *Rhodococcus* spp., sammen med *Acinetobacter* spp. hoveddelen av floraen, sammen med bakterier som *Shewanella* sp., *Pseudomonas* sp. og *Chryseobacterium* sp.. *Acinetobacter* spp. var dominerende populasjon i prøvepunkt F26, og utgjorde omtrentlig 60 % av en bakterief flora bestående av *Shewanella* sp., *Pseudomonas* sp. og *Hafnia* sp.. *Pseudomonas* spp. utgjorde hele 90 % av identifisert flora i prøvepunkt F27. Dette prøvepunktet var et transportbånd som var synlig rent og hadde et lavt bakterietall.



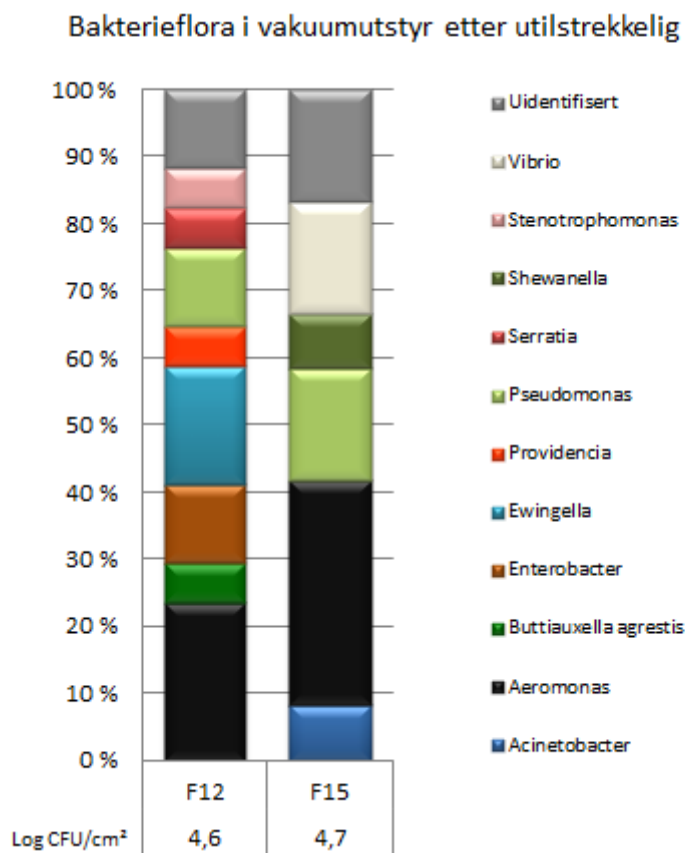
Figur 15 16S rDNA sekvensering av bakteriekolonier i overflateprøver fra transportbånd etter utilstrekkelig renhold. Kimtall er oppgitt i log CFU/cm².

Bakterieflora og kimtall i sluk etter utilstrekkelig renhold er vist i figur 16. Det var høy diversitet og høye kimtall i samtlige prøver. *Acinetobacter* spp. ble påvist i alle prøvepunkter unntatt F29. I prøvepunkt F7 bestod floraen av *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Chryseobacterium* spp., *Flavobacterium* spp. og *Micrococcus* spp.. *Acinetobacter* spp. var dominerende populasjon (omtrentlig 60 %) i prøvepunkt F8, mens resterende flora i dette prøvepunktet bestod av *Chryseobacterium* spp. og *Myroides* spp.. I prøvepunktet F9 utgjorde *Pseudomonas* spp. og *Shewanella* spp. dominerende populasjon sammen med en mindre andel *Acinetobacter* sp.. I prøvepunkt F10 ble det kun påvist to bakterietyper, *Pseudomonas* spp. (ca. 45 %) og *Acinetobacter* spp. (ca. 30 %). *Acinetobacter* spp. utgjorde dominerende populasjon (56 %) i prøvepunkt F28, mens bakterier som *Aranicola* sp., *Enterobacter* spp., *Myroides* sp., *Shewanella* spp. og *Pseudoalteromonas* sp. utgjorde en mindre andel av floraen. I prøvepunkt F29 utgjorde *Acinetobacter* spp. hoveddelen (35 %) av floraen, mens *Shewanella* spp. og *Pseudomonas* spp. ble påvist i en mindre andel.



Figur 16 16S rDNA sekvensering av bakteriekolonier i overflateprøver fra sluk etter utilstrekkelig renhold. Kimtall er oppgitt i log CFU/cm².

Resultatene for bakterieflora og kimtall fra overflater i vakuumbutstyr etter utilstrekkelig renhold er vist i figur 17. Det var høy diversitet og høye kimtall. *Pseudomonas* og *Aeromonas* ble påvist i begge prøvene. Det var noe høyere diversitet i prøvepunkt F12, men ingen store forskjeller i kimtall. I prøvepunkt F12 utgjorde *Aeromonas* og *Pseudomonas* en mindre andel av identifisert bakterieflora sammenlignet med prøvepunkt F15. I stedet ble det påvist bakterier som *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Ewingella* spp., *Enterobacter* spp. og *Buttiauxella* sp., mens *Vibrio* spp., *Acinetobacter* spp. og *Shewanella* spp. ble påvist i prøvepunkt F15.



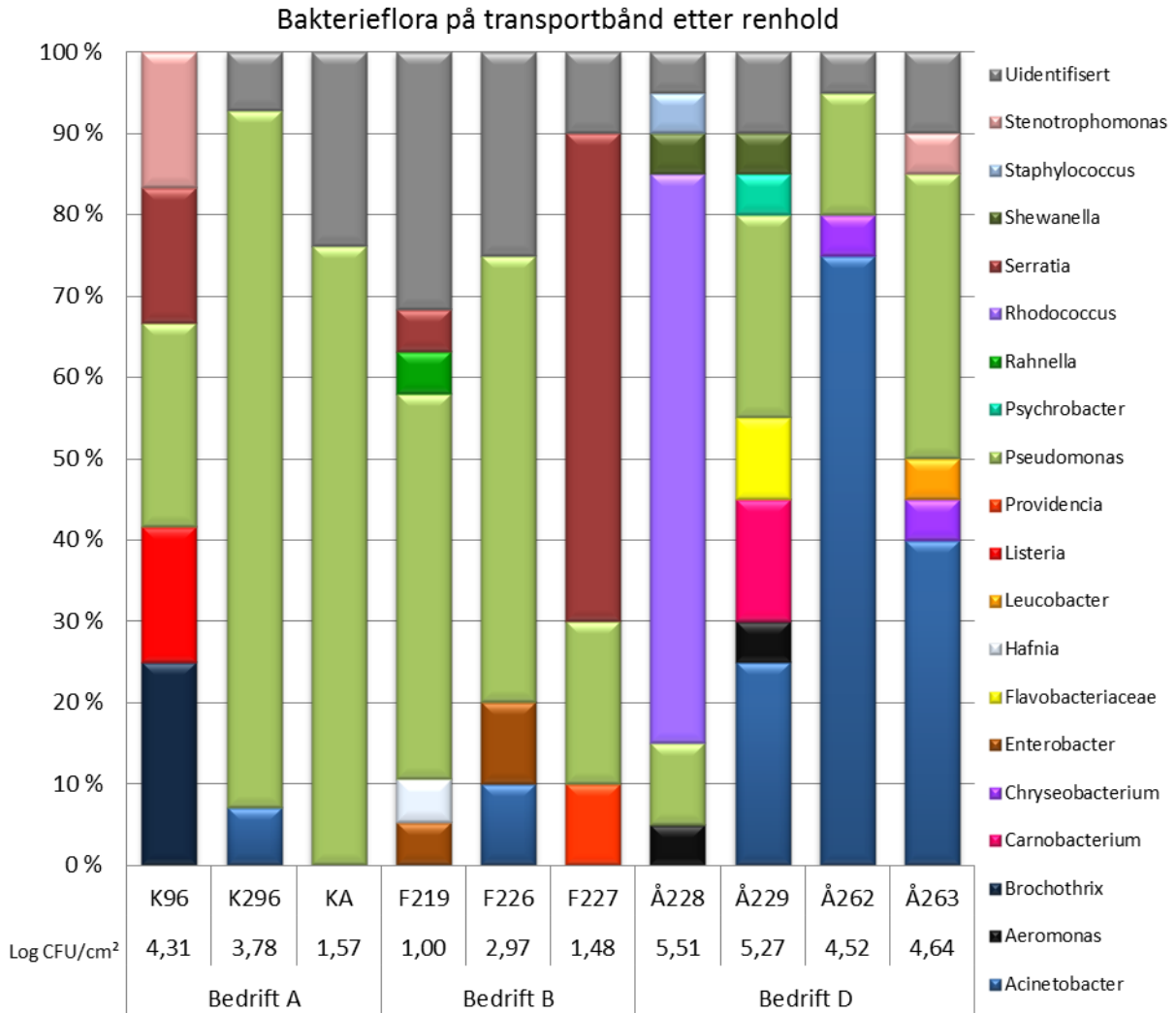
Figur 17 16S rDNA sekvensering av bakteriekolonier i overflateprøver fra vakuumbutstyr etter utilstrekkelig renhold. Kimtall er oppgitt i log CFU/ cm².

4.3.3 Bakterief flora på overflater etter ordinært renhold

Bakterief flora og kimtall på transportbånd etter ordinært renhold er vist i figur 18 på neste side. I bedrift A ble *Pseudomonas* spp. påvist i alle tre prøvepunkter. I overflateprøven fra prøvepunkt K96 ble *Listeria monocytogenes* (8,33 %) og *Listeria* sp. (8,33 %) identifisert med en bakgrunnsflora bestående av *Stenotrophomonas* spp., *Serratia liquefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fragi* og *Pseudomonas fluorescens*. I uttak 2 fra de samme punktene ble verken *Listeria* sp. eller *L. monocytogenes* identifisert i overflateprøven. Ved dette tidspunktet for uttak ble *Pseudomonas* spp. identifisert som dominerende art. Sammenligner man kimtall for prøvepunkt K96 og K296 utgjør dette bare en log forskjell. *Pseudomonas* spp. viste seg også å være fullstendig dominerende art i prøvepunkt KA fra samme bedrift. KA viser liten diversitet og lite vekst av total antall bakterier.

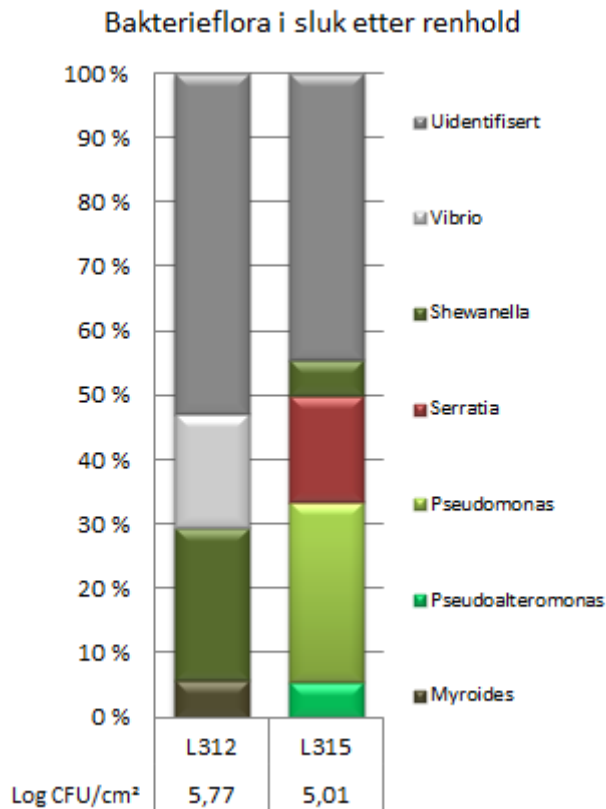
I bedrift B ble *Pseudomonas* spp. påvist på samtlige transportbånd, F219, F226 og F227. I prøvepunkt F219 og F226 utgjorde *Pseudomonas* spp. halvparten av bakterief floraen. I F219 ble det i tillegg påvist bakterier som *Rahnella* spp., *Hafnia* sp., *Enterobacter* sp. og *Serratia* sp., mens det i F226 ble påvist *Enterobacter* spp. og *Acinetobacter* spp.. Prøvepunkt F 227 utgjorde en helt annen bakteriesammensetning, med *Serratia* spp. (60 %) som dominerende art, samt bakterier som *Pseudomonas* spp. og *Providencia* spp..

I bedrift D utgjorde *Rhodococcus* hoveddelen (ca.75 %) i prøvepunkt Å228, sammen med en bakgrunnsflora bestående av forringelsesbakterier som *Shewanella* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. og *Staphylococcus* sp.. *Acinetobacter* spp. og *Pseudomonas* spp. ble også påvist i overflateprøvene i prøvepunkt Å229, Å262 og Å263. Samtlige prøvepunkter i bedrift D, hadde vesentlig høyere kimtall enn de to andre bedriftene, med unntak av K96 i bedrift A.



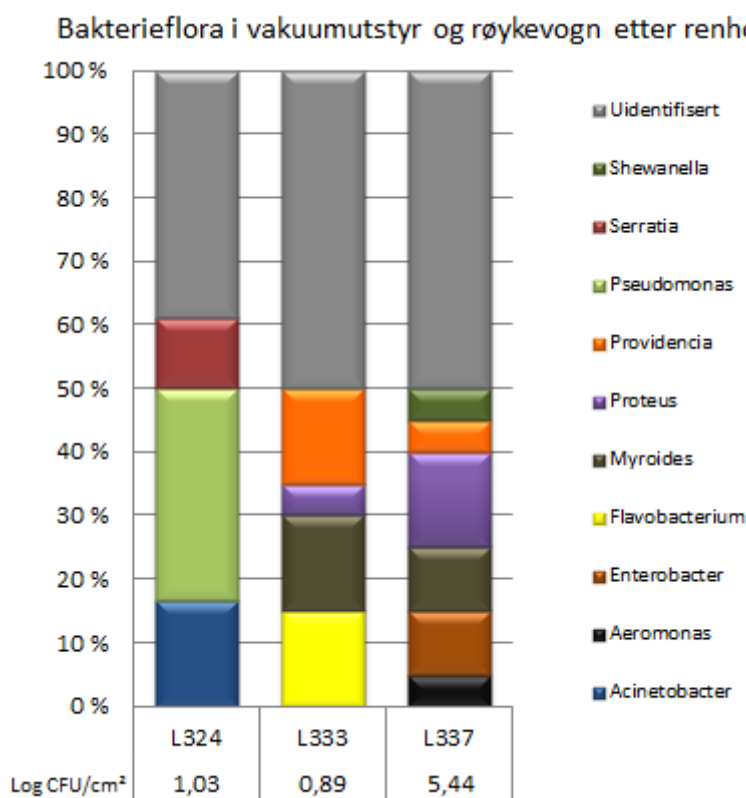
Figur 18 16S rDNA sekvensering av bakteriekolonier i overflateprøver fra transportbånd etter renhold. Prøvepunkt K96 til og med KA viser bakteriefloraen fra overflateprøver i bedrift A (K96 og K296 er samme prøvepunkt, men prøvene er tatt ut ved to ulike tidspunkt). F219 til og med F227 viser bakterieflora ved uttak 2 fra bedrift B, mens Å229 til og med Å263 viser bakteriefloraen fra overflateprøver i bedrift D. Kimtall er oppgitt i log CFU /cm².

Figur 19 viser bakterieflora og kimtall i sluk etter ordinært renhold. Figuren viser at så mange som 40 - 55 % av koloniene ikke ble identifisert. Sammenligner man prøvepunktene, var det ingen vesentlig likhet i bakteriefloraen. *Shewanella* spp. var eneste arten identifisert i begge sluk. I prøvepunkt L312 ble det i tillegg til *Shewanella* spp. påvist bakterier som *Vibrio* spp. og *Myroides* sp.. I prøvepunkt L315 ble det registrert bakterier som *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromonas* sp., *Serratia* spp. og *Shewanella* sp..



Figur 19 16S rDNA sekvensering av bakteriekolonier fra overflateprøver fra sluk etter renhold. Overflateprøvene ble tatt fra sluk ved salting i filetavdeling i bedrift C. Kimtall er oppgitt i log CFU /cm².

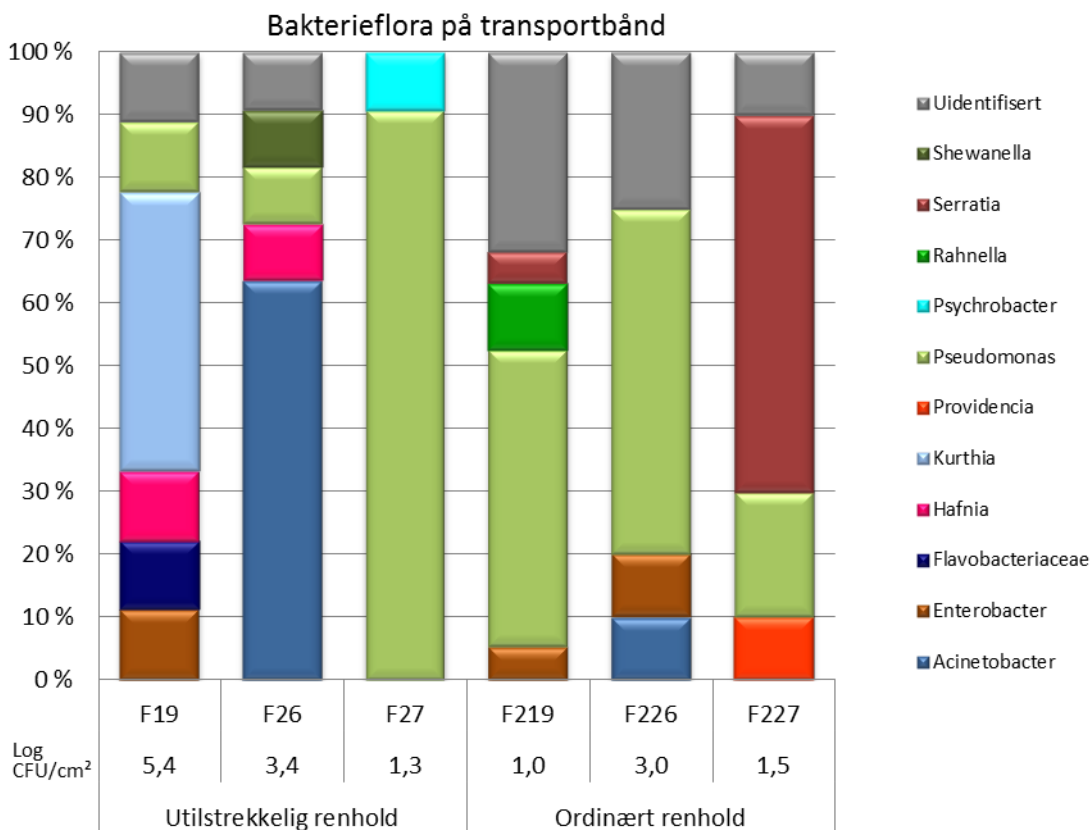
Bakterieflora og kimtall i vakuumutstyr (L324 og L337) og røykevogn (L333) etter renhold er presentert i figur 20. En stor andel (40 – 50 %) av bakteriekoloniene ble ikke identifisert. Sammenligner man bakteriefloraen i L324 og L337 (vakuumutstyr), er det ingen likheter i type bakterieflora. Det er imidlertid flere likheter i bakterieflora i prøvepunkt L333 (røykevogn) og L 337 (vakuumutstyr). I disse prøvepunktene ble både *Providencia* spp., *Shewanella* spp. og *Proteus* spp. påvist. I prøvepunkt L324 ble kun 60 % av bakteriekoloniene identifisert. *Pseudomonas* spp. var dominerende populasjon i prøvepunktet, men det ble også identifisert bakterier som *Serratia* spp. og *Acinetobacter* spp.. Bakteriefloraen i prøvepunkt L333 bestod av bakterier som *Providencia* spp., *Proteus* sp., *Myroides* spp. og *Flavobacterium* spp.. I prøvepunkt L337 ble det identifisert bakterier som *Shewanella* sp., *Providencia* sp., *Proteus* spp., *Myroides* spp., *Enterobacter* spp. og *Aeromonas* sp..



Figur 20 16S rDNA sekvensering av bakteriekolonier fra overflateprøver i vakuumutstyr og røykevogn etter ordinært renhold. Overflateprøvene ble tatt ut fra vakuumutstyr (L324 og L337) og en røykevogn (L333). Kimtall er oppgitt i log CFU/cm².

4.3.3 Sammenligning av bakterieflora ved ulike renholdsforhold

Resultatene for bakterieflora og kimtall på transportbånd fra to ulike renholdsforhold er vist i figur 21. Overflateprøvene fra F19, F26 og F27 (uttak 1) ble tatt ut etter produksjon, på et tidspunkt med utilstrekkelig renhold. F219, F226 og F227 (uttak 2) ble tatt ut ca. tre måneder senere hvor det var utført ordinært renhold. *Kurthia* spp. ble identifisert som dominerende art (ca. 40 %) i prøvepunkt F19 ved utilstrekkelig renhold, mens *Pseudomonas* spp. utgjorde hoveddelen (ca. 45 %) bakterieflora i samme prøvepunkt (F219) i uttak 2. *Acinetobacter* spp. ble påvist i større andel (ca. 60 %) i prøve F26 ved utilstrekkelig renhold, men utgjorde bare 10 % av identifisert bakterieflora i uttak 2. I stedet ble *Pseudomonas* spp. påvist med en andel på 50 % etter ordinært renhold. *Pseudomonas* spp. utgjorde hele 60 % av bakteriefloraen i prøvepunkt F27 ved første uttak. Ved uttak 2 ble *Serratia* spp. identifisert som dominerende art i dette prøvepunktet. Generelt sett fant man *Pseudomonas* spp. i alle prøvepunkter ved begge uttak, men i forskjellige mengder.



Figur 21 Sammenligning av bakterieflora og kimtall på transportbånd ved utilstrekkelig og ordinært renhold. Prøvepunktene F19, F26, F27 er tatt ut etter utilstrekkelig renhold, mens F219, F226 og F227 er tatt ut et halvt år senere etter ordinært renhold. Kimtall er oppgitt i log CFU/cm².

4.4 Bakteriesamfunnsanalyse av miljøprøver vha. 454 pyrosekvensering

For å se om det var mulig å bestemme bakteriesammensetningen direkte fra svaberprøver uten å bruke et dyrkingstrinn ble 454 pyrosekvensering av miljøprøver (tabell 12) utført. Resultatene ble sammenlignet med floraen isolert på jernagar og identifisert ved hjelp av 16S rDNA sekvensering.

Bakteriefloraen på overflateprøver fra bedrift B, uttak 1, er vist i figur 22. Bakteriefloraen i svaberprøvene fra prøvepunktene K96, KA, F26 og F27 (tabell 12) ble ikke identifisert med 454 pyrosekvensering på grunn av for lave kintall.

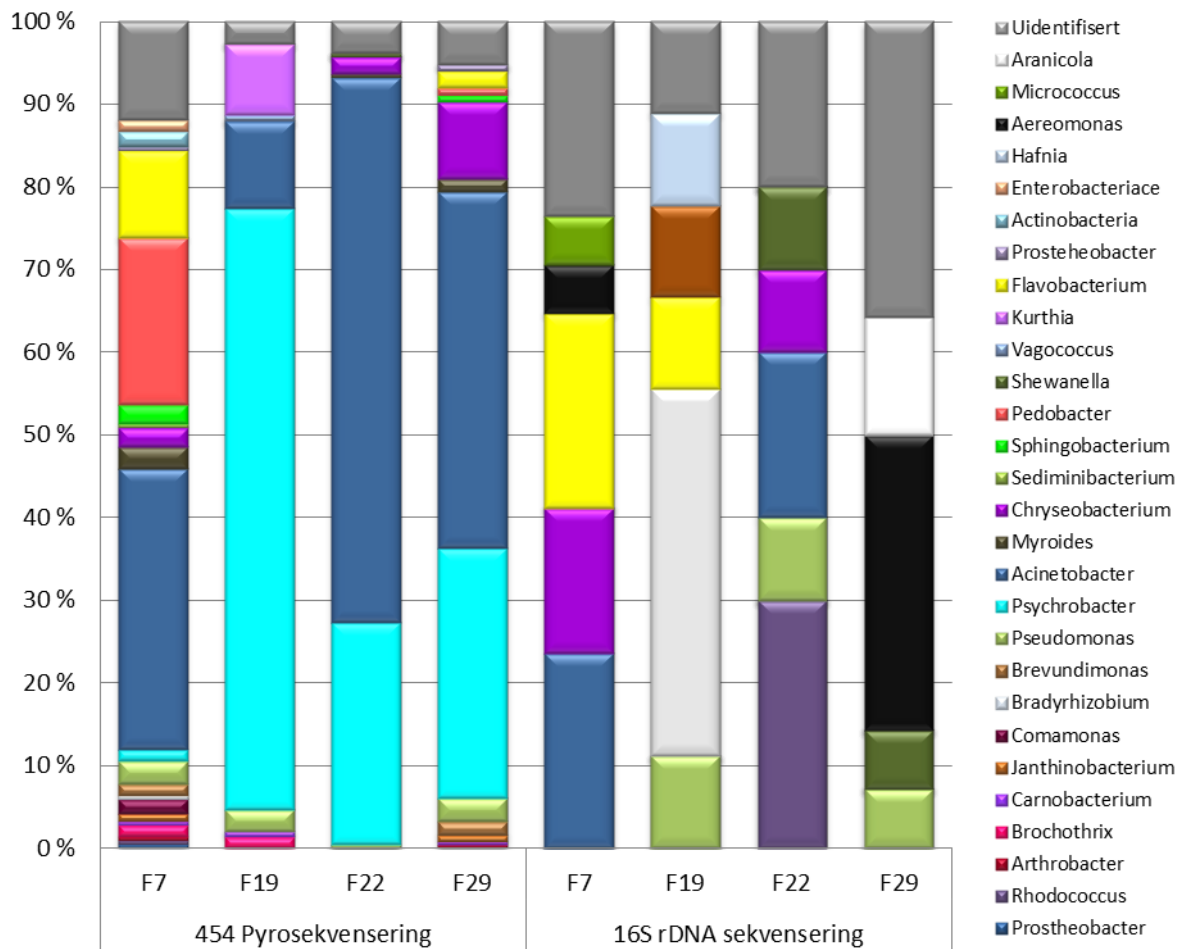
I alt ble 22 bakterietyper identifisert i prøvepunkt F7. Hele 20 av dem ble påvist med 454 pyrosekvensering, mens kun 5 ble påvist ved 16S rDNA sekvensering. Resultatene for 454 pyrosekvensering viste at det ble identifisert en større andel Gram-positive bakterier uten dyrkingstrinn. *Acinetobacter* spp. *Pedobacter* spp. og *Flavobacterium* spp. var dominerende populasjon identifisert ved 454 pyrosekvensering, mens *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp. og *Aeromonas* spp. utgjorde dominerende populasjon identifisert med 16S rDNA sekvensering

Bakteriefloraen identifisert med 454 pyrosekvensering (uten dyrkingstrinn) i overflateprøven F19 (sluk manuell sløying) bestod hovedsakelig av *Psychrobacter* spp., mens *Kurthia* spp. utgjorde halvparten av populasjonen identifisert med dyrkingstrinn.

Acinetobacter spp. og *Psychrobacter* spp. utgjorde dominerende populasjon i prøvepunkt F22 (bånd 1 ren sone) med 454 pyrosekvensering (uten dyrkingstrinn), mens *Acinetobacter* spp. og *Rhodococcus* spp. var dominerende populasjon ved 16S rDNA sekvensering (med dyrkingstrinn). *Kurthia* spp., *Rhodococcus* spp. og *Shewanella* spp. ble kun påvist ved 16S rDNA sekvensering (med dyrkingstrinn), mens *Psychrobacter* spp. og *Myroides* spp. ble kun påvist ved 454 pyrosekvensering (uten dyrkingstrinn).

Resultatene for prøvepunkt F29 (langsluk) viste en mer divers flora ved 454 pyrosekvensering (uten dyrkingstrinn) enn ved 16S rDNA sekvensering (med dyrkingstrinn). Av totalt 16 bakterietyper utgjorde floraen identifisert ved 454 pyrosekvensering hele 13 bakterietyper, mens kun 4 ble identifisert ved 16S rDNA sekvensering. Det ble ikke påvist Gram-positive

bakterier ved 16S rDNA sekvensering, derimot ble 15 % av den totale floraen identifisert ved 454 pyrosekvensering påvist som Gram-positive bakterier. *Acinetobacter* spp. og *Psychrobacter* spp. utgjorde dominerende populasjon identifisert uten dyrkningstrinn, men ble ikke påvist ved 16S rDNA sekvensering. I stedet utgjorde *Aeromonas* hoveddelen av floraen. *Aeromonas* spp., *Aranicola* spp. og *Shewanella* spp. ble ikke påvist uten dyrkningstrinn i denne overflateprøven.



Figur 22 Sammenligning av bakterieflora fra miljøprøver identifisert ved hjelp av 454 pyrosekvensering og 16S rDNA sekvensering. Bakteriefloreaen for 454 pyrosekvensering er identifisert uten dyrkningstrinn.

4.5 Funn av *Listeria monocytogenes*

Tabell 20 viser en oversikt over prøvepunkt med funn av *L.monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* ble isolert fra samtlige overflater (ca. 85 %) bedrift B med utilstrekkelig renhold (prøvepunkter med utilstrekkelig renhold er merket grønne). Ved ordinært renhold ble *L.monocytogenes* kun påvist i prøvepunkt K96 (transportbånd) hos bedrift A sammen med *Listeria sp.*

Tabell 20 Oversikt over prøvepunkter med funn av *L. monocytogenes*.

Bedrift	Uttaksdato	Prøvenr	Type prøvepunkt	Avdeling	Påvist
A	01.03.2011	K96	Transportbånd til kjøletank	Slakteavdeling	
A	04.10.2011	K296	Transportbånd til kjøletank	Slakteavdeling	
A	04.10.2011	KA	Transportbånd til sløyemaskiner	Slakteavdeling	
A	04.10.2011	KB	Transportbånd til innfrysing	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F7 *	Sluk ved manuell sløyning	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F8 *	Sluk ved trapp	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F9 *	Langsluk ved sløyemaskiner	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F10 *	Langsluk ved sløyemaskiner- u/gul platting	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F12 *	Vakuumsug til grabb-sløyemaskin 2	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F15 *	Vakuumsug til grabb-sløyemaskin 4	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F17 *	Bånd nr.4 (etter stige-transportør)	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F19 *	Transportbånd sløyd fisk	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F22 *	Bånd nr.1	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F26 *	Bånd nr. 1 (etter stige-transportør)	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F27 *	Bånd nr.3 (etter stige-transportør)	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F28 *	Langsluk, ved frysestativ	Slakteavdeling	
B	27.09.2011	F29 *	Langsluk	Slakteavdeling	
B	11.01.2012	F219	Transportbånd sløyd fisk	Slakteavdeling	
B	11.01.2012	F226	Bånd nr. 1(etter stige-transportør)	Slakteavdeling	
B	11.01.2012	F227	Bånd nr.3(etter stige-transportør)	Slakteavdeling	
C	06.12.2011	L312	Sluk ved salting	Filetavdeling	
C	06.12.2011	L315	Start sluk ved salting	Filetavdeling	
C	06.12.2011	L 324	Vakuumutstyr	Slakteavdeling	
C	06.12.2011	L 333	Røykevogn nederste rist	Røykeavdeling	
C	06.12.2011	L337	Vakuumutstyr	Slakteavdeling	
D	18.10.2011	Å228	T. bånd fra Grader til skinnemaskin	Slakteavdeling	
D	18.10.2011	Å229	Transportbånd til sløyemaskin	Slakteavdeling	
D	18.10.2011	Å262	Transportbånd til Grader	Slakteavdeling	
D	18.10.2011	Å263	Transportbånd fra skinnemaskin	Filetavdeling	

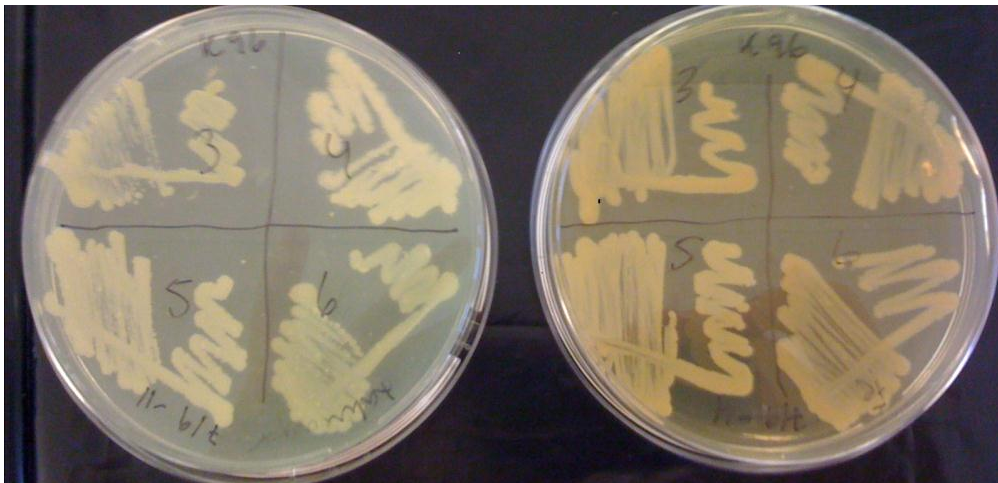
* prøvepunkter med utilstrekkelig renhold

4.6 Innledende forsøk til biofilm

4.6.1 Laksebuljong

For å kontrollere at laksebuljongen var anvendelig som vekstmedium i biofilm forsøk ble totalt 13 av de utvalgte isolatene strøket ut på lakseagar og jernagar, inkubert ved 15 °C i 5 dager, og vekst sammenlignet.

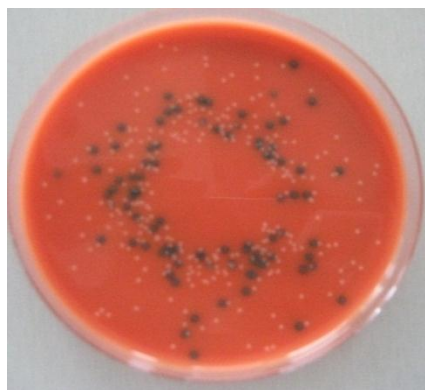
Vekst på lakseagar og jernagar etter aerob inkubering ved 15 °C i 5 dager er vist i figur 23. Figuren viser at isolatene vokste godt på begge medier.



Figur 23 Sammenligning av vekst på lakseagar og jernagar. Skålen til venstre viser vekst på lakseagar, og skålen til høyre viser vekst på jernagar.

4.6.2 Uttesting av medier/dyrkningsbetingelser for utvalgte bakterieisolater

Oppdyrking på selektive og generelle medier ble utført for å se om isolatene kunne skilles fra hverandre med mikrobiologiske metoder. Tabell 21 viser resultatene for vekst ved 10 og 20 °C. *Pseudomonas fluorescens* og *Pseudomonas fragi* vokste med ulik morfologi på *Pseudomonas* CFC selektivt medium. *Pseudomonas fluorescens* opptrådte med gule fluorescerende kolonier, og *P. fragi* med hvite kolonier. Det ble imidlertid registrert vekst av *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter* sp. og *Chryseobacterium* sp. på *Pseudomonas* CFC, ved både 10 og 20 °C. *Serratia liquefaciens* vokste godt på Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA Oxoid, Hampshire, UK), men vekst av *P. fluorescens* ved både 10 og 20 °C ble observert. *Serratia liquefaciens* opptrådte med karakteristiske røde kolonier, mens *P. fluorescens* ble registrert med små hvite kolonier i kanten av skålen. *Brochothrix thermosphacta* var den eneste av isolatene som vokste på det selektive mediet for *Brochothrix*, “Streptomycin Sulfate Thallous Acetate Agar “(STAA Oxoid, Hampshire, UK). På selektivt medie for *Listeria*, Brilliance™ *Listeria* Agar (LBA Oxoid, Hampshire, UK), opptrådte både *Listeria* sp. og *L. monocytogenes* med turkise kolonier. På Rapid `L. mono (RLM Bio-Rad, USA), selektivt medie for *L. monocytogenes*, vokste *L. monocytogenes* med blå/metalliske kolonier, og *Listeria* sp. med små hvit/grå kolonier(figur 23). Alle isolater vokste godt på generelle medier som PCA og blodagar, men det var ingen store forskjeller morfologisk sett, med unntak av *L. monocytogenes* hvor det ble observert en svak hemolyse rundt koloniene på blodagar. Vekstforsøkene viste at det ikke ville være mulig å bestemme sammensetningen av en blandingskultur av disse bakteriene med de selektive mediene som ble undersøkt.



Figur 24 Rapid` L. mono (RLM)

Listeria monocytogenes opptrer som blå-metalliske kolonier og *Listeria* sp. med små grå/ hvite kolonier.

Tabell 21 Uttesting av medier/ dyrkningsbetingelser for utvalgte bakterieisolater til biofilm forsøk.

Isolat	°C	VRBGA	CFC *	STAA	PCA	BHI **	LBA	BLOD**	RLM***	KOMMENTARER
K96.4 <i>P. fragi</i>	20	-	+	-	+	+	-	+	-	Hvite kolonier på <i>Pseud.</i> CFC agar
	10	-	+	-	+	+	-	+	-	
K96.6 <i>P. fluorescens</i>	20	+	+	-	+	+	-	+	-	Gule fluorescerende kolonier på <i>Pseud.</i> CFC agar. Lett å skille fra K96.4 Vokser på VRBGA
	10	+	+	-	+	+	-	+	-	
K96.7 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20	-	-	-	+	+	-	+	-	Like god vekst ved 10 °C som ved 20 °C på blodagar.
	10							+	-	
K96 MF3939 <i>L. mono</i>	20	-	-	-	+	+	+	+	+	Turkise kolonier på LBA. Blå/metalliske kolonier på RLM. Svak hemolyse på blodagar.
K96 MF3940 <i>Listeria sp.</i>	20	-	-	-	+	+	-	+	+	Turkise kolonier på LBA. Hvit/grå kolonier på RLM.
K96 MF3971 <i>S. liquefaciens</i>	20	+	+	-	+	+	-	+	-	Karakteristiske røde kolonier på VRBGA. Lett å skille fra K96.6. Noe vekst på <i>Pseud.</i> CFC.
	10	+	+	-	+	+	-	+	-	
K96.9 <i>B. thermosphacta</i>	20	-	-	+	+	+	-	+	-	Vokser på STAA.
	10	-	-	+	+	+	-	+	-	
K296.13 <i>Acinetobacter sp.</i>	20	-	(+)	-	+	+	-	+	-	Vokser på <i>Pseud.</i> CFC (hvite kolonier)
	10	-	+	-	+	+	-	+	-	
Å 228.8 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	20	-	-	-	+	+	-	+	-	Vokser godt på generelle medier
	10	-	-	-	+	+	-	+	-	
Å263.16 <i>Chryseobacterium sp.</i>	20	-	(+)	-	+	+	-	+	-	Vokser på <i>Pseud.</i> CFC (hvite kolonier). Orange/beige fargede kolonier på BHI agar og PCA.
	10	-	+	-	+	+	-	+	-	

+ god vekst (+) noe mindre vekst – ingen vekst * *Pseudomonas* CFC ** agar ***inkubering ved 37 °C i 24 t.

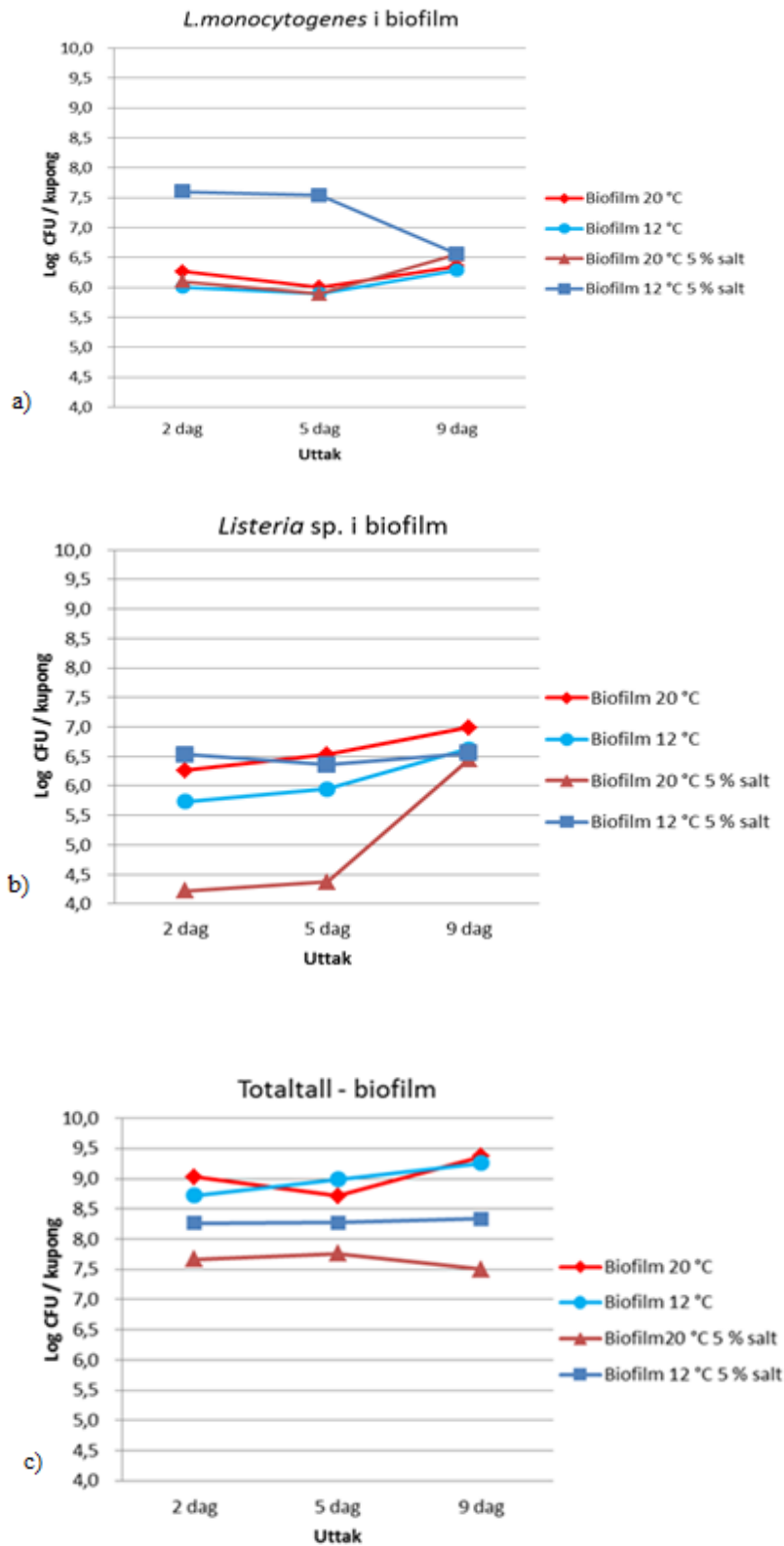
4.6.3 Forforsøk- bestemmelse av biofilm i multikultur

For å teste ut metode med hensyn på ytre faktorer og bakteriesammensetning ble et forforsøk utført. Hensikten var å utføre et forsøk med utvalgte isolater i tabell 18. Da enkelte isolater var feilpodet ved nedfrysning etter identifisering, ble bakteriesammensetningen noe annerledes. I forforsøket ble *Flavobacterium* spp. tilsatt i stedet for Å263.8 (*Stenotrophomonas maltophilia*) og Å263.16 (*Chryseobacterium* spp.). I forforsøket ble kun vekst i biofilm undersøkt.

Vekst og overlevelse for *L. monocytogenes* i biofilm vises i figur 25a på neste side. Generelt var det høye celletall av *L. monocytogenes* i multikultur. Spesielt ble det observert høyt celletall ved 12 °C og salt, men en reduksjon ble observert over tid. Det var små endringer i celletall ved de andre vekstbetingelsene, og etter 9 dager var det tilnærmet like celletall for alle vekstbetingelser.

Figur 25b viser vekst og overlevelse av *Listeria* sp. i biofilm. *Listeria* sp. viste lave celletall ved vekstbetingelsen 20 °C og 5 % salt frem til dag 5, deretter ble det observert en økning på omtrentlig 2 log CFU/kupong. Etter 9 dager ble det i likhet med *L.monocytogenes* observert tilnærmet like celletall ved samtlige vekstbetingelser.

Total antall bakterier i biofilm er vist i figur 25c. Det var få endringer i celletall ved samtlige vekstbetingelser.

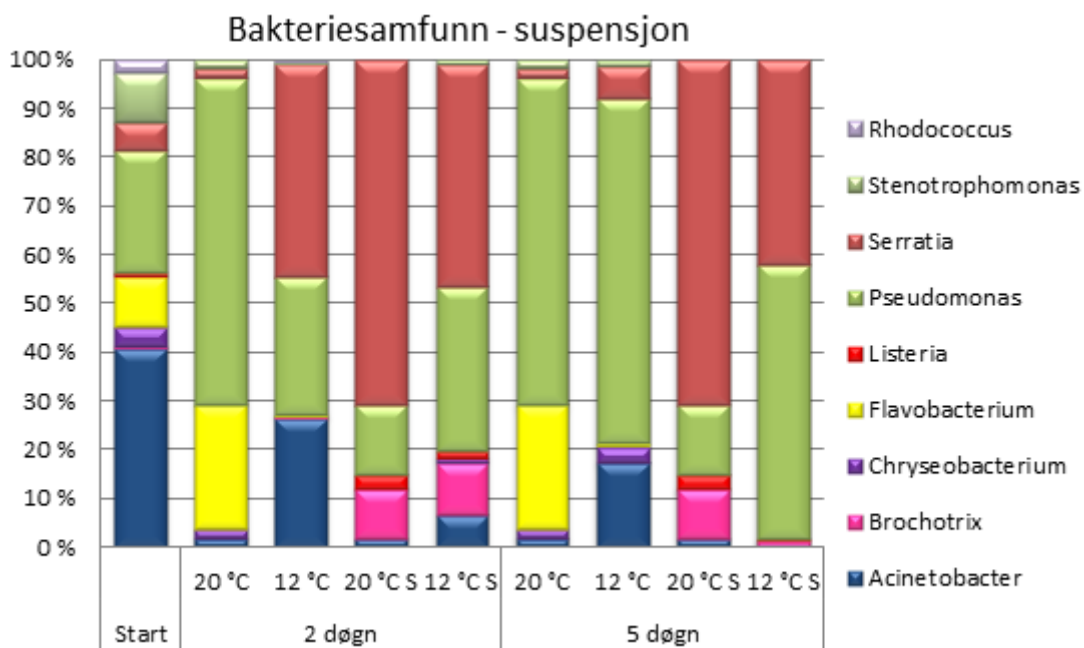


Figur 25 Bestemmelse av biofilm i multikultur, forforsøk.

a) Vekst av *L. monocytogenes* i multikultur. b) Vekst av *Listeria* sp. i multikultur. c) Total antall bakterier i multikultur. Resultatene er oppgitt i log CFU /kupertong.

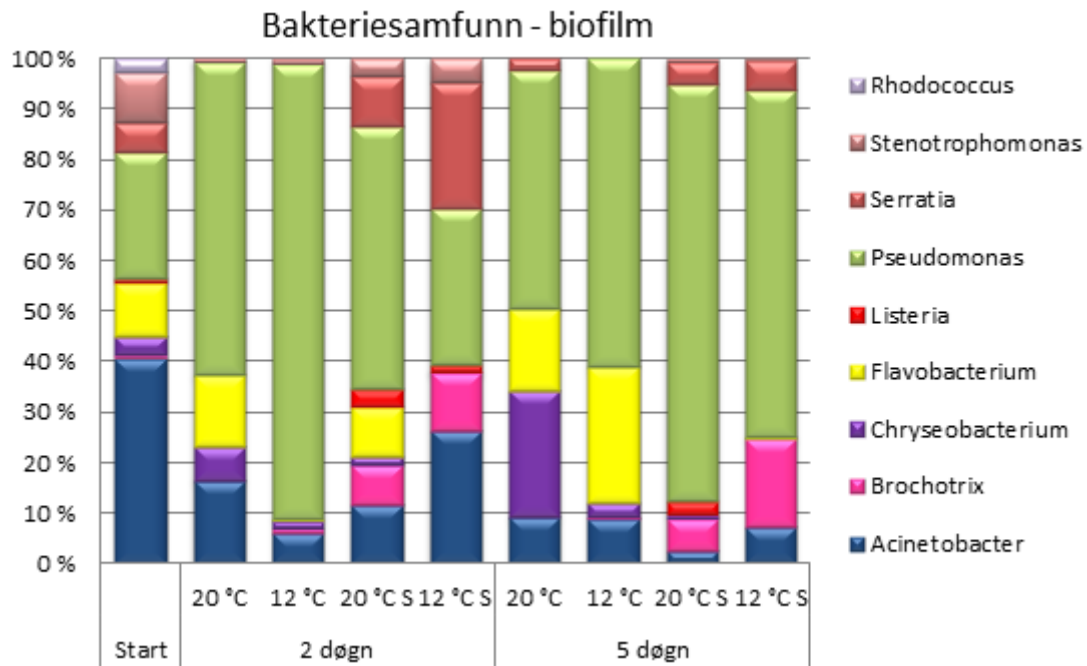
4.6.4 Bakteriesamfunnsanalyse vha. 454 pyrosekvensering av multikultur forforsøk

For å se hvilke bakterier som dominerte ved gitte vekstbetingelser ble en bakteriesamfunnsanalyse av startblanding, suspensjon og biofilm utført. Resultatene fra bakteriesamfunnsanalysen for suspensjon, samt startblanding er gitt i figur 26. Figuren viser at det var tilsatt en større andel *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. i startblandingen. Etter 2 døgn viste resultatene at det var dominans av *Pseudomonas* spp. ved 20 °C, mens *Serratia* sp. utgjorde dominerende populasjon i suspensjon ved de andre vekstbetingelsene ved dette uttaket. Etter 5 dager var det ingen større endringer i bakteriesammensetning ved 20 °C og 20 °C salt, men *Pseudomonas* spp. utgjorde ved dette uttaket en større andel ved 12 °C og 12 °C salt enn ved dag 2. *Listeria* ble kun observert i startblanding og i nærvær av salt. Bakterien utgjorde høyest andel ved 20 °C og salt. *Rhodococcus* spp. ble kun registrert i startblandingen.



Figur 26 Bakteriesamfunnsanalyse av suspensjon i multikultur ved ulike vekstbetingelser etter 2 og 5 døgn. Start viser bakteriesammensetningen i startblandingen. Startblandingen ble inkubert ved 15 °C i tre timer for å la bakteriecellene feste seg til stålkupongen. Suspensjonen rundt ble deretter pipettert av. Ved døgn 2 er bakteriefloraen i suspensjonen bakteriene som har løsnet fra biofilmen.. S = salt

Bakteriesamfunnsanalyse for biofilm og startblanding ved ulike betingelser er presentert i figur 27. *Serratia* sp. utgjorde en mindre andel i biofilm enn i suspensjon. *Pseudomonas* spp. utgjorde dominerende populasjon i biofilm ved samtlige betingelser (også salt). *Listeria* spp. ble kun registrert i nærvær av salt, og utgjorde høyest andel ved 20 °C og salt. *Rhodococcus* spp. ble kun registrert i startblandingen.



Figur 27 Bakteriesamfunnsanalyse av biofilm i multikultur ved ulike vekstbetingelser etter 2 og 5 døgn.

Start viser bakteriesammensetningen i startblandingen. Startblandingen ble inkubert ved 15 °C i tre timer for å la bakteriecellene feste seg til stålkupongen. Suspensjonen rundt ble deretter pipettert av. Ved døgn 2 viser da søylene bakteriefloraen som befinner seg i biofilm (på stålkupong). S = salt

5 Biofilm hovedforsøk

5.1 Multikultur

Totalt 15 isolater ble dyrket sammen med *L.monocytogenes* og *Listeria* sp. i multikultur biofilm (tabell 18). Hensikten var å studere dynamikken i bakteriesamfunn under forhold som simulerer produksjonsmiljøet i en laksebedrift ved å se på effekt av ytre faktorer som temperatur og salt. Videre var målet å undersøke betydningen av bakgrunnsflora med hensyn på overlevelse av *L. monocytogenes* i biofilm. Resultatene er basert på gjennomsnittet av to parallelle kuponger per uttak fra ett forsøk. Resultatene viste lave standardavvik for de ulike prøvepunktene både i suspensjon og biofilm (tabell 22). Det ble også utført et forsøk til med to parallelle kuponger per uttak, men disse resultatene er kun presentert som rådata i vedlegg 6.

Tabell 22 Standardavvik i multikultur

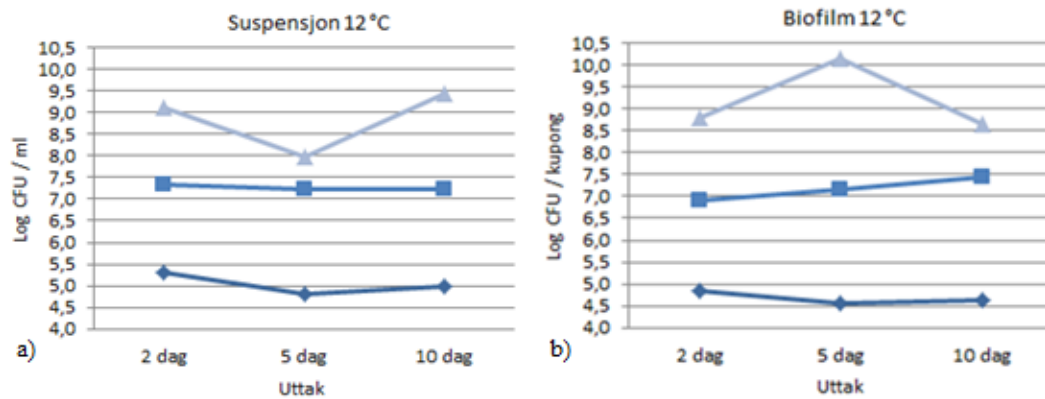
	Suspensjon	Biofilm
	Ø (log CFU/ml)	Ø (log CFU /cm ²)
<i>L.monocytogenes</i>	0,062	0,059
<i>Listeria</i> sp.	0,040	0,034
Total antall bakterier	0,085	0,059

5.1.1 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 12 °C

Bakterietall i suspensjon ved 12 °C, fremstilt i log CFU/ml som funksjon av tid, er vist i figur 28a. Det ble registrert celledtall på 7,3 log CFU /ml for *Listeria* sp. dag 2, med små endringer frem til dag 10. *Listeria monocytogenes* hadde en nedgang i celledtall på 1 log CFU/ml fra dag 2 til dag 5 og deretter en økning på 1,5 log CFU/ml fra dag 5 til dag 10.

Figur 28b viser vekst i biofilm fremstilt som log CFU/kupong, plottet mot tid. Figuren viser høyere celledtall for *Listeria* sp. enn *L. monocytogenes* i biofilm ved 12 °C. Ved dag 2 var det et høyt celledtall for *Listeria* sp. i biofilm (6,9 log CFU / kupong), med en differanse på 2 log CFU/kupong mellom *L.monocytogenes* og *Listeria* sp.

En liten nedgang i log CFU/kupong ble observert fra dag 2 til dag 5 for *L.monocytogenes*. Det ble ikke observert endringer i celletall fra dag 5 til dag 10. Total antall bakterier i biofilm var 8,8 log CFU/kupong etter 2 døgn, deretter ble det registrert en økning til 10,2 log CFU/kupong etter 5 dager, og en nedgang på 2 log CFU/kupong fra dag 5 til dag 10.



Figur 28 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 12 °C

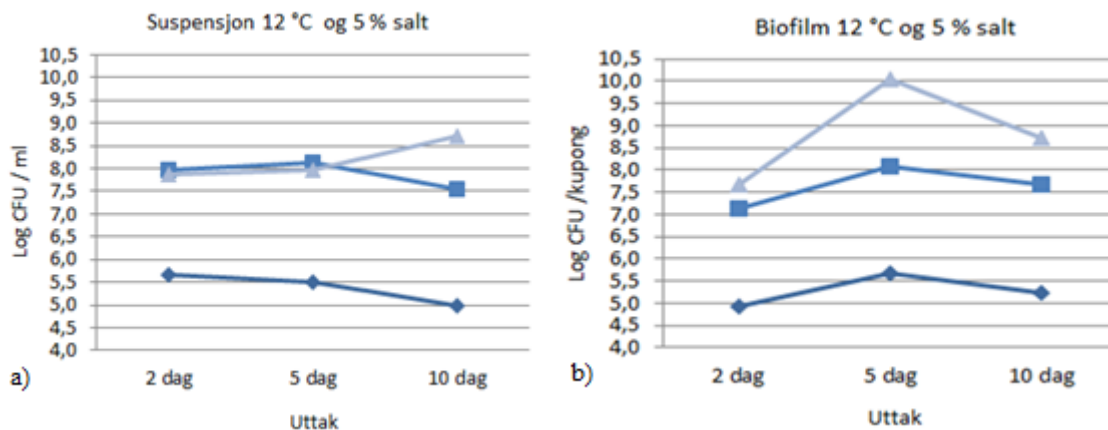
a) Vekst i suspensjon ved 12 °C, b) Vekst i biofilm ved 12 °C.

Total antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L.monocytogenes* (◆).

5.1.2 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 12 °C og 5 % salt

Figur 29a viser bakterietall i suspensjon (over kupong) ved 12 °C og 5 % salt fremstilt som log CFU/ml, som funksjon av tid. Det ble registrert celletall på 8 log CFU/ml for *Listeria* sp. frem til dag 5, etterfulgt av en reduksjon på 0,5 log CFU/ml fra dag 5 til dag 10. Samme trend ble observert for *L. monocytogenes*, men celletallet var hele 2,5 log CFU/ml lavere ved samtlige uttak. Celletall for total antall bakterier i suspensjon var lavest dag 2 (7,9 log CFU/ml) og høyest dag 10 (8,7 log CFU/ml).

Bakterietall i biofilm ved 12 °C og 5 % salt er fremstilt i figur 29b som log CFU/kupong, plottet mot tid. Det ble registrert høyere celletall for *Listeria* sp. i biofilm, enn *L. monocytogenes* de 5 første dagene. Til tross for dette viste de samme trender i vekst, med en økning i log CFU/ kupong fra dag 2 til dag 5 og en nedgang i CFU/kupong fra dag 5 til dag 10. Vekst av total antall bakterier i biofilm var lavest dag 2 (7,7 log CFU/kupong) og høyest dag 5 (10 log CFU/kupong).



Figur 29 Bestemmelse av vekst i suspensjon og biofilm i multikultur ved 12 °C og 5 % salt.

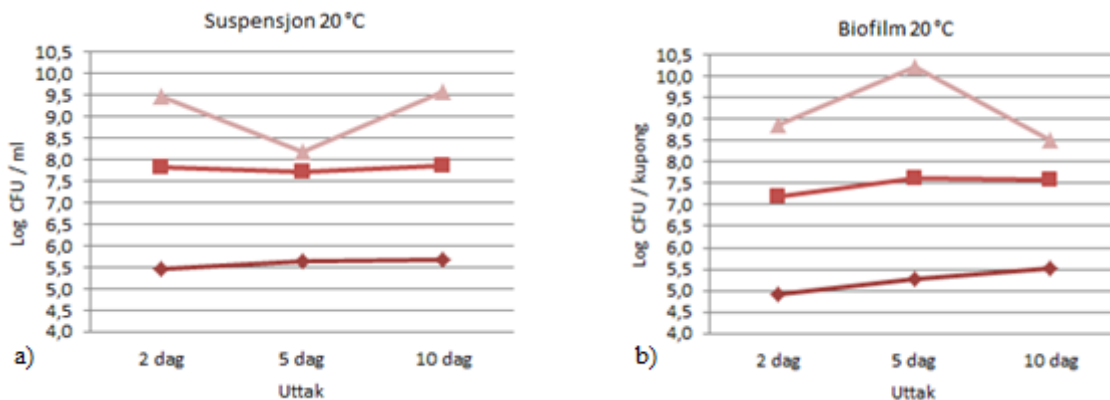
a) Vekst i suspensjon ved 12 °C og 5 % salt, b) Vekst i biofilm ved 12 °C og 5 % salt.

Total antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L. monocytogenes* (◆).

5.1.3 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 20 °C

Figur 30a viser celletall i suspensjon (over kupong) ved 20 °C fremstilt som log CFU/ml, plottet mot tid. *Listeria* sp. hadde høyere celletall i suspensjon (7,8 log CFU/ml) enn *L. monocytogenes* (5,5 log CFU/ml) dag 2. Det ble ikke registrert noen vesentlige endringer i celletall fra dag 2 til dag 10. Total antall bakterier i suspensjon var høyest dag 10 (9,6 log CFU/ml).

Celletall i biofilm ved 20 °C er vist i figur 30b, og fremstilt som log CFU/kupong, som funksjon av tid. *Listeria* sp. hadde høyere celletall enn *L. monocytogenes*. Det ble registrert høyest celletall dag 5 (7,6 log CFU /kupong), deretter ble det ikke observert endringer i celletall. *Listeria monocytogenes* hadde en svak lineær økning fra dag 2 til dag 10, men antall celler i biofilm var til tross for dette 2 log CFU/kupong lavere enn *Listeria* sp. Total antall bakterier viste høye celletall (10,2 log CFU/kupong) i biofilm etter fem dager, men hadde en nedgang i CFU/kupong på 1,7 log fra dag 5 til dag 10.



Figur 30 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 20 °C

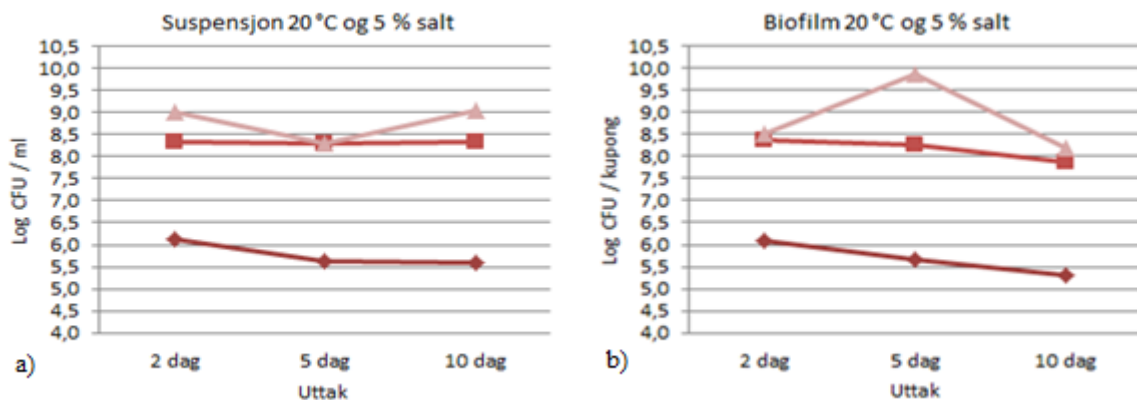
a) Vekst i suspensjon ved 20 °C, b) Vekst i biofilm ved 20 °C.

Total antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L. monocytogenes* (◆)

5.1.4 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 20 °C og 5 % salt

Vekst i suspensjon (over kupong) ved 20 °C og 5 % salt er vist i figur 31a. Resultatene er fremstilt som log CFU/ml, plottet mot tid. Celletall for *Listeria* sp. var høyere (8,3 log CFU/ml) enn *Listeria monocytogenes* (6,1 log CFU/ml) ved dag 2. Det ble ikke registrert endringer i celletall for *Listeria* sp. fra dag 2 og frem til dag 10. *Listeria monocytogenes* hadde en liten nedgang i celletall fra dag 2 til dag 10. Celletallet for total antall bakterier i suspensjon var høyest dag 2 og dag 10 (9 log CFU/ml) og lavest dag 5 (8,8 log CFU/ml).

Figur 31b viser antall celler i biofilm ved 20 °C og 5 % salt, fremstilt som log CFU/kupong, som funksjon av tid. *Listeria* sp. hadde høyere celletall enn *L.monocytogenes* ved samtlige uttak, og en liten nedgang i celletall ble observert for begge bakterier over tid. Total antall bakterier var høyest ved dag 5 (9,8 log CFU /kupong) etterfulgt av en nedgang i celletall på 1,6 log CFU/kupong fra dag 5 til dag 10.



Figur 31 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i multikultur ved 20 °C og 5 % salt

a) Vekst i suspensjon ved 20 °C og 5 % salt, b) Vekst i biofilm ved 20 °C og 5 % salt.

Total antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L. monocytogenes* (◆)

5.1.5 Hovedtrekk – multikultur

Listeria monocytogenes:

- Små endringer i celletall i suspensjon og biofilm over tid.
- Utgjør en liten del av totalfloraen ved de fleste betingelser.

Listeria sp.:

- Dominerer ofte i nærvær av salt.
- Ligger stort sett 2 log over *L. monocytogenes* ved samtlige betingelser, både i suspensjon og biofilm.

Total antall bakterier:

- Liten effekt av salt på totaltall – men påvirker flora.
- Større endringer i celletall i suspensjon og biofilm over tid.
- Høyere celletall i biofilm enn i suspensjon ved samtlige betingelser, dag 5.

5.2 Duokultur

Listeria monocytogenes og *Listeria* sp. ble dyrket opp i duokultur biofilm under samme betingelser som for multikultur. Hensikten var å undersøke vekst og biofilmdannelse uten en bakgrunnsflora til stede. Resultatene er basert på gjennomsnittet av to parallelle kuponger per uttak fra ett forsøk. Det var lave standardavvik for de ulike prøvepunktene både i suspensjon og biofilm (tabell 23). Det ble også utført et forsøk til med to parallelle kuponger (gjentak) per uttak, men disse resultatene er kun presentert som rådata i vedlegg 6.

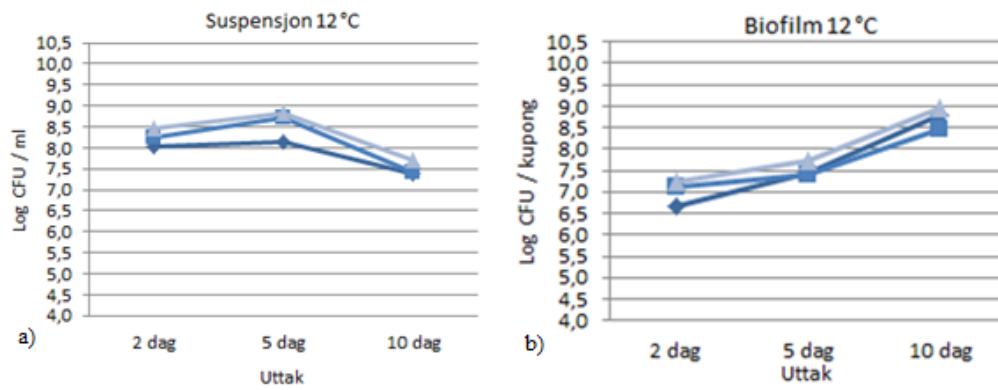
Tabell 23 Standardavvik i duokultur

	Suspensjon	Biofilm
	$\bar{\sigma}$ (log CFU/ml)	$\bar{\sigma}$ (log CFU/cm ²)
<i>L.monocytogenes</i>	0,14	0,14
<i>Listeria</i> sp.	0,11	0,11

5.2.1 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 12 °C

Figur 32a viser celletall i suspensjon ved 12 °C fremstilt som log CFU/ml, som funksjon av tid. Det var små forskjeller i celletall for *Listeria* sp. og *L. monocytogenes* ved denne vekstbetingelsen. Det ble også registrert en nedgang i celletall for begge fra dag 5 til dag 10.

Celletall i biofilm ved 12 °C er fremstilt som log CFU/kupong, som funksjon av tid og presentert i figur 32b. *Listeria monocytogenes* og *Listeria* sp. hadde et forholdsvis likt vekstmønster. Det ble registrert et høyere celletall for *Listeria* sp. (7,1 log CFU/kupong) ved dag 2 sammenlignet med *L.monocytogenes* (6,4 log CFU/kupong). Dag 5 var det ingen vesentlige forskjeller i celletall. Fra dag 5 til dag 10 ble det registrert en økning på omtrentlig 1 log CFU/kupong for begge bakterier.



Figur 32 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 12 °C

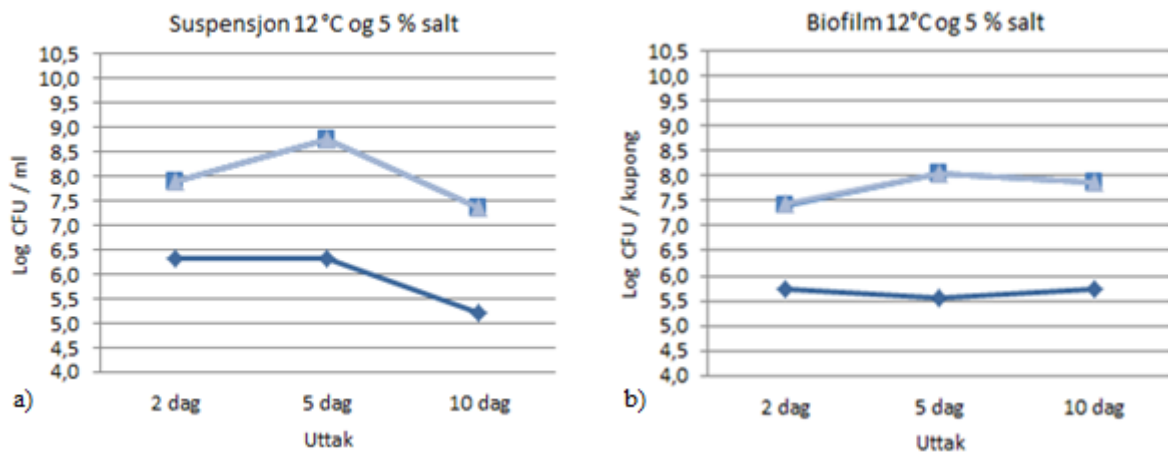
a) Vekst i suspensjon ved 12 °C, b) Vekst i biofilm ved 12 °C.

Totalt antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L.monocytogenes* (◆).

5.2.3 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 12 °C og 5 % salt

Resultater for suspensjon ved 12 °C og 5 % salt er gitt i figur 33a. Celletall er fremstilt som log CFU/ml, som funksjon av tid. Det ble observert høyere celletall for *Listeria* sp. enn *L. monocytogenes* ved denne vekstbetingelsen.

Figur 33b viser antall celler i biofilm ved 12 °C og 5 % salt fremstilt som log CFU/ kupong, som funksjon av tid. Det ble registrert høyere celletall for *Listeria* sp. enn *L. monocytogenes*.. For *L. monocytogenes* ble det ikke observert endringer i celletall fra dag 2 til dag 10.



Figur 33 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 12 °C og 5 % salt

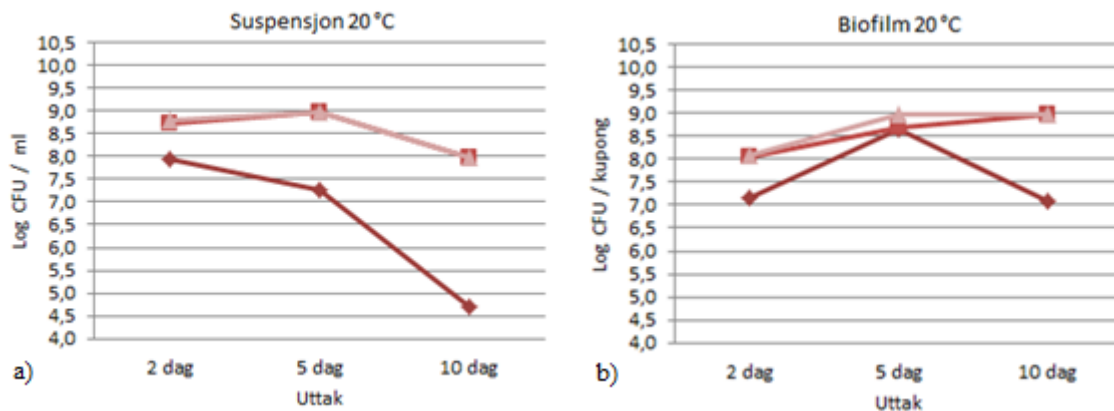
a) Vekst i suspensjon ved 12 °C og 5 % salt, b) Vekst i biofilm ved 12 °C og 5 % salt.

Totalt antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L. monocytogenes* (◆).

5.2.4 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 20 °C

Figur 34a viser celletall i suspensjon ved 20 °C fremstilt som log CFU/ml, som funksjon av tid. *Listeria monocytogenes* hadde et celletall på 7,9 log CFU/ml frem til dag 2, deretter ble det registrert en nedgang på omtrentlig 3 log CFU/ml fra dag 2 til dag 10. *Listeria* sp. hadde i likhet med *L. monocytogenes* høyt celletall dag 2. Det ble imidlertid registrert en log reduksjon i CFU/ml fra dag 5 til dag 10.

Celletall i biofilm ved 20 °C er gitt i figur 34b, og oppgitt i log CFU /kupong, som funksjon av tid. *Listeria monocytogenes* hadde en log økning fra dag 2 (7,2 log CFU/kupong) til dag 5 (8,6 log CFU/kupong), etterfulgt av en nedgang i celletall fra dag 5 til dag 10 på log 1,4 CFU/kupong. *Listeria* sp. viste et helt annet vekstmønster med høyest celletall dag 10 (9 log CFU/kupong). Total antall celler i biofilm var høyest dag 5 og 10 (9 log CFU/kupong), og lavest dag 2 (8,1 log CFU/kupong).



Figur 34 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur ved 20 °C

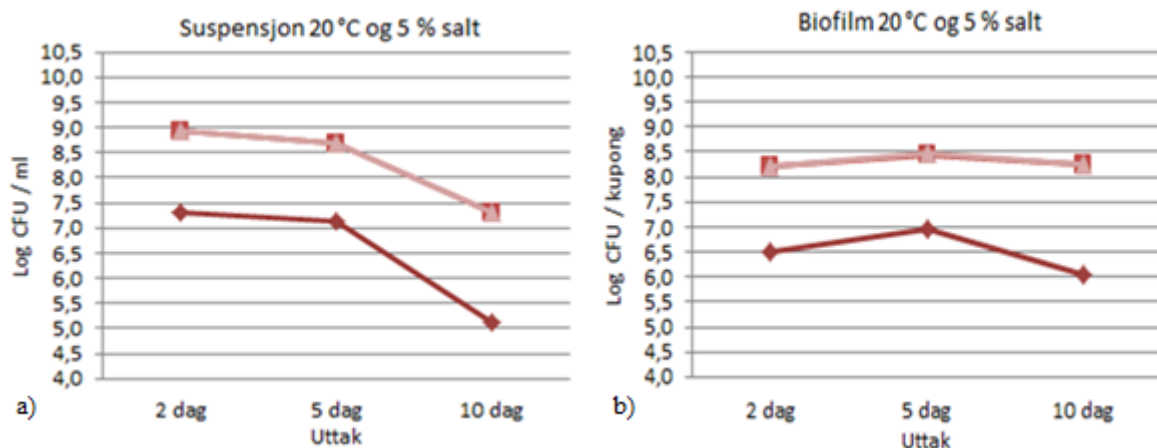
a) Vekst i suspensjon ved 20 °C, b) Vekst i biofilm ved 20 °C.

Totalt antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L. monocytogenes* (◆)

5.2.5 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur 20 °C og 5 % salt

Resultater for celletall i suspensjon ved 20 °C og 5 % salt er vist i figur 35a. Celletall er fremstilt som log CFU/ml, som funksjon av tid. Total antall bakterier var høyest dag 2 (8,9 log CFU/ml), og lavest dag 10 (7,3 log CFU/ml). Celletall var høyere for *Listeria* sp. enn for *L.monocytogenes* ved denne vekstbetingelsen. Det ble observert et forholdsvis likt vekstmønster for *Listeria* sp. og *L.monocytogenes*; med høyest celletall dag 2, etterfulgt av en reduksjon i celletall fra dag 5 til dag 10.

Figur 35b viser celletall i biofilm ved 20 °C og 5 % salt, fremstilt som log CFU/kupong, som funksjon av tid. *Listeria* sp. hadde et høyere celletall enn *L.monocytogenes* ved denne vekstbetingelsen. Mens ingen endringer i celletall ble observert for *Listeria* sp. fra dag 5 til dag 10, ble det registrert en reduksjon i CFU/kupong for *L.monocytogenes*.



Figur 35 Bestemmelse av biofilm og vekst i suspensjon i duokultur 20 °C og 5 % salt

a) Vekst i suspensjon ved 20 °C og 5 % salt b) Vekst i biofilm ved 20 °C og 5 % salt.

Total antall bakterier (▲), *Listeria* sp. (■), *L.monocytogenes* (◆)

5.2.6 Hovedtrekk - duokultur

Listeria monocytogenes:

- Økning i celletall ved 12 °C over tid i biofilm.
- Ingen endringer i celletall ved 12 °C og salt i biofilm.
- Størst variasjon i celletall ved 20 °C i biofilm.
- Nedgang over tid ved 20 °C og salt.
- Nedgang i suspensjon fra dag 5 til dag 10 ved samtlige betingelser.

Listeria sp:

- Økning i celletall ved 12 °C over tid i biofilm.
- Ingen endringer i celletall i biofilm ved 12 °C salt og 20 °C salt.
- Liten økning i celletall ved 20 °C i biofilm.

Generelt:

- *Listeria* sp. dominerer i nærvær ved salt.
- Generelt høyere celletall av *Listeria* sp. enn *L.monocytogenes* både i suspensjon og biofilm.

6 DISKUSJON

6.1 Renhold

Et godt renhold er avgjørende for å forebygge matbåren sykdom og for å sikre holdbarheten av produktene. I oppgaven ble det vist en høyere forekomst av *L.monocytogenes* og høyere bakterietall når renholdet var utilstrekkelig. Miljøprøver fra bedrift B (uttak 1) ble tatt ut etter produksjon på et tidspunkt med utilstrekkelig renhold. Det ble observert smuss og fuktighet på samtlige overflater. Det ble også observert en god del fiskerester og smuss i langsluk uavhengig av plassering i produksjonen. Vanligvis skyldes opphopning av fiskerester og vann mangelfull drenering og/eller dårlig renhold. Bedriften hadde vakuumsug på sine sløyemaskiner, noe som gir en effektiv sløyeprosess. Ulempen er at renholdet av maskinene blir mer krevende da utstyret vanskelig lar seg demontere for total rengjøring.

Overflateprøver tatt ved utilstrekkelig renhold viste generelt høye kimtall i prøvepunkter med mye smuss og fuktighet. Som forventet var det høyere kimtall i sluk med mye smuss og vann enn sluk med lite smuss. Spesielt tydelig var sammenhengen mellom renhet og kimtall på transportbånd. Resultatene viste lave log-verdier for bånd uten smuss sammenlignet med de med smuss. Transportbånd med høye kimtall var laget av plast, men var av en leddet utgave. Det høye kimtallet kan ha en sammenheng med utformingen, som muligens resulterer i opphopning av vann og fiskerester, samtidig som båndet er vanskelig å rengjøre.

Resultatene for kimtall i overflateprøver tatt etter renhold var svært sprikende. Kimtallet var generelt høyt på transportbånd i bedrift D, sammenlignet med transportbånd i bedrift A og B. Det ble også registrert store forskjeller i kimtall for vakuumutstyr og sluk i bedrift C. Høye kimtall kan tyde på at renholdet ikke var tilstrekkelig. Utilstrekkelig renhold kan avhenge av flere faktorer; blant annet feil bruk (temperatur, konsentrasjon og kontaktid), feil middel, menneskelig svikt eller at selve utformingen på utstyret/materialet er vanskelig å gjøre rent (Simões et al. 2010).

Listeria monocytogenes ble påvist i 11 av 13 overflateprøver fra bedriftsbesøket i bedrift B (uttak 1). Dette innebar prøvepunkter som sluk, transportbånd og vakuumutstyr. Tidligere undersøkelser har vist at *L. monocytogenes* er blitt isolert fra tilsvarende overflater (Slade 1992; Tompkin et al. 1999). Siden *L.monocytogenes* kun ble påvist ved oppformering i Fraser

buljong, og utplating på selektivt medie, RLM, utgjør funnet i denne bedriften trolig mindre enn 10 % av den totale floraen i de respektive prøvepunktene.

Det var lavere forekomst av *Listeria* på overflater hvor det var utført ordinært renhold. Bedrift A, prøvepunkt K96, var eneste overflateprøve med positivt funn av *L.monocytogenes* etter ordinært renhold. I dette prøvepunktet utgjorde *L.monocytogenes* sammen med *Listeria* sp. en andel på 16,67 % av den totale bakteriefloraen. Den høye forekomsten av *L.monocytogenes* etter utilstrekkelig renhold er sammenfallende med tidligere undersøkelser. Chasseignaux et al. (2002) tok prøver fra fem kjøttbedrifter og klassifiserte prøvepunkt ut fra overflatetype, renhet, visuell status, fuktighet, temperatur og pH til overflaten. *Listeria* ble isolert fra nesten halvparten (ca. 40 %) av prøvene under produksjon. Etter vask og desinfeksjon var 12-13 % positive. Resultatene i dette forsøket bekrefter at dårlig renhold har stor betydning for forekomst av *Listeria* i produksjonsmiljøet.

Tidligere besøk utført av Nofima, har vist at bedrift A, C og D har hatt gode renholdsrutiner med god opptørking. Den lave forekomsten av *Listeria* kan dermed tyde på at bedriftene har opprettholdt disse rutinene. At det ikke ble påvist *Listeria* i enkelte sluk ved bedriftsbesøket, kan ha sammenheng med at disse var noe renere enn andre sluk. Tilstedeværelse av inhiberende mikroorganismer kan også forklare hvorfor noen overflater ikke er kontaminert med *Listeria* (Carpentier & Chassaing 2004). Det presiseres imidlertid at overflateprøvene ikke er tatt av en og samme person. Selv om hver enkelt bedrift har fulgt anvisninger ved uttak av overflateprøver, kan det være tilfeller hvor *Listeria* likevel er tilstede på overflaten. Dette kan blant annet skyldes ulik teknikk, ulik mengde prøvemateriale ved svabring, eller at *Listeria* sitter bedre fast på noen typer materialer.

6.2 Bakterief flora

Resultatene viste at bakterief floraen varierte mellom bedrift til bedrift og innad i produksjonsmiljøet. Totalt ble det isolert 30 forskjellige bakterieslekter, men bare 2 (*Pseudomonas* og *Acinetobacter*) ble isolert fra alle fire bedriftene. Temperaturen i produksjonsmiljøet i et lakseslakteri ligger mellom 10-12 °C. Dette var også tilfelle i disse bedriftene (Langsrud 2012). Under slike forhold vil bakterier som vokser raskt ved lave temperaturer ha konkurransefortrinn. Floraen vil under slike forhold domineres av psykrotrofe bakterier som *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. (Garbeva et al. 2011). Funnet i denne oppgaven bekrefter dette.

Resultatene i denne oppgaven bekrefter at det er en sammenheng mellom dårlig renhold og høyere diversitet. Mer enn halvparten (18 av 30) av bakterief floraen ble isolert fra bedrift B (uttak 1) etter utilstrekkelig renhold. Høy bakterievekst og diversitet skyldes som regel dårlig renhold, fuktighet og/eller for høy temperatur i produksjonsmiljøet (Tompkin et al. 1999).

Bakterief floraen var typisk for det man finner på fisk. På overflater hvor det var utført ordinært renhold bestod floraen hovedsakelig av Gram-negative bakterier som *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Chryseobacterium* spp. og *Acinetobacter* spp.. På overflater med utilstrekkelig renhold ble det isolert en mer divers flora bestående av blant annet Gram-negative bakterier som *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Shewanella* spp., *Myroides* spp., *Acinetobacter* spp. og *Aeromonas* spp., samt Gram-positive bakterier som *Kurthia* spp., *Micrococcus* spp. og *Listeria* spp.

Pseudomonas spp., *Shewanella* spp., *Acinetobacter* spp. og *Aeromonas* spp. er typiske forringelsesbakterier og er ofte isolert fra fisk. *Pseudomonas* spp. og *Shewanella* spp. har evnen til å kolonisere overflater og utstyr i produksjonsmiljøet og er dermed en viktig årsak for kontaminering av råvarer (Bagge et al. 2001; Kumar & Anand 1998). Enkelte arter av *Aeromonas* (*Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*) kan forårsake sykdom (furunkulose) (Ringø et al. 2004) i form av sår og byller i hud og muskulatur hos laks. Gjeller og sår i skinn regnes som innfallsporter for denne bakterien (Brun 2001). I oppgaven ble bakterien kun identifisert til slektsnivå. *Chryseobacterium* spp., *Myroides* spp. og *Flavobacterium* spp. tilhører familien *Flavobacteriaceae* og er vidt utbredt i vann. *Flavobacterium* spp. er vanlig ved gjellebetennelse hos fisk (Veterinærinstituttet 2003).

Det var bedrifter som skilte seg ut med større diversitet i bakteriesammensetning etter renhold. I bedrift D var det høy diversitet og høye kimtall på transportbånd. Dette indikerte at renholdet ikke har vært tilstrekkelig i bedrift D.

Det viste seg at samme type prøvepunkter utgjorde ulik flora mellom bedrifter. Floraen på transportbånd i bedrift B (uttak 2) og bedrift A (uttak 2) bestod hovedsakelig av Gram-negative bakterier som *Pseudomonas* spp. og *Serratia* spp., samt en mindre andel av bakterier som *Hafnia* spp., *Rahnella* spp. og *Providencia* spp.. Floraen på transportbånd i bedrift D bestod derimot av Gram-negative bakterier som *Shewanella* spp., *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp., *Aeromonas* spp. og Gram-positive bakterier som *Rhodococcus* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Carnobacterium* spp. og *Leucobacter* sp..

Resultatene viste at floraen i et prøvepunkt kunne variere over tid. Ved uttak 1 (K96) og uttak 2 (K296) i bedrift A ble overflateprøvene ble tatt ut med et halvt års mellomrom, etter renhold og før produksjon. Ved første uttak fra K96 (mars) ble det isolert en mer divers flora, samt funn av *L.monocytogenes* og *Listeria* sp. Ved neste uttak (oktober) ble det ikke påvist *Listeria*, og *Pseudomonas* spp. utgjorde ved dette tidspunkt dominerende populasjon. Resultatene indikerer at *Listeria* kun var sporadisk til stede ved første uttak, men det kan også være forskjeller i vask og/eller desinfeksjonsprosess ved disse to uttakene, selv om det ikke var noen vesentlige forskjeller i kimtall.

Det ble observert en del variasjoner i floraen mellom prøvepunkter i samme bedrift. Da det antydes at *L. monocytogenes* er tolerant for stress fra omgivelsene (salt, vannaktivitet og temperatur) ble det i tillegg til vakuumutstyr valgt å ta med overflateprøver fra røykevogn og sluk ved salting i bedrift C. Floraen isolert fra sluk ved salting var mindre divers enn floraen isolert fra røykevogn (L333) og vakuumutstyr (kun L337). Dette var som forventet da mange bakterier ikke trives i nærvær av salt. Man skulle imidlertid tro at floraen i sluk ved salting utgjorde en høyere andel halotolerante bakterier, som *Vibrio* spp.. I det ene sluket ble imidlertid ingen arter isolert fra denne slekten. Siden en god del kolonier ikke ble identifisert i dette prøvepunktet, kan denne floraen bestå av flere typer bakterier. Det høye kimtallet tyder også på at floraen er mer divers enn hva man kan se i resultatene fra 16S rDNA sekvenseringen.

Det ble observert ulik flora i samme type utstyr plassert rett ved siden av hverandre i bedriften. På grunnlag av koloniene isolert, var det så å si ingen likheter i bakteriesammensetning i vakuumutstyret (L324 og L337). Mens det ble isolert bakterier som *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. og *Acinetobacter* spp. fra prøvepunkt L324, var bakteriesammensetningen i prøvepunkt L337 mer lik floraen isolert fra L333 (røykevogn). Floraen isolert fra L324 kan tyde på bedre renhold, og at seleksjonen har oppstått på grunn av resistens eller svikt i desinfeksjonsprosessen. Siden miljøet i en røykevogn vanligvis er mye tørrere enn miljøet i vakuumutstyr, forventet man større forskjeller i floraen mellom prøvepunktene L333 (røykevogn) og L337 (vakuumutstyr). Hvorfor det ikke var større forskjell er uklart. Da en høy andel kolonier ikke ble identifisert er det vanskelig å påstå noe om bakteriesammensetningen. Det høye kimtallet i prøvepunktet, L337, kan imidlertid forklare forskjellen i diversitet mellom L324 og L337 (vakuumutstyr).

Som nevnt over ble det ikke funnet at enkeltbedrifter hadde egne særegne floraer, eller at floraen var karakteristisk for spesielle typer utstyr eller overflater. Det ble tatt ut prøver som var vanskelig å rengjøre, og kanskje resultatet hadde blitt mer entydig dersom man hadde kun prøver fra svært rene flater. Likevel ble det sett noen fellestrekk. Selv om floraen isolert fra produksjonsmiljøet var lik fiskens naturlige mikroflora, har det oppstått seleksjoner etter vask/desinfeksjon. På transportbånd K296 og KA i bedrift A ved uttak 2, var dominerende populasjon *Pseudomonas* spp.. *Pseudomonas* spp. var også dominerende populasjon på transportbånd F226 i bedrift B, uttak 2. Høy forekomst av *Pseudomonas* kan indikere svikt i desinfeksjonsprosessen, eller at bakterien kan være resistent mot desinfeksjonsmiddelet (som for eksempel kvarternære forbindelser) (Guðbjörnsdóttir et al. 2005). Resultatene er i samsvar med undersøkelsen utført av Bagge-Ravn et al. (2003), hvor dominerende populasjon etter vask og desinfeksjon var ulike arter av *Pseudomonas*. Resultatene i denne oppgaven er også i overenstemmelse med det som er tidligere rapportert for *Pseudomonas* spp. ved at bakterien kan overleve på mindre næring, har bedre evne til å feste seg til overflater og er mer resistent mot desinfeksjonsmidler enn andre bakterier. Siden *Pseudomonas* spp. kan overleve på svært lite næring, bør det også ta forbehold om at det kan ha oppstått en seleksjon i svaberprøvene fra prøveuttaking til analyse. Man kan derfor ikke si med sikkerhet at forekomsten av *Pseudomonas* spp. er nøyaktig den samme ute i produksjonsmiljøet. Samtidig er *Pseudomonas* spp. en psykrotrof bakterie som ofte er å finne i slike produksjonsmiljøer, og den er ofte isolert fra fisk.

Andre konkurrenter var *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. og *Rhodococcus erythropolis*. Hovedsakelig ble *Serratia* spp. identifisert i familien *Enterobacteriaceae* uavhengig av bedrift og prøvepunkt. På transportbånd F227 i bedrift B (uttak 2) utgjorde bakterien dominerende populasjon. *Serratia* spp. er vidt utbredt i naturen (Guðbjörnsdóttir et al. 2005) og kan ha høy resistens (Langsrud et al. 2003b). Tidligere studier tyder på at det er høy sannsynlighet for å finne *Serratia* spp. på utstyr i produksjonsmiljøet. Funnet i denne oppgaven er delvis i samsvar med en undersøkelse utført av Guðbjörnsdóttir et al. (2005), hvor *Enterobacteriaceae* utgjorde 27 % av den dominerende genus festet til overflater av rustfritt stål. I dette tilfellet var bakterien isolert fra plast, noe som muligens betyr at *Serratia* spp. har evnen til å feste seg til flere ulike typer materialer.

Acinetobacter spp. utgjorde hoveddelen av floraen på transportbånd Å262 i bedrift D. Bakterien er i følge litteraturen svært tolerant mot tørke, og kan vokse ved ulike temperaturforhold og pH-verdier (Bergogne-Berezin & Towner 1996; Towner 2006).

På et transportbånd i bedrift D var dominerende populasjon *Rhodococcus erythropolis*. Bakterien er vidt utbredt i miljøet, og forekommer blant annet i jord, grunnvann og sjøvann (Bell et al. 1998). Arten *Rhodococcus erythropolis* er blant annet isolert ved seks sykdomsutbrudd hos laks både i ferskvann og sjø, i et lakseanlegg i Hordaland (to utbrudd), Rogaland, to i Sogn og Fjordane og ett i Trøndelag (Flesjø et al. 2004). Det er vist at bakterien er resistent for eksponering av ulike produkter. I en undersøkelse utført av Carvahlo et al. (2004) ble bakteriens toleranse og egenskaper for overlevelse i nærvær av ulike konsentrasjoner av løselige komponenter (etanol, butanol og dimetylformamid 50 % v/v) og uløselige komponenter i vann (odecane, bis(2-ethylhexyl) phthalate og toluene, opp til 5 % v/v) undersøkt. Resultatene viste at cellene hadde mindre toleranse for eksponering av komponentene butanol og toluene. Det ble også vist at bakterien var i stand til å aggregere og beskytte populasjonen mot ytre stress. I en annen undersøkelse utført av Bore et al. (2005) ble samme art isolert fra osteproduksjon etter vask/desinfeksjon og videre karakterisert. Det ble demonstrert at stammen viste resistens, og overlevde eksponering for to ulike oksidative desinfeksjonsmidler, basert på pereddiksyre og klor. Dette indikerer at arten også trolig er i stand til å beskytte seg mot enkelte desinfeksjonsmidler, og kan forklare seleksjonen som er oppstått i dette ene prøvepunktet.

Det var ingen vesentlige forskjeller i diversitet på mellom uttak 1 og 2 isolert fra transportbånd F19, F26 og F27 (bedrift B). Dette var ikke som forventet da det ved uttak 2 var utført ordinært renhold (i følge bedriften). Den eneste forskjellen i bakteriesammensetning var reduksjonen i Gram-positive bakterier i prøvepunkt F219, og at hoveddelen av bakteriesammensetningen (etter ordinært renhold) bestod av mer resistente bakterier som *Serratia* spp. og *Pseudomonas* spp.. Resultatene er i samsvar med undersøkelsen utført av Bagge-Ravn et al.(2003) hvor det ble registrert en signifikant reduksjon av Gram-positive bakterier etter vask/desinfeksjon. Dette kan muligens bety at bedriften har benyttet et desinfeksjonsmiddel som Gram-negative bakterier (i dette tilfellet *Serratia* spp. og *Pseudomonas* spp.) er mer tolerante for. Samtidig er det vanskelig å sammenligne disse to uttakene, da en del kolonier ikke ble identifisert ved uttak 2. Det bør også presiseres at det ikke ble tatt ut prøver fra bedriften før og etter vask/desinfeksjon samme dag. Siden det gikk omtrentlig tre måneder mellom prøvetaking, kan floraen ha endret seg.

6.3 Bakteriesamfunnsanalyse av miljøprøver vha. 454 Pyrosekvensering

Resultatene i oppgaven viste store forskjeller i bakteriesammensetning identifisert med og uten dyrkningstrinn. Ved å benytte 454 pyrosekvensering uten dyrkningstrinn, ble det registrert en mer divers flora og høyere andel Gram-positive bakterier enn ved 16S rDNA sekvensering med dyrkningstrinn. Hadde man plukket 100 kolonier fra en prøve (i dette tilfelle 20 innenfor en bestemt sone) ville resultatet kanskje blitt annerledes og man hadde fått større diversitet. Samtidig er det begrenset hvor mange kolonier man kan plukke fra en skål, i tillegg til at det er svært arbeidskrevende.

Det ble vist forskjeller i dominans og bakteriesammensetning i samme prøvepunkt med og uten dyrkningstrinn. Ved 454 pyrosekvensering utgjorde *Psychrobacter* spp. og *Acinetobacter* spp. dominerende populasjon. *Psychrobacter* spp. og *Pedobacter* spp. ble kun identifisert ved 454 pyrosekvensering (uten dyrkningstrinn). *Psychrobacter* spp. ble imidlertid identifisert i andre prøvepunkter (bedrift D), noe som betyr at det er mulig å identifisere denne bakterien ved hjelp av dyrkningstrinn. Siden *Pedobacter* spp. ikke ble identifisert ved dyrkningsmetoden kan dette tyde på spesifikke krav til vekst. Faktorer som vil påvirke bakterietyper som påvises er blant annet prøvemengde, valg av næringsmedium, selektive tilsetningsstoffer (for eksempel salt eller antibiotika), inkuberingstemperatur, atmosfære og tid før avlesning av resultat (Moen 2012).

Det ble også identifisert bakterier ved dyrkningstrinn som ikke ble funnet uten dyrkningstrinn. I tillegg ble arter tilstede i lav andel påvist med 454 pyrosekvensering (uten dyrkningstrinn). Metoden 454 pyrosekvensering gir en bedre oversikt over hvilke bakterier som finnes utover de dominerende. Når man dyrker opp på skåler vil ofte bakteriene som vokser fortest dominere over de andre og man får også av den grunn en over-representasjon av de bakteriene som vokser fort ved de valgte betingelsene (Langsrud 2012). Det er samtidig vanskelig å vurdere om bakteriene identifisert ved 454 pyrosekvensering er døde eller levende når man vet lite om hvordan renholdet er gjennomført. I dette tilfellet var prøvene fra et tidspunkt med utilstrekkelig renhold noe som tyder på at floraen som ble identifisert mest sannsynlig er levende. Hadde disse prøvene blitt tatt ut på et tidspunkt med ordinært renhold ville det nok vært vanskeligere å vite hvem som var levende eller døde.

Uansett om man velger dyrkningsavhengige eller dyrkningsuavhengige metoder så vil det være fordeler og ulemper. Dyrkningsavhengige metoder vil ha begrenset egenhet der man forventer å finne et stort antall døde bakterier, og man vil kun identifisere levende bakterier som kan vokse under gitte betingelser. Dyrkningsuavhengige metoder vil kunne identifisere hele bakteriesamfunnet i en prøve, men ulemper er at metoden ikke skiller mellom levende og døde bakterier (Moen 2012).

Resultatene indikerer at det er nødvendig å kombinere begge metodene for å få et helhetlig bilde på floraen. I likhet med denne oppgaven har flere studier vist at man oppnår et mer omfattende bilde av den bakterielle sammensetningen på en overflate ved å sammenligne metoder med og uten dyrkningstrinn (Brightwell et al. 2006; Suzuki et al. 1997; van Kessel et al. 2011). van Kessel et al (2011) studerte magetarmkanalen til karpe med 454-sekvensering og fant at dyrkningsuavhengige teknikker avslørte en langt større diversitet i forhold til tidligere studier basert på dyrkning.

6.4 Biofilm

Hensikten med forsøket var å få bedre forståelse av effekt av ytre faktorer for vekst av *L.monocytogenes* i biofilm. Videre ble det undersøkt om bakgrunnsfloraen isolert fra produksjonsmiljøet etter ordinært renhold fremmet vekst av *L.monocytogenes*.

6.4.1 Uttesting av medier/dyrkningsbetingelser

Vekstforsøkene viste at det var vanskelig å bestemme bakteriesammensetningen i en blandingskultur, da også andre bakterier enn *Pseudomonas* spp. vokste på det selektive mediet *Pseudomonas* CFC. I tillegg vokste *Pseudomonas fluorescens* på selektivt medie for *Enterobacteriaceae*. Selektive medier, som skal favorisere vekst av gitte bakterietyper, er ofte ikke så selektive at de utelukker vekst av andre bakterier, og en overestimering av bakterier kan dermed forekomme. Dette kan gi et helt galt bilde av floraen (Langsrud 2012). Det finnes heller ikke selektive medier for alle bakterieartene benyttet i dette forsøket, derfor vil en slik metode sannsynligvis fungere bedre med en blandingskultur bestående av færre bakteriestammer.

6.4.2 Forforsøk multikultur

Resultatene fra forforsøket viste at det var nyttig å kombinere 454 pyrosekvensering med tradisjonelle mikrobiologiske teknikker for å oppnå mer kunnskap om betydningen av bakgrunnsfloraen for vekst og overlevelse av *L.monocytogenes* i multikultur.

Ved bare å se på celletall viste resultatene at *L.monocytogenes* hadde høye celletall ved samtlige vekstforhold og at det heller ikke var noen særlige forskjeller ved de ulike vekstbetingelsene over tid.

Resultatene i multikultur forsøket viser hvor vanskelig det er å trekke konklusjoner eller anta noe om betydningen av enkeltbakterier på vekst og overlevelse av *L.monocytogenes* i en blandingskultur basert på celletall. Ved å utføre en bakteriesamfunnsanalyse ble det vist at *Flavobacterium* spp. ikke hadde den samme positive effekten på *L.monocytogenes* som er vist i tidligere studier da disse ikke ble registrert i samme prøvepunkt. Dette kan imidlertid variere med ulike stammer av *Flavobacterium*.

Listeria ble kun registrert i nærvær av salt i biofilm og suspensjon. Ved identifisering av bakterieflora fra produksjonsmiljøet, ble det imidlertid ikke påvist *Listeria* i sluk ved salting. I sluk ved salting ble det i det ene prøvepunktet identifisert mikroorganismer som *Pseudomonas* spp. og *Serratia* spp. *Pseudomonas* spp. utgjorde dominerende populasjon ved samtlige betingelser i biofilm for-forsøket, mens *Serratia* spp. utgjorde en mindre andel. Siden det ble tatt ut overflateprøver fra kun to prøvepunkter i produksjonsmiljøet ved salting er det vanskelig å trekke en konklusjon av floraen basert på disse dataene.

6.4.3 Laksebuljong som vekstmedie

Sammensetningen av vekstmediet kan ha innvirkning på evnen til å feste seg til overflaten (Hood & Zottola 1997). I forsøket ble laksebuljong laget av fersk laks benyttet som vekstmedie. Dette skulle simulere smuss i produksjonsmiljøet. Innledende vekstforsøk og vekst på lakseagar, viste at isolatene vokste godt i laksebuljong og på lakseagar. Tidligere studier har også vist at *L.monocytogenes* fester seg til stålkuponger med fiskebuljong som vekstmedie (Gram et al. 2007). Resultatene for vekstforsøket og biofilm-forsøk i denne oppgaven bekrefter dette.

6.4.4 Multikultur

Listeria monocytogenes utgjorde i dette forsøket en liten andel av total antall bakterier, noe som samsvarer med det man fant i produksjonsmiljøet.

Listeria monocytogenes viste små endringer i celletall ved 12 °C i multikultur. Resultatene i dette forsøket er delvis i samsvar med andre studier. Jeong et al. (1994) undersøkte vekst av *L.monocytogenes* i biofilm ved 10 °C og fant at *L.monocytogenes* viste en langsommere økning i multikultur, enn i monokultur. I denne oppgaven er det i imidlertid benyttet en helt annen bakteriesammensetning enn i studiet nevnt ovenfor. Enkelte av bakteriene i denne oppgaven kan ha en inhiberende effekt på *L.monocytogenes* i biofilm, men dette ble ikke undersøkt.

Listeria sp. viste bedre evne til å vokse og overleve i biofilm ved 20 °C, men *L.monocytogenes* viste likevel en svak økning i celletall over tid ved denne vekstbetingelsen. For *L.monocytogenes* er økt adhesjonsevne assosiert med høy veksttemperatur muligens på grunn av produksjonen av varmestress-proteiner på celleoverflaten (Briandet et al. 1999). I tillegg er bakterien hydrofil med overflateenergi $\sim 66 \text{ Mj/m}^2$ (Mafu et al. 1991 ; Ryser & Marth 2007), noe som kan forklare egenskapen for rask kolonisering og adhesjon (< 2t ved 20 og 37 °C). Resultatene er i samsvar med en tidligere undersøkelse hvor det ble registrert en direkte korrelasjon mellom økt temperatur og økende biofilm-dannelse av *L.monocytogenes* i multikultur (Pan et al. 2009). Dette kan forklare den positive utviklingen for *L.monocytogenes* ved høyere temperatur.

Det var ingen endringer i celletall for *Listeria* sp. og *L.monocytogenes* ved 12 (5 % NaCl) og 20 °C (5 % NaCl) i multikultur. I stedet ble det observert en nedgang i total antall bakterier, noe som indikerer at salt hadde en negativ effekt på denne bakgrunnsfloraen over tid.

Nedgangen i celletall for *L.monocytogenes* ved samtlige vekstbetingelser (unntatt 20 °C) kan muligens skyldes sammensetning av bakgrunnsflora, men også økt konkurranse om næring. Da flere studier har vist at andre bakterier kan være med på å beskytte *L. monocytogenes* ved å danne biofilm sammen eller rundt *L.monocytogenes*, forventet man at konsentrasjonen av celler i multikultur skulle øke over tid. Denne trenden ble kun observert ved 20 °C. Resultatene i denne oppgaven er i samsvar med et tidligere forsøk hvor konsentrasjonen av total antall celler i biofilm var høyere under statiske omgivelser, men at den nødvendigvis ikke økte over tid. En mulig forklaring er at overflaten kan ha nådd et metningspunkt (Hood & Zottola 1997). Samtidig kan enkelte bakterier inhibere eller stimulere veksten av *L.monocytogenes* i biofilm. Eksempler på inhiberende interaksjoner kan være produksjon av antimikrobielle substanser, samt konkurranse om plass og næring (Leriche & Carpentier 2000; Rieu et al. 2008). Produksjon av ekstracellulært materiale har vist seg å ha en positiv betydning for interaksjoner mellom bakterier i biofilm, men dette er først og fremst avhengig av type ekstracellulære polymere substanser og ikke mengde (Carpentier & Chassaing 2004; Rieu et al. 2008). Enkelte arter av slekten *Pseudomonas* øker kolonisering av *L.monocytogenes* og *Listeria innocua* på overflater (Carpentier & Chassaing 2004). Blant annet er det vist at *Pseudomonas fragi* produserer ekstracellulært materiale som trigger vekst av *L.monocytogenes* (under dynamisk omgivelser) (Sashara & Zottola 1993). Til tross for dette har andre arter i samme familie ikke denne samme effekten. I en undersøkelse utført av Carpentier & Chassaing (2004) ble totalt 29 bakteriestammer isolert fra produksjonsmiljøet etter renhold, for deretter å bli dyrket sammen med *L. monocytogenes* i duokultur. Isolatenes betydning for adhesjon og biofilmdannelse av *L.monocytogenes* på stål ble undersøkt. Forsøkene ble analysert under samme vekstforhold; TSB-YE som vekstmedie og 25 °C med 95 % RH. *Pseudomonas fluorescens* isolert fra pakning i et meieri hadde ingen effekt på vekst av *L.monocytogenes*, derimot viste det seg at *Pseudomonas fluorescens* isolert fra vegger og gulv i osteproduksjonen hadde en negativ effekt. *Serratia* sp. isolert fra transportbånd i spekematproduksjon viste en negativ effekt, mens *Stenotrophomonas maltophilia* isolert fra vegger eller gulv under osteproduksjon hadde en positiv effekt på vekst

og overlevelse av *L.monocytogenes*. Dette bekrefter at ulike arter og selv stammer har forskjellig effekt på vekst og overlevelse av *L.monocytogenes* i biofilm.

I denne oppgaven er det vanskelig å si at visse bakterier har større effekt enn andre. Man vet heller ikke hvilken betydning *Chryseobacterium* spp., *Rhodococcus* spp. og *Brochothrix* spp. har for vekst og overlevelse av *L.monocytogenes* i biofilm. Samtidig er det vist at bakgrunnsflora nødvendigvis ikke hemmer veksten av biofilm, men at *Listeria* stopper å vokse når bakgrunnsfloraen har brukt opp næringen (Guillier et al. 2008). Hvorfor *Listeria* sp. festet seg bedre og overlevde bedre enn *L.monocytogenes* i multikultur er uklart, men kan være stammeavhengig og flere undersøkelser er nødvendig for å finne ut av dette. Det kan også være at *Listeria* har høyere veksthastighet ved høy temperatur.

Det ble ikke gjennomført bakteriesamfunnsanalyse av prøvene fra dette forsøket, da det var en del tekniske problemer med maskinen (GS Junior System), noe som etterhvert førte til at den ble sendt tilbake til leverandøren.

6.4.5 Duokultur

Listeria monocytogenes overlevde generelt bedre i duokultur med en annen *Listeria* enn i multikultur og størst forskjell i celletall (sammenlignet med multikultur) ble observert ved 12 °C. *Listeria monocytogenes* viste imidlertid større variasjoner i vekst og overlevelse ved de ulike vekstbetingelsene i duokultur sammenlignet med multikultur. Dette ble ikke observert for *Listeria* sp.

Det ble registrert høyere celletall for *L.monocytogenes* ved samtlige vekstbetingelser i duokultur, noe som muligens er et resultat av mindre konkurranse om næring. Samtidig viste bakterien et helt annet vekstmønster ved 20 °C i duokultur sammenlignet med multikultur. Dette kan muligens skyldes at *L.monocytogenes* ble utsatt for mindre stress med færre konkurrenter til stede, slik at det tar lengre tid å få aktivert stress-proteiner.

7. KONKLUSJON

I oppgaven ble *kun* overflateprøver med høye kimtall identifisert med 454 pyrosekvensering (uten dyrkningstrinn). Dette gjorde at denne metoden var uegnet for overflateprøver med lavere kimtall. For identifisering av bakterieflora var derfor 16S rDNA sekvensering med dyrkningstrinn best egnet. Samtidig var det vanskelig å få gode PCR- produkter eller gode sekvenser med 16S rDNA sekvensering (med dyrkningstrinn). Hvis det ble plukket for store kolonier eller når agar ble overført til platen var det stor sannsynlighet for at PCR-reaksjonen ble inhibert. Til tross for dette var dette en svært tidssparende metode når man fant riktig teknikk på å plukke kolonier. Det viste seg også at Mangala primerene ga best sekvenser, selv om det ble benyttet en lavere annealingstemperatur.

Floraen på overflater med dårlig renhold reflekterte bakteriefloraen på råvarene i produksjonsmiljøet, mens floraen etter vask og desinfeksjon viste seleksjoner, som følge av svikt i desinfeksjonsprosessen eller resistens mot desinfeksjonsmidler. Spesielt tydelig var sammenhengen mellom forekomst av *L. monocytogenes* på overflater med smuss og fuktighet, noe som bekrefter hvor viktig det er med gode renholdsrutiner. Resultatene fra produksjonsmiljø og labforsøk indikerte at *Listeria* var tilstede i lav andel. I bedrift B (etter utilstrekkelig renhold) ble *L.monocytogenes* kun påvist ved oppformering i selektiv buljong. Selektive oppformeringsmetoder krever svært få bakterier (lav deteksjonsgrense), noe som betyr at *L.monocytogenes* utgjorde en svært liten andel (mindre enn 10 %) i disse prøvepunktene. Resultatene for bakteriesamfunnsanalysen viste også det samme, hvor *Listeria* spp. utgjorde 1- 4 % av totalflora i biofilm.

Resultater fra produksjonsmiljø og labforsøk indikerer at *L.monocytogenes* kan etablere seg på overflater i produksjonsmiljøet med færre konkurrenter tilstede og at konkurranse om næringsstoffer kan føre til at bakterien vokser langsommere. Dette kan imidlertid være avhengig av type bakgrunnsflora. Det viste seg også at bakterien overlevde bedre ved 12 °C når den befant seg i en duokultur enn i multikultur. Derimot klarte den seg bedre ved høyere temperatur (20 °C) i multikultur. Selv om det ikke ble observert endringer i celletall for *L. monocytogenes* i multikultur ved nærvær av salt, påvirket salt floraen.

Da resultatene i denne oppgaven tyder på at *L.monocytogenes* holdes nede i samfunn med flere bakterier tilstede vil man kanskje tro at det er tryggest å beholde bakgrunnsfloraen i produksjonsmiljøet og la være å rengjøre. Dette er ikke tilfelle, da bakgrunnsfloraen ofte består av forringelsesbakterier som vil påvirke holdbarheten av produktene. Dessuten kan det være andre bakterier til stede som stimulerer vekst av *L.monocytogenes*. Effekt av miljømessig stress er mer komplekse og variable i prosessanlegg enn det man kan demonstrere på et laboratorium. Et godt implementert renholdssystem bør derfor fortsatt være et viktig tiltak i bekjempelsen av *Listeria* i produksjonsmiljøet.

8. VIDERE ARBEID

- Teste ut flere *Listeria* stammer, da det er vanskelig å trekke en konklusjon fra biofilm forsøk med bare en *L.monocytogenes* og en *Listeria* sp.
- Teste *Listeria* i biofilm med bakterier som dominerer etter renhold (som for eksempel *Pseudomonas*, *Serratia* og *Acinetobacter*).
- Gjøre en videre karakterisering av dominerende stammer etter renhold.
- Biofilm forsøk med kun bakterier identifisert i samme prøvepunkt som *Listeria*.
- Ta ut flere overflateprøver fra hver bedrift for å se på forekomsten av *L.monocytogenes* (gjerne også fra flere bedrifter).
- Utføre bakteriesamfunnsanalyse med 454 pyrosekvensering av biofilm og suspensjon fra dette hovedforsøket (multikultur) for å oppnå bedre kunnskap om betydning av enkeltbakterier ved de ulike vekstbetingelsene.

9. REFERANSER

- Austin, B. (2002). The Bacterial Microflora of Fish. *The Scientific World Journal*, 2: 558-572.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C. & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87 (3): 239-250.
- Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I. & Gram, L. (2001). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied Environmental Microbiology*, 67 (5): 2319-2325.
- Banwart, G. J. (1989). *Basic food microbiology*. Second edition utg. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R. & Chamberlain, A. H. L. (1999). Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10): 4543–4548.
- Beech, I. B. (2004). Corrosion of technical materials in the presence of biofilms—current understanding and state-of-the art methods of study. *International Biodeterioration amp; Biodegradation*, 53 (3): 177-183.
- Bell, Philp, Aw & Christofi. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85 (2): 195-210.
- Bergogne-Berezin, E. & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reveiws*, 9 (2): 148-165.
- Bore, E. & Langsrud, S. (2005). Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (1): 96-105.
- Bremer, P. J., Monk, I. & Osborne, C. M. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection*, 64 (9): 1369-1376.
- Briandet, R., Leriche, V., Carpentier, B. & Bellon-Fontaine, M.-N. (1999). Effects of the growth procedure on the surface dydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 62 (9): 994-998.
- Brightwell, G., Boerema, J., Mills, J., Mowat, E. & Pulford, D. (2006). Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 109 (1–2): 47-53.
- Britton, R. (2011). *Mail correspondence between Lasse Axelsson and Rob Britton " PCR colony screening (design by Rob Britton`s lab, Michigan State University)"*.
- Brun, E. (2001). Smittehygienisk vurdering av fôr basert på villfanga fisk til oppdrettsfisk. 2-30. Tilgjengelig fra: http://www.rubin.no/files/documents/4701_94.pdf.
- CAC. (2007). *Guidelines on the application of the general principles of food hygiene to the control of Listeria monocytogenes in foods*. : CAC/GL 61. 1-28 s.
- Cahill, M. M. (1990). Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*, 19 (1): 21-41.
- Carpentier, B. & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Microbiology*, 75 (6): 499-511.
- Carpentier, B. & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97 (2): 111-122.
- Chandrasekaran, M., Lakshmanaperumalsamy, P. & Chandramohan, D. (1985). Fish flesh agar medium- a suitable experimental medium for the detection of spoilage bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51: 219-225.

- Chasseignaux, E., G erault, P., Toquin, M.-T., Salvat, G., Colin, P. & Ermel, G. (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*, 210 (2): 271-275.
- Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Keeratipibul, S., Kuda, T. & Kimura, B. (2011). The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, 22 (12): 1893-1899.
- Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (1): 22-32.
- Davey, M. E. & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867.
- De Carvalho, C. C. C. R., Da Cruz, A. A. R. L., Pons, M.-N., Pinheiro, H. M. R. V., Cabral, J. M. S., Da Fonseca, M. M. R., Ferreira, B. S. & Fernandes, P. (2004). *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. *Microscopy Research and Technique*, 64 (3): 215-222.
- Donlan, R. M. (2002). Microbial life on surfaces. *Emerging Infectetious Diseases*, 9: 881-890.
- Dosti, B., Guzel-Seydim, Z. & Greene, A. K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (1): 19-24.
- Doyle, M. P., Beuchat, Larry R., Montville, Thomas J. (1997). *Food microbiology; fundamentals and frontiers*. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Else, T. A., Pantle, C. R. & Amy, P. S. (2003). Boundaries for biofilm formation: Humidity and temperature. *Applied Environmental Microbiology*, 69 (8): 5006-5010.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43: 1-8.
- Flesj a, K. I., Hjeltne, B., Johansen, R., Norheim, K., Olsen, A. B. & Ringkj ob Skjelstad, H. (2004). Helse situasjonen hos laksefisk. *Havbruksrapport*: Havforskningsinstituttet. 25-29 s.
- Folkehelseinstituttet. (2007). *Litte smitte fra mat i Norge - to rapporter*: Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5588&MainArea_5661=5588:0:15,1787:1:0:0:::0:0&MainLeft_5588=5544:67136::1:5569:1:::0:0 (lest 15.04).
- Folkehelseinstituttet. (2011). *Matb arne sykdommer i EU i 2008*: Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5588&MainArea_5661=5588:0:15,1787:1:0:0:::0:0&MainLeft_5588=5544:82353::1:5569:1:::0:0 (lest 11.04).
- Garbeva, P., Silby, M. W., Raaijmakers, J. M., Levy, S. B. & de Boer, W. (2011). Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *Isme Journal*, 5 (6): 973-985.
- Georgala, L. (1958). The bacterial flora of the skin of north sea cod. *Journal of General Microbiology*, 18: 84-91.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P. & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18 (10): 1165-1171.
- Grinstead, D. (2009). Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. I: Fratamico, P., Annous, B. & Gunther, N. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*. Washington DC: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition
- Gudbj rnsd ttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sj berg, A. M., Niclasen, O. & Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21 (2): 217-225.
- Gu bj rnsd ttir, B., Einarsson, H. & Thorkelsson, G. (2005). Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: Influence of stainless steel surface finish and presence of

- Gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (1): 55-61.
- Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E. & Briandet, R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (1): 51-57.
- Haldorsen, A.-K., Julshamn, K. & Lunestad, B. T. (2003). Dokumentasjon av trygg sjømat. *Havbruksrapport* 2003. Tilgjengelig fra: http://www.imr.no/filarkiv/2003/12/3.2.1_Dokumentasjon_av_trygg_sjomat.pdf/nn-no (lest 17.04.12).
- Hansen, G. F. & Olafsen, J. A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology*, 38: 1-26.
- Harbron, R. S. & Kent, C. A. (1988). *Aspects of cell adhesion*. Fouling Science and Technology, b. 145. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Hegstad, K., S., L., Lunestad, B., Scheie, A., Sunde, M. & Yazdankhah, S. (2010). Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial Drug Resistance*, 16 (2): 91-104.
- Hood, S. K. & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37 (2–3): 145-153.
- Hovda, M. B., Fontanillas, R., McGurk, C., Obach, A. & Rosnes, J. T. (2012). Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 43 (1): 154-159.
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish*. FAO Fisheries Technical Paper. Rome: Food and Agriculture Organization of the United States.
- Huss, H. H., Embarek, P. K. B. & Jeppesen, V. F. (1995). Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control*, 6 (6): 335-340.
- Huss, H. H., Jørgensen, L. V. & Vogel, B. F. (2000). Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (3): 267-274.
- Huss, H. H. & Gram, L. (2004). *Assessment and management of seafood safety and quality* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jeong, D. K. & Frank, J. F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10C in biofilms with microorganisms Isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*, 57 (7): 576-586.
- Kim, K., Murano, E. A. & Olson, D. G. (1994). Effect of heat shock on production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 14 (4): 273-279.
- Kumar, C. G. & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1–2): 9-27.
- Langsrud, S. & Sundheim, G. (1997). Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Microbiology*, 82 (6): 705-712.
- Langsrud, S., Sidhu, M. S., Heir, E. & Holck, A. L. (2003a). Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51 (4): 283-290.
- Langsrud, S., Møretrø, T. & Sundheim, G. (2003b). Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Bacteriology*, 95 (1): 186-195.
- Langsrud, S., Heir, E., Møretrø, T., Røssvoll, E. & Hansen, A. Å. (2010). Kartlegging av bedriftspraksis (produkt, prosess og organisering) som hemmer og fremmer forekomst av *Listeria* i norske lakseprodukter. 1-27. Tilgjengelig fra: http://www.fiskerifond.no/files/projects/attach/900315_oppdagsrapport_pen_2010-10052010.pdf.
- Langsrud, S. (2012). *Personlig kommunikasjon*.

- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3 utg. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
- Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A., Holah, J. & White, B. (2003). *Hygiene in food processing*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. Tilgjengelig fra: http://books.google.no/books?id=0XJYI3JeMccC&pg=PA119&lpg=PA119&dq=campden+and+chorleywood+1995&source=bl&ots=syYUcKilpe&sig=D73igFs1MeP233k_D5_Ns6FaSfQ&hl=no&sa=X&ei=-VOVT5CMBpP34QTr8ujQDw&ved=0CDQQ6AEwAg#v=snippet&q=mixed%20species&f=false.
- Lemon, K. P., Higgins, D. E. & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189 (12): 4418-4424.
- Leriche, V. & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (4): 594-605.
- Lynum, L. (2005). *Fisk som råstoff*. Trondheim: Tapir Akademisk Forlag.
- Mafu, A., Roy, R., Goulet, J. & Savoie, L. (1991). Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (7): 1969-1973.
- Mead, G., Norris, A. & Bratchell, N. (1989). Differentiation of *Staphylococcus aureus* from freshly slaughtered poultry and strains endemic to processing plants by biochemical and physiological tests. *Journal of Applied Bacteriology*, 66 (2): 153-159.
- Moen, B. (2012). *Personlig kommunikasjon*.
- Monk, I., Cook, G., Monk, B. & Bremer, P. (2004). Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Biological significance of rough colony isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11): 6686-6694.
- Møretrø, T. & Habimana, O. (2008). Metoder for å studere biofilm. Tilgjengelig fra: <http://www.nofima.no/artikkel/metoder-for-aa-studere-biofilm> (lest 14.05.2012).
- Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L., Vestby, L. & Langsrud, S. (2012). Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*, 45 (2): 532-544.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41 (11): 1553-1573.
- Nederbragt, L. & Jakobsen, K. S. (2008). Genomsekvensering og andre «high throughput» applikasjoner ved hjelp av 454 pyrosekvensering – en ny FUGÉ service plattform. *Medlemsbladet for Norsk Biokjemisk Selskap*: 3-14.
- Pan, Y., Breidt, F. J. & Kathariou, S. (2009). Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (18): 5846-5852.
- Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2009). *Listeria monocytogenes* membrane trafficking and lifestyle: The exception or the rule? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25: 649-670.
- Rieu, A., Lemaître, J.-P., Guzzo, J. & Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (1–2): 76-82.
- Ringø, E., Jutfelt, F., Kanapathipillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T. M., Myklebust, R. & Olsen, R. E. (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and Tissue Research*, 318 (2): 305-311.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S. & Krogdahl, Å. (2006). Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261 (3): 829-841.
- Rocourt, J., Jacquet, C. & Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (3): 197-209.

- Ryser, E. & Marth, E. (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 3 utg.: Taylor & Francis Group, LLC.
- Rørvik, L. M., Yndestad, M. & Skjerve, E. (1991). Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4° C. *International Journal of Food Microbiology*, 14 (2): 111-117.
- Rørvik, L. M., Caugant, D. A. & Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25 (1): 19-27.
- Rørvik, L. M. (2008). *Listeria monocytogenes*. I: Granum, P. E. (red.) b. 3 *Matforgiftning Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, s. 223-231: Høyskoleforlaget
- Sashara, K. C. & Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, 56 (12): 1022-1028.
- Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M. & Logan, S. M. (2004). Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with β -O-Linked N-Acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology*, 186 (20): 6721-6727.
- Shi, X. & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (9): 407-413.
- Shineman, T. L. & Harrison, M. A. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on different muscle tissues. *Journal of Food Protection*, 57 (12): 1057-1062.
- Sillankorva, S., Neubauer, P. & Azeredo, J. (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIIBB-PF7A. *BMC Biotechnology*, 8: 1-12.
- Simões, M., Simões, L. C. & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (4): 573-583.
- Slade, P. J. (1992). Monitoring *Listeria* in the food production environment. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Research International*, 25 (1): 45-56.
- Sousa, J. A. d. & Silva-Souza, Â. T. (2001). Bacterial community associated with fish and water from congonhas river. *Brazilian archives of biology and technology*, 44 (4): 373-381.
- Sundheim, G. (1999). *Renhold i næringsmiddelindustrien*. Ås: Matforsk.
- Suzuki, M. T., Rappe, M., Hailmberger, Z. W., Winfield, H., Adair, N., Strobel, J. & Giovanni, S. J. (1997). Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9): 983-989.
- Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology*, 109: 1597-1608.
- Tompkin, R. B., Scott, V. N., Bernard, D. T., Sveum, W. H. & Gombas, K. T. (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 19 (8): 551-562.
- Towner, K. (2006). *The Genus Acinetobacter*. 3 utg. Dworkin, M. & Falkow, S. (red.). The Prokaryotes, 6, 3.3.25. Minneapolis: Springer. 746-758 s.
- Van Houdt, R., Givskov, M. & Michiels, C. W. (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiology Reviews*, 31 (4): 407-424.
- Van Houdt, R. & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (4): 1117-1131.
- van Kessel, M. A., Dutilh, B. E., Neveling, K., Kwint, M. P., Veltman, J. A., Flik, G., Jetten, M. S., Klaren, P. H. & Camp, H. J. O. d. (2011). Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express*, 1 (41): 1-9.
- Vaneechoutte, M., Dilkshoorn, L., Nemec, A., Kampfer, P. & Wauters, G. (2011). *Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and other nonfermentative gram-negative rods*. Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Warnock, D. W. (red.). Manual of Clinical Microbiology, 42: ASM Press. 714-738 s.
- Veterinærinstituttet. (2003). Gjellebetennelse. *Kultiveringsveilederen*: Veterinærinstituttet. 1-2 s.

- Veterinærinstituttet. (2009). *Biofilm - Veterinærinstituttets forskning*. Oslo: Veterinærinstituttet. Tilgjengelig fra: [http://www.vetinst.no/nor/Temasider/Biofilm/\(language\)/nor-NO](http://www.vetinst.no/nor/Temasider/Biofilm/(language)/nor-NO) (lest 09.02.12).
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. & P., I. E. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*: 2535-2554.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. 6 utg. New York: Pearson Education, Inc.
- Willey, J., M., Sherwood, L., M., Woolverton C., J. (2009). *Prescott's principles of microbiology* New York: McGraw-Hill 1-846 s.
- Yndestad, M. & Hauge, K. (2006). *Listeria monocytogenes* i norskprodusert røkelaks 1-29. Tilgjengelig fra: http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00026/Rapport_Listeria_mo_2_6421a.pdf.
- Zmysłowska, I., Lewandowska, D. & Guziur, J. (2000). Microbiological study of Ide (*Leuciscus Idus* L.) from ponds of different trophic level. *Archiwum Rybactwa Polskiego*, 8: 259-269.
- Zmysłowska, I., Lewandowska, D., Nowakowski, T. & Kozłowski, J. (2001). Occurrence of bacteria in water and in vendace (*Coregonus Albula*) during rearing in tanks. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10 (1): 51-56.

10 VEDLEGG

10.1 Skriftlig vedlegg

Vedleggsnummer	Tittel:
V1	Medier og løsninger

10. 2 Elektroniske vedlegg (vedlagte Excel og Fasta filer)

Vedleggsnummer	Tittel:
V2	Bedriftsbesøk
V3	Bestemmelse av kimtall
V4	Bakterieflora
V5	Bakteriesamfunnsanalyse av miljøprøver
V6	Biofilm
V7	Bakteriesamfunnsanalyse av multikultur forforsøk

Vedlegg 1 Medier og løsninger

BHI (Brain Heart Infusion):

Buljong: 37 gram BHI ble løst i en liter Milli-Q vann. Dette ble overført til glassflasker og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter, og overført til petriskåler.

Formula	Gram/liter
Calf Brain infusion solids	12.5
Beef heart infusion solids	5.0
Proteose peptone	10.0
Glucose	2.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5

pH 7.4 ± 0.2

Skåler: 47 gram ble løst i 1000 ml vann, og sterilisert 15 minutter ved 121 °C. Etter avkjøling i vannbad til ca. 45 °C ble agar fordelt i petriskåler (ca. 20 ml i hver skål).

Formula	Gram/liter
Calf Brain infusion solids	12.5
Beef heart infusion solids	5.0
Proteose peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Glucose	2.0
Disodium phosphate	2.5
Agar	10.0

pH 7.4 ± 0.2

Blodagar:

Skåler: 40 gram Blood Agar Base (Difco) ble løst opp i en liter Milli-Q-vann i en glassflaske og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter. Etter sterilisering og avkjøling til ca. 45 °C ble 7 % hesteblood (SR50) tilsatt mediet. Agarmediet ble fordelt i petriskåler med ca. 20 ml i hver skål.

Formula	Gram/liter
Lab-Lemco` powder	10.0
Peptone Neutralised	10.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

pH 7.3 ± 0.2

CFC (Pseudomonas Agar Base):

Skåler: 24,2 gram ble løst opp i 500 ml Milli-Q vann i en glassflaske og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter, og avkjølt til 50 °C. Pseudomonas C-F-C Supplement (SR0103E) blandet med 2ml etanoløsning (1:1 etanol og sterilisert vann), ble tilsatt før Pseudomonas Agar Base (CM0559) med 5 ml glyserol. Medium ble til slutt blandet godt og fordelt i petriskåler.

Formula	Gram/liter
Gelatin peptone	16.0
Casein hydrolysate	10.0
Potassium sulphate	10.0
Magnesium chloride	1.4
Agar	11.0

pH 7.1 ± 0.2

Jernagar:

Skåler: 34,8 gram ble tilsatt i 400 ml vann, og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter. Et volum på 4 ml L-cystein hydroklorid monohydrat (aseptisk sterilfiltret 4 % w/v vandig oppløsning) ble tilsatt etter avkjøling (ca. 45 °C) og blandet inn. Mediet ble så fordelt i petriskåler med 20 ml i hver skål.

Formula	Gram/liter
Bacteriological peptone	20.0
Lab-Lemco` powder	3.0
Yeast extract	3.0
Ferric citrate	0.3
Sodium thiosulphate	0.3
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0

pH etter tilsetning av L-cystein HCL: 7.4 ± 0.2

LBA(Listeria Brilliance Agar):

Skåler: 33,6 gram ble løst opp i 480 ml Milli-Q vann i en glassflaske og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter, og avkjølt til 45 °C. To milliliter sterilt vann ble tilsatt til Brilliance™ Listeria Selective Supplement (SR0227E), og blandet inn i sterilt medium. Til slutt ble Brilliance™ Listeria Agar Base (CM10180) og 1 vial Brilliance™ Listeria Differential Supplement (SR0228E) tilsatt, og blandet godt inn. Medium ble fordelt i petriskåler med 20 ml i hver skål.

Formula	Gram/liter
Peptone	18.05
Yeast extract	4.0
Sodium chloride	9.5
Xglucoside chromogenic mix	0.2
Maltose	4.0
Sodium pyruvate	2.0
Lithium chloride	15.0
Agar	14.0

PCA (Plate Count Agar):

Skåler: 17,5 gram ble løst i en liter Milli-Q-vann i glassflasker, og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter. Mediet ble deretter avkjølt til 45 °C og overført til petriskåler med ca. 20 ml i hver.

Formula	Gram/liter
Tryptone	5.0
Yeast extract	2.5
Glucose	1.0
Agar	9.0

pH 7.0 ± 0.2

STAA (STAA Agar Base)

Skåler: 18,5 gram ble løst i 500 ml Milli-Q-vann i glassflasker, og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter. To milliliter sterilt vann ble tilsatt til STAA Selective Supplement (SR0151E), og blandet i 500 ml sterilt medium. STAA agar BASE (CM0881) med 7,5 gram glyserol ble til slutt tilsatt medium, blandet godt inn og fordelt i petriskåler.

Formula	Gram/liter
Peptone	20.0
Yeast extract	2.0
Magnesium sulphate	1.0
Di-pottasiumhydrogen phosphate	1.0
Agar	13.0

pH 7.0 ± 0.2

VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar):

Skåler: 38,5 gram ble løst i 1 liter Milli-Q-vann ved oppvarming til kokepunkt i en trykkoker. Oppbevart i vannbad(50 °C) inntil bruk.

Formula	Gram/liter
Yeast extract	3.0
Peptone	7.0
Sodium chloride	5.0
Bile salts No.3	1.5
Glucose	10.0
Neutral Red	0.03
Crystal Violet	0.002
Agar	12.0

pH $7, 4 \pm 0,$

RLM (Rapid *L.mono*):

Ferdigstøpte fra produsenten Bio-Rad

Formula	Gram/liter
Peptone	30
Meat extract	5
Yeast extract	1
Lithium chloride	9
Xylose	10
Phenol Red	0.12
Agar	13
Chromogenic solution	1
Selective solution	20
Distilled water	1000 ml

pH (25 °C) 7.2 ± 0.2

Glyserol til frysekulturer:

Glyserol (85 %) ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter, og deretter avkjølt før bruk. Løsningen ble lagret ved romtemperatur.

Loadingbuffer (Orange Mix):**Blandingsforhold:**

20 gram Ficoll

0,25 gram Orange G

100 ml dH₂O

Løsningen ble sterilfiltrert og fordelt i 1 ml eppendorfrør. Oppbevart ved 4 °C.

Molekylvektstandard (Standard VI):**Blandingsforhold:**

60 µl Standard Marker VI

100 µl loading, orange mix

140 µl dH₂O

Oppbevart i 1 ml eppendorfrør ved 4 °C.

Nøytraliseringsvæske:

39 gram D/E Neutralizing broth (Difco) ble løst i 1 liter Milli-Q vann, og sterilisert ved 121 °C i 15 minutter. Lagret ved 4 °C etter avkjøling.

Pr. liter:	Gram
Pancreatic Digest of Casein	5.0
Yeast extract	2.5
Dextrose	10.0
Sodium Thioglycerate	1.0
Sodium Thioulfate	6.0
Sodium Bisulfite	2.5
Polysurbate 80	5.0
Lecithin	7.0
Bromcresol purple	0.02

pH 7, 6 ± 0, 2

Peptonvann:

10 gram Bacto™ peptone (Difco) og 5 gram NaCl ble løst i 1 liter destillert vann. pH ble justert til 7,2 før blandingen ble helt over i glassflasker, og sterilisert ved 121 °C og 5 minutter. Oppbevart ved romtemperatur.

5 x TBE (Tris – Borat EDTA):

Tris 0.0089 M

Boric Acid 0.089 M

EDTA 0.002 M