

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven ble skrevet som en avsluttende del av en mastergrad i matvitenskap ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap. Oppgaven ble skrevet ved Nofima avdeling for trygg og holdbar mat.

Arbeidet med masteroppgaven har vært en tålmodighetsprøve til tider men desto mer tilfredsstillende når man begynner å komme i mål. Jeg har lært en god del, da spesielt om temaet biofilm og sitter igjen med erfaringer som jeg helt sikkert for bruk for senere.

Jeg må få lov til å rette en stor takk til mine veiledere forsker Trond Møretrø og forsker Solveig Langsrud veiledningen har vært intet annet enn fremragende. Jeg vil også takke laboratorieleder Tove Maugesten for veiledning på lab i tillegg til senioringeniør Janina Sofie Berg og Anette Wold Åsli for praktisk hjelp. Samt alle andre jeg har jobbet med under oppholdet mitt her ved Nofima. Takk!

Til slutt vil jeg også takke min hovedveileder Hilde Marit Østlie ved UMB.

Ås, mai 2013

Ola Tjåland

Sammendrag

Flere bakterieslekter har evne til å danne biofilm og det er antatt at biofilmdannelse spiller en rolle når det kommer til deres overlevelse i næringsmiddelindustrien. Enda viktigere er kanskje det at deres tilstedeværelse kan ha en positiv påvirkning på sykdomsfremkallende mikroorganismer. Kunnskap om sammensetning av biofilm matriks hos flere ulike bakteriestammer vil derfor være nyttig med tanke på forebygging og fjerning av biofilm i næringsmiddelindustrien.

Hensikten med dette arbeidet var å finne ut om ulike kjemiske forbindelser (Enzymer, D-aminosyrer og norspermidin) kunne ha en hemmende effekt på et bredt spekter av bakteriestammer isolert fra matindustrien. I tillegg har det også i den senere tid vært økt fokus på bakteriers egen evne til å løse opp biofilm. Man ønsket derfor å se om bakterier fra matindustri kunne produsere forbindelser som løsnet biofilm.

Bakterier ble dyrket i glassrør og i mikrotiterplater i tryptone soya broth. For å undersøke om noen bakterier dannet stoffer som løser opp biofilm ble hver enkelt stamme inkubert i fem glassrør over en tidsperiode på 14 dager med forskjellige uttak. Mengde dannet biofilm ble så målt ved A 600nm. Supernatant fra noen utvalgte bakteriestammer ble så testet for å se om de kunne ha en oppløsende effekt på biofilm. I mikrotiterplater ble det i tillegg tilsatt enzymer, D-aminosyrer og norspermidin. Før platene ble inkubert i to dager. Etter to dager ble mikrotiterplatene behandlet på en tilsvarende måte som for glassrør.

I dette arbeidet ble det vist at DNase kunne ha en effekt på hemming av biofilm, noe som antyder at DNA er en stor del av biofilm matriks hos bakterier. Det ble også funnet noen effekter på hemming av biofilm med enzymer og D-aminosyrer innad i ulike bakterieslekter, henholdsvis hos *Pseudomonas* spp. og *Serratia* spp.

Gjennom arbeidet ble det også observert variasjoner innenfor slektene, som ikke var mindre enn variasjonene mellom slektene. Dette indikerer at når man jobber med biofilmdannelse hos en spesifikk bakteriestamme bør man være forsiktig med å generalisere og si at dette gjelder for alle bakterier av denne typen.

Abstract

Several bacteria have the ability to produce biofilm and it is assumed that biofilm formation plays an important role when it comes to their survival in food industry. More importantly perhaps is that their presence might have a positive effect on pathogenic microorganisms. Therefore knowledge of the composition of the biofilm matrix in several different bacterial strains will be useful in the prevention and removal of biofilms in the food industry.

The purpose of this work was to determine whether different chemical compounds (enzymes, D-amino acids and norspermidine) could have an inhibitory effect on a wide range of bacterial strains, isolated from the food industry. In addition we wanted to see if bacteria from the food industry produced compounds which sloughed biofilm.

Bacteria were grown in glass tubes and in microtiter plates in Tryptone soya broth. To investigate whether some bacteria formed substances that dissolve the biofilm each strain was incubated in five glass tubes over a period of 14 days with different outlets. Amount of biofilm was measured at OD 600nm. Supernatant from selected strains were then tested to see if they could have a disruptive effect on biofilm. The microtiter plates were added enzymes, D-amino acids and norspermidine. Before the plates were incubated for two days. After two days, the microtiter plates were treated in a similar manner as the glass tubes.

In this work it was shown that DNase could have an effect on the inhibition of biofilm, which suggests that the DNA is a big part of the biofilm matrix in bacteria. We also observed effects on the inhibition of biofilm when using enzymes and D-amino acids within the genus of *Pseudomonas* and *Serratia*. Through the work of this thesis it was also observed variations within the genus, which was no less than the variation between genuses. This indicates that when working with biofilm formation on a specific bacterial strain, one should be careful not to generalize.

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning	1
2.0 Teori	2
2.1 Biofilm	2
2.2 Biofilmdannelse	3
2.3 Fra planktonisk celle til biofilm	4
2.4 Quorum sensing	5
2.5 Hvorfor lager bakterier biofilm?	6
2.6 Adhesjon, oppløsning og spredning av biofilm	6
2.7 D-Aminosyrer	7
2.8 Enzymer	9
2.9 Norspermidin	9
2.10 Biofilm i næringsmiddelindustrien og tilhørende biofilmkontroll.....	10
2.11 Bakterieslekter	11
Slekt <i>Serratia</i>	11
Slekt <i>Pseudomonas</i>	12
Slekt <i>Acinetobacter</i>	12
Slekt: <i>Bacillus</i>	13
Slekt <i>Psychrobacter</i>	14
Slekt: <i>Rhodococcus</i>	14
Slekt: <i>Kocuria</i>	14
Slekt <i>Escherichia</i>	15
Slekt: <i>Pantoea</i>	15
Slekt <i>Citrobacter</i>	16
Slekt <i>Corynebacterium</i>	16
Slekt: <i>Brochothrix</i>	17
Slekt <i>Carnobacterium</i>	17
Slekt <i>Curtobacterium</i>	17
3.0 Material og metode.....	18
3.1.1 Vekstmedier	18

3.1.2 Stamløsnings	18
3.1.3 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer	19
3.1.4 Bakteriestammer	19
3.1.6 Tillaging av overnattekulturer	21
3.1.7 Rørmetode	21
3.1.8 Mikrotiterplatemetode	21
3.1.9 Oversikt over hva som ble gjort i forsøket	23
3.2 Innledende forsøk	23
3.3 Rørmetode	24
3.3.1 Biofilmdannelse i glassrør over en fastsatt tidsperiode	24
3.3.2 Undersøkelse om supernatant fra potensielle bakteriestammer kan hemme biofilmdannelse	25
3.4 Mikrotiterplatemetode	26
3.4.1 Ulike stoffer og effekt på biofilmdannelse i mikrotiterplater	26
3.4.2 Ulike konsentrasjoner av D- og L-Aminosyrer	27
3.5 Statistiske metoder	28
4.0 Resultat	29
4.1.0 Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	29
4.1.1 <i>Serratia</i> spp.	30
4.1.2 <i>Pseudomonas</i> spp.	31
4.1.3 <i>Acinetobacter</i> spp.	32
4.1.4 <i>Bacillus</i> spp.	33
4.1.5 <i>Psychrobacter</i> spp.	35
4.1.6 <i>Rhodococcus</i> spp.	36
4.1.7 <i>Kocuria</i> spp i tillegg til ulike slekter med bare en stamme	37
4.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse	39
4.3 Effekt av ulike stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	40
4.3.1 <i>Serratia</i> spp.	40
4.3.2 <i>Pseudomonas</i> spp.	41
4.3.1 <i>Acinetobacter</i> spp.	43
4.3.4 <i>Bacillus</i> spp.	43
4.3.5 <i>Psychrobacter</i> spp.	45

4.3.6 Andre bakterieslekter v/ <i>Corynebacterium simulans</i>	46
4.3.7 Oppsummering av resultater for effekter av ulike stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	46
4.4 Effekt på bruk av ulike konsentrasjoner av D- og L-aminosyrer på biofilm i mikrotiterbrett	47
5.0 Diskusjon.....	51
5.1.1 <i>Serratia</i> spp.....	51
5.1.1a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	51
5.1.1b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	51
5.1.2 <i>Pseudomonas</i> spp.....	52
5.1.2a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	52
5.1.2b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	53
5.1.3 <i>Acinetobacter</i> spp.....	54
5.1.3a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	54
5.1.3b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	55
5.1.4 <i>Bacillus</i> spp.....	55
5.1.4a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	55
5.1.4b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	55
5.1.5 <i>Psychrobacter</i> spp.....	56
5.1.5a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	56
5.1.5b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	56
5.1.6 <i>Rhodococcus</i> spp.....	57
5.1.6a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	57
5.1.6b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	57
5.1.7 <i>Kocuria</i> spp. i tillegg til ulike slekter med bare en stamme.....	57
5.1.7a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør	57
Kocuria spp:.....	57
Øvrige	58
5.1.7b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett	58
5.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse	58
5.3 Effekt på bruk av ulike konsentrasjoner av D- og L-aminosyrer på biofilm i mikrotiterbrett	59
5.4 Bruk av ulike stoffer for hemming av biofilm	61

5.5 Relevans av resultater for kontroll av biofilm i næringsmiddelindustrien	62
6.0 Konklusjon	63
7.0 Forslag til videre arbeid.....	64
8.0 Kilder.....	65
9.0 Vedleggsliste	71

1.0 Innledning

Biofilm i matindustrien er et stort problem. Til nå har fokuset ofte vært rettet mot sykdomsfremkallende bakterier, men disse forekommer sjeldent på overflaten i industrien. Bakterier som dominerer er blant annet *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* og *Serratia*. Disse bakteriene kan blant annet ha en påvirkning på sykdomsfremkallende bakterier (Bore and Langsrud 2005; Møretrø, Sonerud et al. 2006; Simões, Simões et al. 2010).

Denne oppgaven inngår i et basisprogram ved Nofima som heter Mattrygghet, matkvalitet og helseeffekter-kontroll med mikrofloraen. Prosjektet er finansiert av fondet for forskningsavgift på landbruksprodukter. Man ønsker med dette prosjektet å få ny kunnskap og kompetanse for å forstå hvordan mikroorganismer overlever og vokser i mat og matproduksjonsmiljøer.

Når bakterier vokser på overflater har de en tendens til å danne biofilm. Biofilm er en samling av bakterieceller som er festet til en overflate og innkapslet i en selvklebende matriks utskilt av cellene (Madigan, Matinko et al. 2009). Biofilmdannelse er blant annet en metode for mikrobiologisk forsvar som gjør at bakteriene i biofilmen vil motstå fysiske krefter samt være mer resistente mot skadelige kjemikalier som for eksempel antibiotika.

Hensikten med denne masteroppgaven var å se på biofilmdannelse hos ulike bakteriestammer i hovedsak isolert fra næringsmiddelindustrien samt å se om ulike kjemiske forbindelser (D/L-aminosyrer, norspermidin og enzymer) har en effekt på biofilmdannelse.

I tillegg ønsker man å finne ut om noen av disse bakteriestammene produserer komponenter som kunne løsne biofilm. Økt kunnskap på hvilke forbindelser som kan løse opp biofilm kan blant annet gi indikasjoner på sammensetning av biofilm matriks. Noe som kanskje vil gjøre det mulig å utvikle nye mer effektive rengjøringsmidler til kampen mot biofilm i næringsmiddelindustrien.

2.0 Teori

2.1 Biofilm

Overflater er viktige mikrobielle habitater, det finnes flere gode grunner til dette. For det første vil næringsstoffer adsorbere til overflater og overflater vil derfor inneholde mer næringsstoffer enn hva som er tilgjengelig for frittlevende celler. Overflater vil også være områder hvor mikrobielle celler kan feste seg. Det å feste seg til en overflate vil være en måte å sikre seg det å forbli i et fordelaktig habitat og dermed unngå å bli vasket bort (Madigan, Matinko et al. 2009).

Når bakterieceller vokser på overflater har de en tendens til å danne biofilm (Madigan, Matinko et al. 2009). Biofilm er en samling av bakterieceller som er festet til en overflate og som er innkapslet i et selvklebende matriks utskilt av cellene (Madigan, Matinko et al. 2009). Biofilm på overflater har ofte en karakteristisk konstruksjon som består av tårn- og sopp formasjoner av mikrokolonier som er innelukket i et hydratisert matriks (Smith, Fratamico et al. 2009).

Dog er det viktig å merke seg at ikke alle biofilmer ser like ut og strukturen kan avhenge av hvilken bakterie som har dannet den (Siebel and Characklis 1991; Smith, Fratamico et al. 2009). Biofilm matriks vil typisk være en blanding av polysakkarider, men kan også inneholde proteiner og nukleinsyrer.

Biofilmens funksjon vil da være å fange næringsstoffer for mikrobiell vekst samtidig som den hindrer at cellene løsner på overflater som påvirkes av strømminger. Biofilmer har typisk flere ulike porøse lag, og inneholder vanligvis flere typer av bakterier, men kan også bare bestå av en bakterieart (Smith, Fratamico et al. 2009).

Som eksempel kan biofilmer som dannes rundt en tann inneholde flere hundre ulike fylotyper, samt inneholde stammer fra både *Archaea* og *Bacteria*. Man kan derfor si at biofilmer er funksjonelle mikrobielle samfunn og ikke bare celler fanget i en klebrig matriks (Madigan, Matinko et al. 2009).

Biofilm spiller en sentral rolle i human medisin. I kroppen vil bakterieceller i biofilm være beskyttet mot angrep fra immunsystemet. Antibiotika og andre antimikrobiske stoffer vil ofte ha problemer med å trenge gjennom biofilmen og dermed vil de være ute av stand til å ha en effekt på bakteriecellene. For eksempel kan medisinske implantater være ypperlige overflater for

kolonisering og utvikling av biofilm. Det har blant annet blitt estimert at over 10 millioner mennesker årlig opplever biofilm infeksjoner fra implantater eller fra andre kirurgiske inngrep. I industriell sammenheng kan biofilm senke strømmingen på olje, vann og andre væsker gjennom rørledninger. Biofilmer kan også forårsake degradasjon av nedsunkede objekter som for eksempel utstyr til oljeplattformer (Madigan, Matinko et al. 2009).

Tryggheten på drikkevann står også i fare ved utvikling av biofilm i distribueringsrør. I de fleste tilfeller inneholder disse bare harmløse mikroorganismer, men de er alltid en fare for at patogene mikroorganismer kan kolonisere rørledningen. Vanlig bruk av klor vil da i flere tilfelle ikke være nok for å drepe disse. Man vil da kunne stå i fare for at periodiske utslipp av bakterier fra disse biofilmene, kan føre til utbrudd av sykdom hos kundene (Madigan, Matinko et al. 2009).

2.2 Biofilmdannelse

De ulike trinnene i biofilmdannelse blir beskrevet som følger, se også figur 2.1 (Stoodley, Sauer et al. 2002).

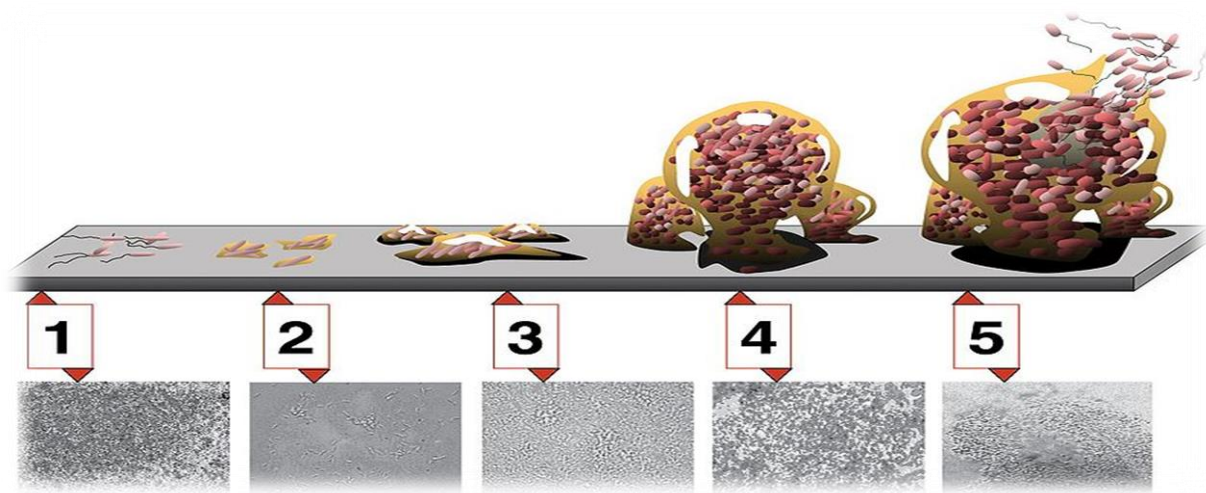
Steg 1: Reversibel adhesjon av bakterie til overflate

Steg 2: Irreversibel adhesjon formidlet ved produksjon av eksopolymerisk materiale

Steg 3: Dannelse av mikrokolonier og starten på modning av biofilm

Steg 4: Biofilmen modnes og det dannes en tre-dimensjonal struktur som inneholder celler pakket i klaser med vannkanaler mellom klasene som muliggjør transport av avfall og næringsstoffer

Steg 5: Løsrivelse og spredning av cellene fra biofilmen og initiering av ny biofilmdannelse. Disse utbryter cellene vil være mer like planktoniske celler enn modnede biofilmceller



Figur 2.1 Ulike trinn i biofilmdannelse hos *Pseudomonas aeruginosa* etter D. Davies. Lisensiert under Creative Commons [Attribution 2.5 Generic](http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/) (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>).

2.3 Fra planktonisk celle til biofilm

Når en celle fester seg til en overflate vil dette være et signal for biofilm-spesifikke gener. Disse genene koder for proteiner som syntetiserer intercellulære signal molekyler som initierer matriks formasjon. Når en celle blir engasjert i biofilmdannelse vil en tidligere svømmende celle miste sin flagell og dermed miste sin motilitet. Bakterien vil på en måte sanse en høvelig overflate og gjennom en rekke hendelser vil dette føre til dannelse av biofilm. Man vet at overgangen fra en planktonisk celle til initieringen av biofilmdannelse blir trigget av syntesen av cyklisk diemerisk guanosin monofosfat eller c-di-GMP som er et derivat av nukleotid guanosin trifosfat. C-di-GMP blir laget av en rekke proteiner assosiert med sensorisk membran integrasjon, som på et vis er i stand til å oppdage overflater hvor biofilmdannelse er mulig.

Man tror c-di-GMP virker ved at det både utløser en biofilm spesifikk gen ekspresjon samtidig som det aktiverer enzymer i cellen som syntetiserer matriks materiale. Intercellulær kommunikasjon er viktig i utviklingen og vedlikehold av biofilm. Hos for eksempel *Pseudomonas aeruginosa* som er kjent som en god biofilmdanner skjer denne intercellulære kommunikasjonen ved hjelp av stoffer kalt acylerte homoserin laktoner. Disse molekylene vil over tid akkumuleres og signaliserer andre *P. aeruginosa* bakterieceller i en mekanisme kalt quorum sensing. Dette systemet finnes ikke bare hos *P. aeruginosa* men gjør det mulig både for Gram-negative og Gram-positive bakterier å kommunisere med hverandre (Smith, Fratamico et

al. 2009). Populasjonen av *P. aeruginosa* i dette avgrensede området vil da stige og man får produksjon av biofilm. Over tid vil man da få en soppeformet klebrig polysakkarid matriks som kan være over 100 µm høy og inneholde milliarder av celler (Madigan, Matinko et al. 2009).

2.4 Quorum sensing

Quorum sensing (QS) er et cellekonsentrasjons-avhengig signalsystem som regulerer genekspresjon og blir styrt av kjemisk signalmolekyler som blir produsert av bakterien. Når bakteriepopulasjonen når sitt «quorum» nivå vil de kjemiske signalmolekylene binde seg til de egnede transkripsjons regulatorene, etterfulgt av en aktivering og undertrykkelse av det utpekte genet. QS gjør det mulig for mikroorganismer å fremvise en samlet respons gunstig for overlevelse av populasjonen (Smith, Fratamico et al. 2004).

Det fins flere signalmolekylsystemer hos bakterier. QS systemet hos Gram-negative bakterier er avhengig av homologe LuxI- LuxR regulatoriske proteiner. Disse proteinene er ansvarlige for biosyntesen av ulike kjemiske signalmolekyler og som nevnt tidligere blir disse kalt acylerte homoserin laktoner (AHL) (Kanamaru, Kanamaru et al. 2000; Smith, Fratamico et al. 2009). Det har også blitt beskrevet andre systemer for QS hos Gram-negative blant annet Autoinducer -2 (AI-2) (Van Houdt, Givskov et al. 2007). AHL blir produsert inne i cellen for så å bli utskilt. Konsentrasjonen av disse stiger ettersom antallet bakterier stiger (Miller and Bassler 2001). Til slutt vil konsentrasjonen nå et kritisk nivå hvor AHL igjen vil gå inn i cellen for så og binde seg til den N-terminale området på LuxR protein reseptor (Miller and Bassler 2001). LuxR-AHL vil da aktivere eller undertrykke gen transkripsjon (Smith, Fratamico et al. 2009).

Gram-positive vil i likhet med Gram-negative også bruke QS men til forskjell, bruker de utskilte peptider som signalmolekyler og på samme måte vil konsentrasjonen av disse signalmolekylene stige ettersom bakteriepopulasjonen øker (Miller and Bassler 2001). Et to-komponents regulatorisk system hos bakterien oppdager disse signalmolekylene som fører til en serie av fosforylering og defosforylerings – reaksjoner. Som til slutt vil føre til en fosforylering av respons regulatoren. Denne reaksjonen fører til at respons regulatoren binder seg til DNA som forandrer transkripsjonen av det QS-kontrollerte genet (Smith, Fratamico et al. 2009).

Bakterier kan bruke QS systemet både for å oppløse og forsterke biofilm dette ble vist hos *Staphylococcus aureus* som så ut til å hindre biofilmdannelse ved bruk av QS mens det motsatte var tilfelle hos *Pseudomonas aeruginosa* (Boles and Horswill 2008).

2.5 Hvorfor lager bakterier biofilm?

Man kan godt kalle biofilm for bakterienes storby og det finnes flere grunner til danning av biofilm. For det første er biofilm en metode for mikrobiologisk forsvar. Biofilm motstår fysiske krefter som fører til at frie celler blir skylt eller revet bort. I tillegg hindrer biofilm fagocytose fra kroppens immunceller samt gjennomtrengingen av toksiske molekyler fra for eksempel antibiotika (Smith, Fratamico et al. 2009). Disse fordelene er med på å øke sjansene for overlevelse for cellen i biofilmen. For det andre så vil dannelsen av biofilm være med på og sikre at bakteriene blir værende i en fordelaktig nisje. Som for eksempel på en stein i en elv. For det tredje så gir dannelsen av biofilm bakterier muligheten til å leve tett på hverandre noe som gjør det enklere for bakterier å kommunisere intercellulært samtidig som det øker sjansene for overlevelse. I tillegg når celler er i nærhet av hverandre så er sjansene for genetisk utveksling mye større. Det ser også ut til at biofilm er den foretrukne livsformen for bakterier ute i naturen, hvor næringsstoffene ikke er like lett tilgjengelige som de er på et vekstmedium i et laboratorium. Derfor når overflater er tilgjengelige i et naturlig miljø så vil planktonisk vekst bare være normen for de bakterier som er tilpasset et liv ved ekstremt lave næringsstoffkonsentrasjoner (Madigan, Matinko et al. 2009).

2.6 Adhesjon, oppløsning og spredning av biofilm

Hvor enkelt en mikroorganisme klarer å feste seg til overflater er en komplisert prosess som avhenger av flere ulike faktorer. Generelt kan man si at adhesjon til overflater ofte vil være enklere på ujevne hydrofobe overflater som er overtrukket med kondisjoneringsfilm (Simões, Simões et al. 2010). En kondisjoneringsfilm vil da være organiske stoffer som kommer i kontakt med vann og lagres på en fast overflate (Stellenbosch, Molobela et al. 2009). I tillegg vil flere andre ulike faktorer spille inn inkludert temperatur, pH, tilgjengelighet på næringsstoffer og cellens morfologi (Simões, Simões et al. 2010).

Hvis bakterier ikke hadde hatt muligheten til å rømme fra biofilmen ved lave næringsstoffkonsentrasjoner, uvennlige naboer eller generelt ved ugunstige miljøforhold ville biofilmen blitt en dødsfelle (Watnick and Kolter 2000). Det finnes derfor som nevnt tidligere en rekke ulike miljøfaktorer som trigger oppløsning og spredning av biofilm som blant annet alterasjon i næringsstoffer, oksygenmangel, lave nivå av nitritt oksid (NO), temperaturforandringer og lave eller høye nivå av jern. Det finnes også flere bakterielle signal som vil indusere oppløsning og spredning av biofilm. (McDougald, Rice et al. 2012) Som for

eksempel AHL som står sentralt i QS hos Gram-negative og auto induserende peptider har en tilsvarende rolle hos Gram-negative (Smith, Fratamico et al. 2009; McDougald, Rice et al. 2012). I tillegg har det blitt vist at flyktige fettsyrer, D-aminosyrer, polyaminer samt en rekke enzymer kan ha en effekt på oppløsning og spredning av biofilm (Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012; McDougald, Rice et al. 2012).

2.7 D-Aminosyrer

Biofilm vil over tid eldes, samtidig vil også næringsstoffer ofte bli begrensede og avfallsprodukter vil hope seg opp. Det vil i dette tilfellet være bra for de biofilm assosierte bakteriene og trekke seg tilbake til en planktonisk tilværelse. Derfor vil biofilm ofte ha en begrenset levetid karakterisert med en eventuell oppløsning induisert av selvproduserte aminosyrer (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012).

Mange ulike fylum innenfor bakterier syntetiserer og slipper ut disse. D-aminosyrene. De styrer cellevegg regulering i stasjonær fasen av vekst og fører til splittelse i aldrende bakteriekulturer, som oftest kan sees som en oppløsning av biofilm (Cava, Lam et al. 2011).

Man har tidligere trodd at D-entaniomerere av aminosyrer har hatt liten innvirkning på biologiske prosesser. Mens L-aminosyrer ofte dominerer i naturen blir D-aminosyrer av og til funnet i proteiner som ikke blir syntetisert av ribosomer, og blant annet D-Ala og D-Glu blir rutinemessig funnet i peptidoglykanlaget hos bakterier (Cava, Lam et al. 2011).

Siden L-aminosyrer er den dominerende formen for aminosyrer i en organisme så vil de typisk virke som substrat for dannelsen av D-aminosyrer, ved konvertering fra L- til D-aminosyrer. Dette skjer ved hjelp av *racemases* som er enzymer som forandrer stereokjemien til det kirale α -karbonet i aminosyren. Aminosyre racemacer blir klassifisert i to grupper pyridoxal-5-fosfat som enten kan være PLP avhengig eller PLP uavhengige enzymer (Cava, Lam et al. 2011).

Det har blitt utført studier på *Bacillus subtilis* som i tester i laboratorier har laget flytende biofilm også kjent som pellickel i grenseflaten mellom vann/luft i et reagensrør (Branda, González-Pastor et al. 2001; Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012). Cellene i pellikelen vil være holdt sammen av en ekstra cellulær matrix som består av eksopolysakkarider og amyloid liknende fibre som i hovedsak er sammensatt av proteinet TasA (Branda, Chu et al. 2006; Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012).

De ble funnet at *B. subtilis* biofilm hadde en begrenset levetid hvor den modnet etter tre dager med inkubasjon i et biofilm induserende vekstmedium ved 22 °C. For så å gå i oppløsning etter åtte dager og dermed slippe ut individuelle planktoniske celler (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010). Det ble så studert hvordan cellene hos *B. subtilis* rømte fra matriksen i pellickelen for så å returnere til en planktonisk eksistens. Det ble funnet ut ved å tilsette supernatant fra åtte dager gamle kulturer til nye kulturer at gamle kulturer inneholdt stoffer som hindret pelliceldannelse i ferske kulturer. En av disse faktorene er en blanding av D-aminosyrer D-tyrosin, D-leucin, D-tryptofan og D-metionin. Disse aminosyrene er inkorporert i celleveggen peptidoglykan hvor de trigger frigivelse av amyloide fibre fra cellen (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Cava, Lam et al. 2011).

Funksjonen bak dette er som følger *B. subtilis* biofilmer blir holdt på plass av et ekstracellulært matriks som inneholder celle ankrede amyloide fibre som består av det amyloidogeniske proteinet TasA (Romero, Vlamakis et al. 2011). Som tidligere nevnt så vil biofilmer oppløses over tid fordi cellene frigir de amyloide fibrene. Dette tror man er en konsekvens av at man får inkorporert D-aminosyrer i celleveggen (Romero, Vlamakis et al. 2011).

Man har også studier som viser at D-aminosyrer også hindrer biofilmdannelse hos andre stammer da hos *Staphylococcus aureus* og *Pseudomonas aeruginosa* (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010).

Bakterier produserer D-aminosyrer i stasjonærfasen av vekst. D-aminosyrer som, D-tyrosin, D-leucine, D-tryptofan og D-metionin var alle aktive i inhiberingen av biofilm i flytende og solid medium (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010). Dette var i kontrast til korresponderende L-isomerer og D-isomerer av aminosyrer som D-alanin og D-fenylalanin som viste seg og være inerte i studien. Studien testet så videre hvilke minimumskonsentrasjoner man skulle legge seg på for å få en effekt på hemming av biofilm. Resultatet ble varierende konsentrasjoner, der D-tyrosin viste seg å være mest effektiv med 3µM i forhold til D-metionin 2 mM og D-tryptofan 5 mM og til slutt D-leucine med en konsentrasjon på 8,5mM. Det ble også påvist at en blanding på ~10 nM av disse D-aminosyrer, kunne virke synergistisk hemmende på biofilm (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010).

2.8 Enzymer

Dispersin B er en N-acetylglukosaminidase produsert av bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Dispersin B katalyserer hydrolysen av acetylglukosamin et ekstracellulært polysakkarid produsert av blant annet *Staphylococcus epidermidis*. Enzymet virket ved å frigi ekstracellulært slim fra *S. epidermidis* celler. Noe som hindret biofilmdannelse hos bakterien. Det ble også foreslått at dispersin B kunne ha den samme virkningen hos andre bakteriearter (Kaplan, Ragunath et al. 2004). Proteinase K er et annet enzym hvor man har fått demonstrert en virkning ved bruk av dette i forskjellige *Staphylococcus aureus*-stammer. Det ble påvist at Proteinase K både kunne hemme biofilmdannelse og oppløse allerede tilstedeværende biofilm hos *S. aureus* (Boles and Horswill 2008).

I en studie på DNase I, ble det funnet at denne ga full oppløsning av biofilm ved konsentrasjoner over 15 ng/ml, konsentrasjoner under ville hemme biofilmdannelse men full oppløsning ble ikke observert. Dette ble utført på både Gram-positive og Gram-negative henholdsvis da hos *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* og *Pseudomonas* (Nijland, Hall et al. 2010).

Trypsin er en serin protease som er splitter peptidbindinger hos lysin og arginin. Dette enzymet har vist seg effektivt hos blant annet *S. aureus* stammer (Gilan and Sivan 2013).

2.9 Norspermidin

Det har blitt vist at et polyamin ved navn norspermidin kan ha en virkning på oppløsning av biofilm. Dette ble oppdaget hos *Bacillus subtilis* (Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012). I tillegg til å produsere D-aminosyrer for oppløsning ved at de virker på protein komponenter i biofilmmatriks, produserte *B. subtilis* i tillegg dette polyaminet som sammen med D-aminosyrer fungerte som en oppløsningsfaktor for biofilm. Man tror norspermidin spesifikt virker på eksopolysakkarider i biofilmen. Norspermidin ble også testet på to andre arter da forholdsvis *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* resultatene viste også her at biofilm ble inhibert. Det ble også vist at et nærstående polyamin som spermidin ikke hadde den samme effekten (Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012).

2.10 Biofilm i næringsmiddelindustrien og tilhørende biofilmkontroll

Biofilmkontroll er storkapital og så langt har man bare få metoder for nedkjøpning av dette problemet. Det blir blant annet bedrevet forskning på nye antimikrobielle stoffer som kan trenge gjennom biofilm samt legemiddel som hindrer biofilmdannelse ved at de blander seg inn i den intercellulære kommunikasjonen mellom mikroorganismene. En klasse kjemikalier kalt furanoner har blant annet vist lovende resultater i å forhindre utvikling av biofilm på abiotiske overflater (Madigan, Matinko et al. 2009).

Biofilm er et stort problem innen næringsmiddelindustrien og kan i enkelte tilfeller være en kilde til mikroorganismer som er patogene for mennesker. Et stort faremoment vil selvfølgelig være at en potensiell patogen kan feste seg til denne biofilmen, for eksempel *Escherichia coli* i næringsmiddelproduksjonen og *Legionella* i kjøletårn. En slik situasjon kan ofte bety at produksjon må stenges i en lengre tid noe som vil gi firmaet tapte inntekter. Biofilm kan svært ofte være vanskelig å fjerne og få kontroll over. Svært mange biocider er ineffektive til bruk ved fjerning av biofilm og vil på sitt beste bare nesten være i stand til og fjerne planktoniske mikrober. Man vil da stå igjen med en intakt biofilm som kan fortsette å rekontaminere og bygge resistanse mot antimikrobiologiske stoffer (Grinstead 2009). Det har blitt vist at mikroorganismer i biofilm er mer resistente mot mange toksiske substanser som antibiotika, klor og vaskemidler det finnes bevis på at dette skyldes lavere diffusjon av stoffer fra utsiden og inn i biofilmen samt lavere cellevekst og biofilm spesifikke stoffer som eksopolysakkarider og QS-effekter (Watnick and Kolter 2000).

I næringsmiddelindustrien finnes et utall ulike måter for å fjerne biofilm. Det er ofte vanlig å benytte en kombinasjon av alkaliske midler og mekaniske krefter for å fjerne biofilm (Simões, Simões et al. 2010). Mot organisk materiale som karbohydrater, proteiner og fett vil ofte alkaliske og enzybaserte vaskemidler være bra. Mot uorganisk materiale som salt, kalsiumnitrat og fosfat vil ofte syrebaserte vaskemidler være effektive. Hovedbestanddelen i en biofilm vil da være karbohydrat men den vil også inneholde protein, lipider og nukleinsyrer. Biofilmen vil også inneholde bakterier som i hovedsak består av karbohydrat, protein, fett og salt. Derfor kan man se på biofilm som organisk/uorganisk material som man har behov for å fjerne i næringsmiddelindustrien (Grinstead 2009).

Biocider kan også være nyttig til bruk og fjerning av biofilm. Det har blitt utført mye forskning på området hvor man i grove trekk har funnet ut at biocider har en effekt, men ikke så bra som

man ønsker at den skal være (Grinstead 2009). Flere studier viser til at biocider ikke har så god effekt på bakterier i biofilm, man tror at dette skyldes barrierer i den polysakkarid-baserte biofilmen som gjør at biocidene ikke klarer å trenge inn i like stor grad (Simões, Simões et al. 2010). Vanlig brukte biocider er stoffer som klordioksid, hydrogenperoksid, ozon og jod men også flere finnes (Grinstead 2009).

Oppsummert vil den beste måten å fjerne biofilm på eller hindre den fra å dannes ikke være biocider eller desinfiseringsmidler men effektiv og hyppig rengjøring. Hvis rengjøringsprosessene blir optimert slik at man fjerner mest mulig smuss, så vil de samme rutinene være med på fjerne mest biofilm. Biocider alene kan ikke kontrollere biofilm men vil sammen med rengjøring gi en høyre sikkerhet mot biofilmdannelse. Effektiv og nøyaktig rengjøring vil også sikre at biocider og desinfiseringsmidler gjør en bedre jobb (Grinstead 2009).

2.11 Bakterieslekter

Slekt *Serratia*

Rette staver 0,5- 0,8 μm i diameter og 0,9- 2,0 μm i lengde. Gram-negative bevegelige med peritrikk flagell. Fakultativ anaerob. Kjemoorganotrof ved at den både har respiratorisk og fermentativ metabolisme. De vokser bra ved 30-37 °C. D-glukose og andre karbohydrater blir brutt ned ved katabolisme som fører til dannelse av syre og gass. H_2S blir ikke produsert, urea blir ikke hydrolisert og malonate blir vanligvis ikke brukt. De fleste stammer produserer DNase og hydroliserer maisolje. Gelatin blir vanligvis hydrolisert, den er nitratreducerende. Karbohydrat blir fermentert av flere eller alle stammer inkludert maltose, D-mannitol, D-mannose, salicin, sukrose og trehalose. Bakterien kan forekomme i kliniske prøver hos mennesker, i jord, vann, planteoverflater i tillegg til fordøyelseskanalen hos gnagere og insekter. Kan forårsake mastitt hos kyr. *S. marcescens* er blant annet en fremtredende opportunistisk nosokomial og kan gi blodforgiftning og urinveisinfeksjon, men også flere andre arter kan forårsake bakteriemi (Holt, Krieg et al. 1994).

Det har blitt observert biofilmdannelse hos *S. marcescens* på glass, polystyren- mikrotiterplate og på urin kateter i silikon (Smith, Fratamico et al. 2009). Man har også sett at forandringer i vekstmedium for *S. marcescens* vil kunne forandre morfologien på biofilmen som ble dannet. Fra enten en trådaktig til en mer «klassisk» mikrokoloni type biofilm. Spesielt ville et

vekstmedium med lavt innhold av næringsstoffer foretrekke en dannelse av mikrokoloni struktur på biofilm hos *S. marcesens*. Det ble også gjort observasjoner som tyder på at biofilmstruktur hos denne bakterien er dynamisk og kan forandre seg alt etter hvilke forhold den lever i (Rice, Koh et al. 2005).

Slekt *Pseudomonas*

Rette eller litt bøyde, men ikke spiralformede staver. 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm. Mange arter akkumulerer poly-β-hydroksybutyrate som karbon reserver som kommer frem som «sudanofile inklusjoner» Cellene farges Gram-negative og motilitet skjer ved en eller flere polare flageller. De er sjelden ubevegelige, noen stammer kan også ha en sideveis flagell med kortere bølgelengde. De er aerobe og har en strikt respiratorisk metabolisme med oksygen som elektronakseptor, i noen tilfeller kan nitrat brukes som alternativ elektronakseptor noe som gjør at vekst kan skje ved anaerobe betingelser. De er ofte psykotrofe og de fleste stammer hvis ikke alle, har problemer med å vokse når omgivelsene blir for sure (pH 4,5) (Holt, Krieg et al. 1994; Smith, Fratamico et al. 2009). De fleste stammer krever ikke organiske vekstfaktorer. De er oksidase positive/negative, katalase positive og kjemolitotrofe som gjør dem i stand til å bruke H₂ eller CO som energi kilder. Finnes med stor utbredelse i naturen, der noen stammer er patogene for mennesker dyr og planter (Holt, Krieg et al. 1994).

Biofilm hos *Pseudomonas* dannes i grenseflater mellom faste legemer og væske, i miljøer som kontinuerlig blir utsatt for næringsstoffer. *Pseudomonas* er beryktet for å produsere tykke lag med biomasse, strukturert i soppe- eller pilar lignende former. Dog vil ikke alltid *Pseudomonas* spp. følge denne strukturen og flere faktorer spiller inn for hvordan formen på biofilmen blir seende ut (Korber, Mangalappalli-Illathu et al. 2009). *P. aeruginosa* har blant annet vist at den kan danne en biofilm som er resistent mot antibiotika (Drenkard and Ausubel 2002). Det har også blitt vist hos *P. aeruginosa* at oppløsning av biofilm vil øke ved utarming av næringsstoffer. Hos *P. fluorescens* ble det påvist at biofilm ble oppløst ved mangel på organisk karbon, glukose eller nitrogen og biofilm hos *P. putida* raskt ville oppløses ved mangel på karbon (McDougald, Rice et al. 2012).

Slekt *Acinetobacter*

Staver på 0,9-1,6 µm i diameter og 1,5-2,5 µm i lengde. Får en kokkeformet fasong under den stasjonære vekstfasen. De opptrer som regel i par, men også i kjeder av variabel lengde. Celler lager ikke sporer, er Gram-negative men av og til vanskelige å farge. Fremviser dårlige

svømmeegenskaper men har evnen til å bevege seg langs faste legemer, i hovedsak på grunn av tilstedeværelsen av polar fimbriae. De er aerobe med oksygen som elektron akseptor. Alle stammer vokser mellom 20-30 °C der de fleste stammer har et optimum mellom 33-35 °C. De er oksidase negative og katalase positive. De fleste stammer vokser i et definert vekstmedium som inneholder en enkel karbon og energi kilde. De bruker ammonium og nitrat salter som kilde til nitrogen og har ingen krav til vekstfaktor. D-glukose er den eneste heksosen brukt av noen stammer. Pentosene D-ribose, D-xylose og L-arabinose kan bli brukt som karbonkilde av noen stammer, finnes vanligvis i jord, vann og kloakk (Holt, Krieg et al. 1994). Er også tilstedeværende ved sykehus hvor spesielt en art, *Acinetobacter baumannii* har blitt assosiert med utbrudd av nosokomiale infeksjoner (Marti, Rodriguez-Bano et al. 2011).

Det finnes en studie som peker på at biofilmdannelse hos *Acinetobacter spp* er mer effektiv ved 25 °C enn ved 37 °C og at *Acinetobacter spp.* kan danne biofilm i grenseflater mellom fast stoff og vann. Det ble også påvist at det såkalte *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (ACB) kompleks kunne produsere biofilm i sjikte mellom væske og luft en såkalt pellickel, noe som ikke ble observert hos andre *Acinetobacter*. (Marti, Rodriguez-Bano et al. 2011).

I en studie utført av Lipski hvor pionér biofilmdanner i næringsmiddelindustrien ble analysert fant man ut at opp mot 71 % av alle celler hørte til *Acinetobacter spp*. Eksperimenter viste også at *Acinetobacter spp.* kleber seg hurtigere og mer solid til rustfritt stål en de fleste andre mikroorganismer. Dermed vil de kunne gi andre mikroorganismer et fundament hvor de enklere kan slå seg ned og gjennom proliferasjon vil de kunne danne en fullt utviklet biofilm (Lipski 2005).

Slekt: *Bacillus*

Celler er stavformede og rette med et mål på mellom 0,5-2,5 x 1,2-10 µm. Ofte finner du de i par eller i klynger. De er Gram-positive og er bevegelige ved hjelp av peritrikk flagell. Endosporene er ovale men av og til runde eller sylindrisk i form. Det er ikke mer enn en spore per celle og sporedannelsen blir ikke hemmet av tilgang på luft. Bakterien er aerob eller fakultativt anaerob. Med et stort spekter av fysiologisk evner når det kommer til pH, salinitet og høye temperaturer. Bakterien er kjemoorganotrof med fermentativ og respiratorisk metabolisme. Vanligvis katalase positiv. Funnet i en rekke habitater, et fåtall er patogene mot virvel og virvelløse – dyr. (Holt, Krieg et al. 1994)

Biofilmdannelse har blitt påvist hos *Bacillus cereus*. Overflater hvor denne bakterien danner biofilm er glassfiber, rustfrittstål, polystyren-mikrotiterplater, glass, polyamide-6, polyvinyl klorid og teflon. Dette kan i næringsmiddelindustrien føre til biocide resistent biofilm i produksjon (Korber, Mangalappalli-Illathu et al. 2009). Hos *B. cereus* er biofilmdannelsen mest effektiv i sjiktet mellom vann luft og det har ikke blitt observert like mye biofilmdannelse ved mer anaerobe vilkår. (Smith, Fratamico et al. 2009) På grunn av sporedannelse er de også svært resistente mot stressfaktorer som varme og desinfeksjon (Korber, Mangalappalli-Illathu et al. 2009; Madigan, Matinko et al. 2009).

Slekt *Psychrobacter*

Kokkibasiller 0,9-1,3 x 1,5-3,8 µm. Vanligvis oval formede, mens stavene kan variere i lengde. Gram-negative, ikke bevegelige celler. Cellene er aerobe og ikke sporedannere. De er katalase og oksidase positive der de fleste stammer er psykotrofe. De har mulighet til å vokse ved 5 °C og har et temperaturoptimum rundt 20 °C de vokser vanligvis ikke ved 35-37 °C. De stammene som vokser bra ved 35-37 °C har vanligvis ikke muligheten til å vokse ved 5 °C. *Psychrobacter* blir ofte assosiert med fisk og fjørfe og prosessert kjøtt. Mange stammer produserer syre ved aerobe forhold fra glukose og mange flere andre sukkerarter. De fleste stammer danner syre fra glukose og andre sukkerarter ved aerobe forhold. De deaminerer fenylalanin og tryptofan, inneholder urease, reduserer nitrat og hydrolyserer Tween 80. Kan ikke produsere syre fra fruktose eller sukrose og kan heller ikke hydrolysere stivelse (Holt, Krieg et al. 1994).

Slekt: *Rhodococcus*

Staver til forgrenede vegetative mycel kan bli dannet. I alle stammer blir den morfogenetiske syklusen initiert i kokke eller en mindre utviklet stavform. Farges Gram-positive. De er aerobe og delvis syrebestandige. Sensitive mot lysozym. Finnes i en rekke miljøer, da spesielt i jord og gjødsel fra planteetere. Noen stammer er patogene for dyr og mennesker (Holt, Krieg et al. 1994).

Slekt: *Kocuria*

Arter innenfor slekten *Kocuria* er aerobe gram positiv bakterie med en kokkoid form (Ma, Wong et al. 2005; Takarada, Sekine et al. 2008) Bakterien tilhører familien *Micrococcaceae* i ordenen *Actinomycetales*. Slekten *Kocuria* ble opprettet fra slekten *Micrococcus*. Medlemmer av denne slekten har blitt isolert fra blant annet skinn hos pattedyr, jord, fermentert mat, ferskvann og marine sedimenter. Slekten inneholder flere halotolerante og fenol degraderende stammer.

Kocuria spp. har de senere årene fått økt fokus på grunn av sine egenskaper som gjør de kan være årsaken til nosokomiale infeksjoner (Takarada, Sekine et al. 2008; Savini, Catavittello et al. 2010).

Slekt *Escherichia*

Rette staver 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm forekommer alene eller i par. Gram-negative, bevegelige med peritrikk flagell eller ubevegelige. Fakultativt anaerobe, kjemoorganotrofe ved at de både har en respiratorisk og en fermentativ metabolisme. Optimal temperatur er 37 °C. D-glukose og andre karbohydrater blir brutt ned og det dannes syre og gass. Er oksidase negative og katalase positive, metylrødt positive og voges-proskauer negative og vanligvis citrat negative. Negative for H₂S, urea hydrolyse og lipase. Stammer i *Escherichia* reduserer nitrat og alle, eller de fleste stammene fermenterer L-arabinose, maltose, D- mannitol, D-mannose, L-rhamnose, trehalose og D-xylose. Forekommer som normal flora i de nedre delene av tarmen hos jevnvarme dyr med et spesielt unntak, *Escherichia blattae* hos kakerlakker. *E.coli* stammer som inneholder enterotoksiner eller andre virulensfaktorer som invasivitet og koloniseringsfaktorer kan gi diaré. *E. coli* kan også være en årsak til urinveisinfeksjon og nosokomial infeksjoner som blodforgiftning og meningitt. *E. blattae* er en annen sjeldne forekommende opportunistiske patogener, som vanligvis blir assosiert med infeksjoner i sår (Holt, Krieg et al. 1994).

Stammer av *E. coli* danner biofilm på glassoverflater, rustfritt stål, polyetylen, polyamide-6, polyvinyl klorid, Teflon kuponger, fiberglass og polystyren mikrotiterplater (Smith, Fratamico et al. 2009). Systemet for quorum sensing hos *E. coli* som har er en SdiA LuxR homolog har mulighet til å oppdage AHL men ikke er i stand til å produsere disse selv (Kanamaru, Kanamaru et al. 2000; Walters and Sperandio 2006). Man har også funnet resultater som viser at uropatogen *E. coli* stammer produserte veldig lite biofilm på polystyren-plater og i glassrør (Ferrières, Hancock et al. 2007). Mens en annen *E. coli* stamme O157:H7 kan danne biofilm på rustfritt stål, polystyren-materiale, petriskåler og glass (Pawar, Rossman et al. 2005).

Slekt: *Pantoea*

Pantoea agglomerans het tidligere *Enterobacter agglomerans* men på grunn av dens manglende evne til å ta i bruk blant annet ornithine så ble den flyttet. Rette staver 0,5-1,0 x 1-3 µm. Gram-negative. Bevegelig med peritrikk flagell. De fleste stammer produserer et gult pigment Fakultativ anaerob. Kjemoorganotrof har både respiratorisk og fermentativ metabolisme. Optimal temperatur er 30 °C. D-Glukose og andre karbohydrater blir brutt ned ved

dannelse av syre men ikke gass. Oksidase negativ og katalase positiv. Indol negativ, Voges-Proskauer og Simmons citrat positiv. Metyl rød variabel. Ingen produksjon av H₂S eller hydrolyse av urea. Slekten er nitrifiserende. Karbohydrater fermenteres av de fleste stammer og inkluderer L-arabinose, D-galaktose, maltose, D-mannitol, D-mannose, L-rhamnose, sukrose, trehalose og D-xylose. Isolert fra overflater på planter, frø, jord, vann samt fra sår hos mennesker og dyr. De er en opportunistisk human patogen (Holt, Krieg et al. 1994).

Slekt Citrobacter

Rette staver omkring 1 µm i diameter og 2-6 µm i lengde opptrer alene og i par. Gram-negative, vanligvis motile ved hjelp av peritrik flagell. Fakultativ anaerob. Kjemoorganotrof ved at de både har en respiratorisk og en fermentativ metabolisme. Optimal temperatur er 37 °C. D-Glukose og andre karbohydrater blir brutt ned ved dannelse av syre og gass. Oksidase negativ og katalase positiv. Reduserer nitrat. Karbohydrater blir vanligvis fermentert inkludert L-arabinose, cellobiose, glycerol, maltose, D-mannitol, L-rhamnose, D-sorbitol, trehalose og D-xylose. Finnes vanlig i feces hos mennesker og dyr. Noen stammer opptrer som patogener, blir også funnet i vann, kloakk og mat (Holt, Krieg et al. 1994).

Slekt Corynebacterium

Rette eller noe bøyd staver kan ha kileformet og av og til klumpeformede ender. Cellene er 0,3-0,8 x 1,5-8,0 µm. Cellene finnes ofte som enslige eller som par, ofte i en v-formasjon eller i en palisade med flere parallelle celler. De er Gram-positive dog farges noen celler ujevnt noe som kan gi noe som ligner på et perlebesatt mønster. Cellene er ubevegelige og ikke sporedannere, fakultativt anaerobe og ikke syrebestandige. Vanligvis kreves det et næringsrikt medium. De er kjemoorganotrofe med fermentativ metabolisme, de fleste stammer produserer syre uten gas fra glukose i tillegg til noen andre karbohydrater. Katalase positive og denitrifiserende. Danner sjelden syre fra laktose eller raffinose. Er i hovedsak obligate parasitter i slimhinner eller på hud hos pattedyr, men kan i noen tilfeller også finnes andre steder. Noen stammer er patogener for pattedyr (Holt, Krieg et al. 1994).

Slekt: *Brochothrix*

Normale uforgrenet staver mellom 0,6-0,7 x 1-2 μm som finnes som single eller i kjeder, eller i lange trådaktige kjeder som folder seg inn i knutelignede klumper. Kokkoide former kommer frem i eldre kulturer. De er Gram-positive, ubevegelige og ikke sporedannende. *Brochothrix* stammer er fakultativ anaerobe og produserer ikke pigmenter. De vokser ved temperaturer på 0-30 $^{\circ}\text{C}$. der optimum er 20-25 $^{\circ}\text{C}$. Hovedproduktet fra fermentering av glukose er L(+)-lactate. Celler er katalase positive og inneholder cytokromer. De farges metylrød og er Voges-Proskauer positive. *Brochothrix*-stammer finnes ofte i kjøttprodukter men kan også finnes i en rekke andre miljøer. (Holt, Krieg et al. 1994)

Slekt *Carnobacterium*

Tynne rette staver 0,5-0,7 x 1,0-2,0 μm finnes i par eller alene noen ganger i korte kjeder. Kan vokse ved anaerob forhold (Leisner, Laursen et al. 2007). Bakterien er Gram-positive og kan være både bevegelig og ubevegelig. De er kjemoorganotrofe, heterofermentative og produserer i hovedsak L(+)-laktat fra glukose. De vokser ved 10 $^{\circ}\text{C}$ men ikke ved 45 $^{\circ}\text{C}$ optimum er 30 $^{\circ}\text{C}$. *Carnobacteria* er katalase negative og nitrat blir ikke redusert. Bakterien er ikke sporedannende og celler blir vanligvis funnet i kjøttprodukter og fisk. En art *C. piscicola* er patogen for laks (Holt, Krieg et al. 1994).

Slekt *Curtobacterium*

Små korte uregelmessige staver i friske kulturer, 0-4-0,6 x 0,6-3,0 μm men blir kokkoide i eldre kulturer. Finnes anordnet som enslige celler, men av og til i par. Da ofte i en V-formasjon der ingen forgreining oppstår. De er Gram-positive men celler fra eldre kulturer blir lett avfarget. Er i hovedsak bevegelig med peritrik flagell. Ikke sporedannende og syrebestandig. Obligat aerob og vil på vekstmedium vanligvis gi oransje eller gule kolonier. De er kjemoorganotrofe og ikke spesielt krevende ernæringsmessig. Metabolismen er respiratorisk som gir små mengder syre fra glukose og noen andre karbohydrater. De er katalase positive og optimum veksttemperatur er 25-30 $^{\circ}\text{C}$. Finnes i planter og jord. *C. flaccumfaciens* er blant annet en plantepatogen (Holt, Krieg et al. 1994).

3.0 Material og metode

3.1.1 Vekstmedier

Vekstmedier ble sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 minutter. Flasker med buljong ble lagret ved romtemperatur. Agarskåler ble lagret i kjølerom. I tabell 3.1 ser man en oversikt over hvor i forsøket de ble benyttet.

Tabell 3.1: Oversikt over vekstmedier benyttet i oppgaven.

Vekstmedie	Forsøk der medium ble benyttet
Tryptone Soya Agar fra Oxoid (TSA)	Som medium til oppbevaring av bakteriestammer under forsøk
Tryptone Soya Broth fra Oxoid (TSB)	Generelt til vekst og biofilmdannelse i rør og i mikrotiterplater
TSB + 0,33 % D-glukose monohydrat + 0,26 % NaCl (TSBNG)	Forforsøk
TSB + 2 % D-glukose monohydrat + 0,5 NaCl (TSBNG2)	Forforsøk
TSB + 2 % D-glukose monohydrat + 2 % NaCl (TSBIND)	Forforsøk

3.1.2 Stamløsninger

En oversikt over løsninger som ble brukt i forsøkene vist i tabell 3.2 Det ble laget stamløsninger for de fleste stoffene med unntak av trypsin. D- og L-aminosyrer ble oppbevart på kjølerom mens enzymer ble oppbevart i fryser ved -18 °C. norspermidin ble oppbevart ved romtemperatur. Stamløsninger som ble tatt i bruk ble sterilfiltrert ved bruk av et 0,2 µm sterilfilter (WWR, international).

Tabell 3.2: Oversikt over stamløsninger benyttet i oppgaven

Stoff	Konsentrasjoner ved lagring	Løsningsmiddel	Leverandør
L/D-Prolin	50 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich
L/D-Fenylalanin	50 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich
L/D-Leucin	850 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich

L/D-Tryptofan	250 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich
L/D-Tyrosin	50 mM	Deionisert H ₂ O + NaOH (til oppløst, pH ca. +1)	Sigma-Aldrich
L/D-Metionin	200 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich
D-Alanin	50 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich
DNase (Deoxyribonuclease I)	25 mg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich
Dispersin B	2240 µg/ml	-	Kane, biotech inc.
Proteinase K	10 mg/ml	50 % glyserol 10 mM trisHCl	
Trypsin	I pulver form	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich
Norspermidin	20 mM	Deionisert H ₂ O	Sigma-Aldrich

3.1.3 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer

Bakteriestammer ble oppbevart i fryser ved -80 °C i 20 % glyserol og 80 % vekstmedium.

Bakteriestammer ble tatt opp fra frys og podet ut på TSA. Disse ble dyrket opp ved 30 °C ca. 24 timer. Renkulturer ble så podet over til en ny TSA-skål som gjennomgikk samme prosess. Disse ble så lagret ved 4 °C. For å holde kulturene ferske ble bakteriestammene med jevne mellomrom podet over på en ny TSA-skål.

3.1.4 Bakteriestammer

Det ble benyttet 41 bakteriestammer i dette forsøket med flere stammer innenfor bakterieslekter som dominerer på overflaten i næringsmiddelindustrien. Bakteriestammene har forskjellig opphav, der de fleste er isolerte fra næringsmiddelindustrien mens noen er laboratoriestammer fra American Type Culture Collection (ATCC.) For en fullstendig liste over bakteriestammene se tabell 3.3.

Tabell 3.3: Tabell over ulike bakteriestammer.

Stamnummer fra database hos Nofima (MF)	Slekt/art	Opphav
3627	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Slakteri
3293	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Klorforbad, væske

3.0 Material og metode

4122	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Fiskebedrift Å
4091	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Fiskebedrift K
3290	<i>Acinetobacter wloffii</i>	Svaber fra klorfotbad meieri
1987	<i>Bacillus subtilis</i>	=ATCC6051=NCTC6051 Dette er stammen brukt av Kolodkin-gal for D-aminosyrer (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010)
3142	<i>Bacillus cereus</i>	Meieri, hygieneprøve
3282	<i>Bacillus fuciformis</i>	Svaber fra klorfotbad meieri
3141	<i>Bacillus pumilis</i>	Meieri, hygieneprøve
4705	<i>Bacillus subtilis</i>	Fiskefôrfabrikk
3732	<i>Geobacillus staerothermophilus</i>	Småskala osteprodusent G
3729	<i>Psychrobacter</i>	Småskala osteprodusent D
4641	<i>Psychrobacter pulmonis/faecalis</i>	Kjøttforedling, transportbånd
4104	<i>Psychrobacter glacincola</i>	Fiskebedrift Å
4707	<i>Psychrobacter faecalis</i>	Fiskefôrfabrikk
3000-4	<i>Pseudomonas sp.</i>	Fôrfabrikk
3601	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Slakteri
1944	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC17400
K96.6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fiskebedrift K
1943	<i>Pseudomonas fragi</i>	ATCC4973
K.96.4	<i>Pseudomonas fragi</i>	Fiskebedrift K
3600	<i>Pseudomonas fulgida</i>	Slakteri
3720	<i>Pseudomonas putida</i>	Småskala osteprodusent O
3376	<i>Rhodococcus equi</i>	DSM20307
3727	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Småskala osteprodusent O
4633	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Kjøttforedling, transportbånd
4659	<i>Rhodococcus fascians</i>	Kjøttforedling, transportbånd
3971	<i>Serratia liquefaciens</i>	Fiskebedrift K
3613	<i>Serratia marcescens</i>	Slakteri
2326	<i>Serratia marcescens</i>	Foredlingsbedrift fjørfe, gulv
2602	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC13880
3612	<i>Serratia proteamaculans</i>	Slakteri
3784	<i>Kocuria sp.</i>	Småskala osteprodusent DB
3620	<i>Kocuria rhizophila</i>	Slakteri
3631	<i>Citrobacter freundii</i>	Slakteri

4701	<i>Corynebacterium simulans</i>	Fiskefôrfabrikk
4709	<i>Curtobacterium flacuumfaciens</i>	Fiskefôrfabrikk
3733	<i>Escherichia coli</i>	Småskala osteprodusent G
3001-1	<i>Pantoea agglomerans</i>	Fôrfabrikk
K96.9	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	Fiskebedrift K
4109	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Fiskebedrift Å

3.1.6 Tillaging av overnattkulturer

- Ved tillaging av overnattkultur ble enkeltkolonier fra TSA-skål podet til 3 ml TSB og dyrket opp ved 30 °C i ca. 24 timer.

3.1.7 Rørmetode

Steg 1

- 30 µl fra overnattkulturen ble overført til nytt ripefritt glassrør med 3 ml TSB. Glassrøret bør være ripefritt for å få en mest mulig nøyaktig og uniform måling av biofilm
- Rør ble så inkubert ved 30 °C og 150rpm risting

Steg 2

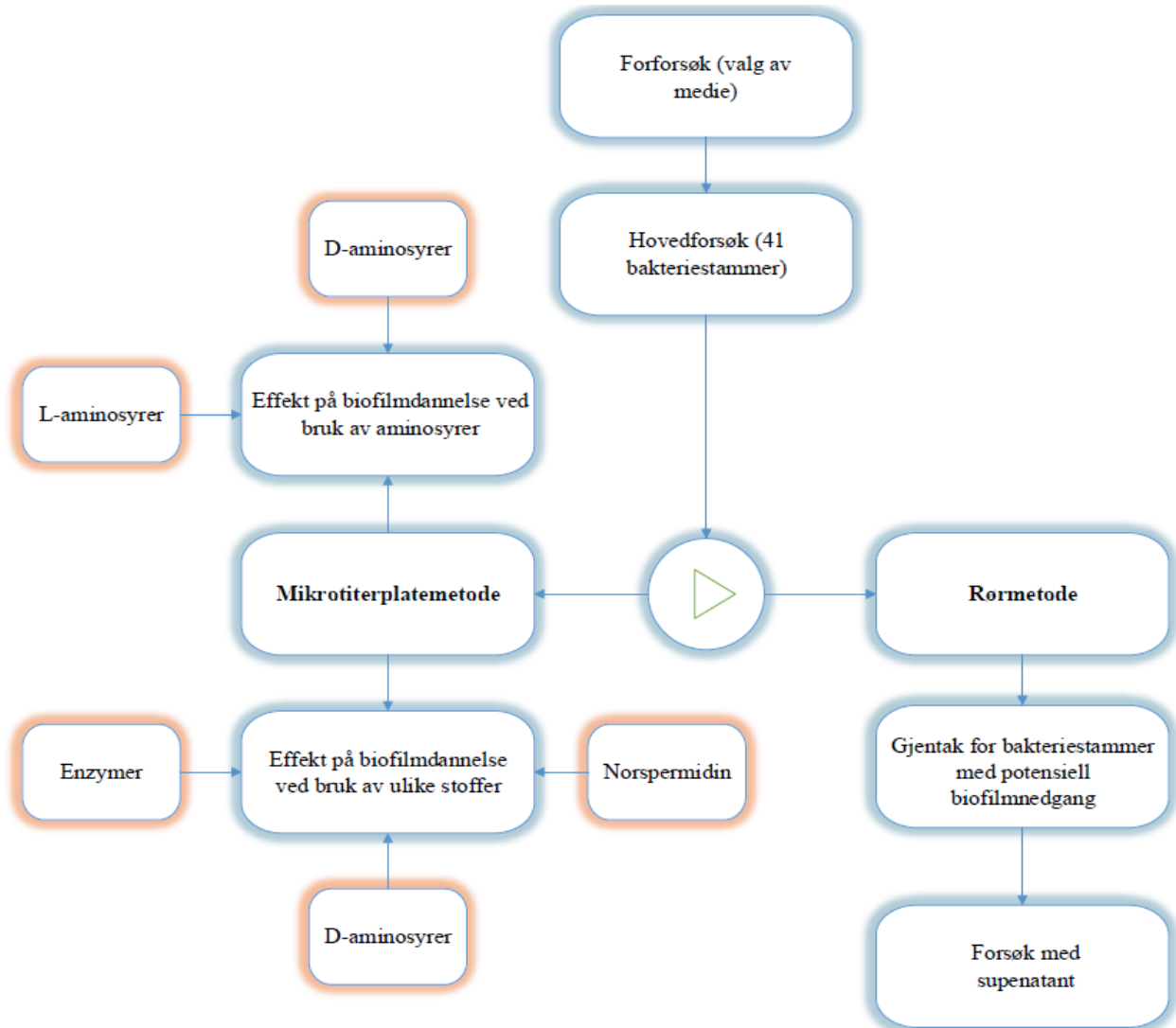
- Etter inkubering ble vekstmediet tømt ut. hvert rør ble vasket tre ganger med deionisert vann (DH₂O)
- Det ble så observert for eventuell synlig biofilm
- Det ble så farget med krystallfiolett. Hvert rør ble tilsatt 4 ml 0,1 % krystallfiolett med en virketid på omtrent fire minutter
- Krystallfiolett-løsningen ble så helt ut og de ble etterskylt fire ganger med DH₂O.
- Biofilmdannelse ble så observert og dokumentert
- Rør ble så tilsatt 4 ml surgjort etanol (0,2 % 37 % HCl til 99,8 % etanol) og whirlmixet før en overførte en 1 ml fra hvert rør til sin egen kyvette
- A 600nm ble så målt med et spektrofotometer (Ultrospec, 3000, Pharmacia Biotec, USA) opp mot deionisert vann for hver enkelt kyvette

3.1.8 Mikrotiterplatemetode

- Mikrotiterplater ble inkubert ved 30 °C

- Etter inkubering ble først A 600nm målt (SpectroStar Nano, Bmg labtech, Tyskland) som et mål på total vekst.
- Kultur ble så helt av brett og brettet ble vasket med DH₂O i to trinn med en platevasker (Wellwash AC, Thermo Electron Corporation, USA)
- Det ble så tilsatt 200 µl 0,1 % krystallfiolett med virketid på ca. 4 minutter. Før man igjen vasket brettet med DH₂O i en tre trinns prosess med den samme platevaskeren
- Det ble så tilsatt 200 µl surgjort etanol til hver brønn, før brettet gjennomgikk en ristefase på to minutter (Vari-shaker, Dynatec, Askim, Norge) for å sikre at fargen i hver brønn ble blandet
- 100 µl surgjort etanol og farge ble så overført til et nytt brett før man målte A 600nm som et mål på biofilmdannelse

3.1.9 Oversikt over hva som ble gjort i forsøket



Figur 3.1: Flytskjema over hva som ble gjort i forsøket.

3.2 Innledende forsøk

De ble utført et innledende forsøk med åtte stammer der man så på biofilmdannelse i rør og i mikrotiterbrett. Hensikten var å finne frem til et vekstmedium som gir god biofilmdannelse. Bakteriestammer brukt i forforsøket var.

-MF 3627 *Acinetobacter calcoaceticus*

-MF 4641 *Psychrobacter pulmonis/faecalis*

- MF 3720 *Pseudomonas putida*
- MF 4633 *Rhodococcus erythropolis*
- MF 3612 *Serratia proteamaculans*
- MF 3733 *Escherichia coli*
- MF K96.9 *Brochotrix thermospacta*
- MF 4109 *Carnobacterium maltaromaticum*

Vekstmedier benyttet i dette forsøket var TSB, TSBNG, TSBNG2 og TSBind. Det har tidligere blitt vist at en blanding av NaCl og glukose kan øke biofilmdannelsen hos stafylokokker (Møretrø, Hermansen et al. 2003; Rode, Langsrud et al. 2007).

Disse åtte bakteriestammene ble dyrket som overnattkulturer se punkt 3.1.6. Deretter ble 100 µl av en 1:100 fortykning ble overført til en brønn med 100 µl TSB i et mikrotiterbrett og 30 µl ble overført til et ripefritt glassrør med 3 ml TSB. Begge ble inkubert i to dager. Disse ble så videre behandlet etter steg 2 i metode gitt i punkt 3.1.8 for rør og punkt 3.1.9 for mikrotiterplater. Ut i fra resultatene observert i innledende forsøk ble det besluttet å bruke TSB som generelt vekstmedium videre i arbeidet.

3.3 Rørmetode

3.3.1 Biofilmdannelse i glassrør over en fastsatt tidsperiode

Ulike studier peker på bakteriestammers evne til å danne biofilmopløsende komponenter (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Boles and Horswill 2011; Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012). Alle stammene i tabell 3.1.5 ble sjekket for biofilmdannelse over en periode på 14 dager med uttak på dag 1, 2, 6, 10 og 14. I tillegg ble det tatt med en blank kontroll som gjennomgikk samme prosess som øvrige hvor snittverdien senere ble trukket fra hver bakteriestamme. Formålet med oppgaven var å se på ulike stammers evne til og produsere biofilm og om enkelte stammer ville få en nedgang i biofilm på grunn av egenproduserte komponenter. Forsøket ble startet opp ved tillaging av overnattkulturer beskrevet i punkt 3.1.6. Neste dag ble forsøket satt i gang med overføring av bakteriesuspensjon til nytt rør etter punkt 3.1.7 steg 1 På uttaksdager ble

forsøket gjennomført etter punkt 3.1.7 steg 2. For bakteriestammer der biofilmdannelse så ut til å avta over tid ble forsøket gjentatt for å se om man fikk samme resultat.

3.3.2 Undersøkelse om supernatant fra potensielle bakteriestammer kan hemme biofilmdannelse

Man ønsket å se om supernatant fra ulike bakteriestammer der biofilm løsnet også hadde en effekt på biofilmdannelse ved inkubering sammen med ferske stammer.

Tabell 3.4: Bakteriestammer testet i supernatantforsøket.

Stammenummer fra Nofima (MF)	Bakteriestamme	Lagringstid (supernatant)	Virketid	Sterilfiltrert (0,2 µm)	Suspensjon (Styrkeforhold)
3282	<i>Bacillus fuciformis</i>	12 dager	6 dager	Ja	1,5 ml 2x TSB + 1,5 ml supernatant
3613	<i>Serratia marcescens</i>	6 dager	1.5 dager	Ja	1,5 ml 2x TSB + 1,5 ml supernatant
2326	<i>Serratia marcescens</i>	6 dager	1.5 dager	Ja	1,5 ml 2x TSB + 1,5 ml supernatant
2602	<i>Serratia marcescens</i>	3 og 6 dager	1.5 dager	Ja/nei	1,5 ml 2x TSB/TSB + 1,5 ml supernatant

Starten på forsøket ble utført i henhold til punkt 3.1.6 og punkt 3.1.7 steg 1. Ut i fra tidligere observasjoner gjort i rørmetodeforsøket ble det bestemt hvilke og hvor lenge bakteriestammene skulle lagres før høsting, dette blir gjort i henhold til tabell 3.4. Etter endt lagringstid ble supernatanten overført til sentrifugerør (WWR, international) og sentrifugert ved 4200 rpm i 20 minutt ved romtemperatur (Sorwall RC5C plus, Thermo Scientific, USA). Dette ble gjort for å spinne ned cellematerial, som ikke var ønskelig å ha med videre. Supernatanten ble så eventuelt sterilfiltrert, se tabell 3.4 og oppbevart ved -18°C.

Videre ble supernatant testet mot den samme bakteriestammen den kom fra i et styrkeforhold på 50 % i TSB med dobbel konsentrasjon og en lagringstid som oppgitt i tabell 3.4. Det ble også laget rør som inneholdt 1,5 ml DH₂O og 1,5 ml TSB i dobbel konsentrasjon (2 x TSB). Dette skulle fungere som en kontroll. Som en ekstrakontroll ble også rør med vanlig TSB podet med bakterieløsning. For MF 2602 ble det også kjørt et forsøk hvor man tok i bruk ufiltrert

supernatant i styrkeforhold 50 % og ved bruk av vanlig TSB. Kontroll i dette forsøket bestod av 1,5 ml vann og 1,5 ml TSB. Rørene ble så inkubert ved 30 °C og ristet ved 150 rpm ved en virketid som oppgitt i tabell 3.4.

3.4 Mikrotiterplatemetode

3.4.1 Ulike stoffer og effekt på biofilmdannelse i mikrotiterplater

Det er kjent fra litteraturen at enzymer og D-aminosyrer kan ha en effekt på biofilmdannelse hos bakterier (Kaplan, Rangunath et al. 2004; Boles and Horswill 2008; Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Nijland, Hall et al. 2010; Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012; Gilan and Sivan 2013). I tillegg har det blitt gjort kjent at polyaminet norspermidin også kunne ha den samme oppløsende effekten (Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012). På bakgrunn av denne informasjonen ble det derfor undersøkt om disse stoffene ville ha noen effekt på biofilmdannelse i mikrotiterbrett for bakteriestammer gitt i tabell 3.3. Enzymer, D-aminosyrer og norspermidin ble testet i konsentrasjoner i henhold til tabell 3.5.

Forsøket startet med tillaging av overnatkultur i henhold til punkt 3.1.6. Dagen etterpå fikk hvert enkelt stoff tilegnet seg sin egen mikrotiterplate. Stoffene ble tilsatt i TSB før tillaging i en 10 % sterkere form og 180 µl av denne blandingen ble overført til hver brønn. Senere ble 20 µl av en 1:100 overnatkultur overført for hver enkelt bakteriestamme, til et samlet volum på 200 µl i hver brønn. Noe som ville oppfylle den ønskede konsentrasjonen for hvert enkelt stoff. I tidligere forsøk har biofilm blitt behandlet med enzymer etter inkubering mens D-aminosyrer ble tilsatt før (Kaplan, Rangunath et al. 2004; Harmsen, Lappann et al. 2010; Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011). I dette forsøket ble alle stoffene tilsatt før inkubering.

Hvert Brett hadde blanke kontroller (ikke inokulert med bakterier), gjennomsnittet av denne A_{600nm}-verdien ble senere trukket fra hver enkelt bakteriestamme sin biofilmdannelse, for å gjøre opp for eventuelle feilkilder, som for eksempel avleiringer fra vekstmediet. Konsentrasjoner for tilsetning av D-aminosyrer, enzymer og norspermidin ble hentet fra litteraturen. Som vist i tabell 3.5. Mikrotiterplatene ble inkubert over to dager og resten av forsøket ble utført i henhold til punkt 3.1.8. For bakteriestammer som dannet lite biofilm over to dager ble det kjørt et ekstrarforsøk over 10 dager.

Tabell 3.5: Oversikt over ulike stoff og konsentrasjoner til mikrotiterforsøk.

Stoff	Konsentrasjoner under inkubering	Referanse
D-Prolin	0,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet mot <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm (Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011)
D-Fenylalanin	0,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet mot <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm (Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011)
D-Leucin	8,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet mot <i>Bacillus subtilis</i> biofilm (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010).
D-Tryptofan	5.0 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet mot <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm (Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011)
D-Tyrosin	0,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet mot <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm (Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011).
D-Metionin	2.0 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet mot <i>Bacillus subtilis</i> biofilm (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010)
DNase (Deoxyribonuclease I)	100 µg/ml	Konsentrasjon tidligere brukt mot <i>Listeria monocytogenes</i> biofilm (Harmsen, Lappann et al. 2010).
Dispersin B	50 µg/ml	Konsentrasjon tidligere brukt mot <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> og <i>Yersinia pestis</i> biofilm (Itoh, Wang et al. 2005)
Proteinase K	100 µg/ml	Konsentrasjon ble brukt mot <i>Staphylococcus epidermidis</i> og <i>S. aureus</i> (Kogan, Sadovskaya et al. 2006).
Trypsin	100 µg/ml	Konsentrasjon tidligere brukt mot <i>Staphylococcus spp.</i> biofilm (Chaignon, Sadovskaya et al. 2007)
Norspermidin	200 µM	Konsentrasjon brukt mot biofilm hos <i>Bacillus subtilis</i> (Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012)

3.4.2 Ulike konsentrasjoner av D- og L-Aminosyrer

For noe utvalgte bakteriestammer hvor man så en effekt på tilsats av D-aminosyrer ble det besluttet å teste D-aminosyrer i en 2mM konsentrasjon. I tillegg til de konsentrasjonene testet for D-aminosyrer i tabell 3.5. Dette ble gjort for å kunne sammenligne effekter av ulike aminosyrer

Det ble også besluttet å teste de samme aminosyrene som L-aminosyrer i de samme konsentrasjonene som for D-aminosyrer. Litteraturen peker blant annet på at disse vil være inaktive når det gjelder oppløsning av biofilm i motsetning til D-aminosyrer (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011). I tillegg ble D-alanin inkludert i forsøket. Tidligere forsøk viser at denne aminosyren også skal være inaktivt i inhibering av biofilm (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010). D-alanin ble testet i 2.0 og 5.0 mM konsentrasjon. Videre ble forsøket utført på samme måte som i punkt 3.4.1

3.5 Statistiske metoder

Microsoft Excel 2010 ble benyttet for behandling av data og for tillaging av diagrammer. MINITAB/Excel ble brukt til beregning av all statistikk. Resultater av statistiske metoder er gitt i vedlegg 2

4.0 Resultat

4.1.0 Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Biofilmdannelse ble undersøkt for 41 bakteriestammer over en periode på 14 dager. Forsøket ble utført en gang. Tabell 4.1 og 4.2 viser gjennomsnitt og standardavvik for biofilmdannelse hos slekter med mer enn to stammer ved henholdsvis to og 14 dager. Resultatet viser høye standardavvik noe som blant annet gir indikasjoner på store individuelle forskjeller innenfor slektene. *Pseudomonas* spp. dannet også signifikant ($p = 0,008$) mer biofilm i glassrør etter 14 dager enn *Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp. og *Serratia* spp. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller etter to dager. Man så også at biofilmdannelsen var større ved 14 dager enn ved to dager ($p = 0,000$). Der gjennomsnittet for to dager var 0.206 A 600nm og 1.105 A 600nm etter 14 dager.

Tabell 4.1: Gjennomsnitt og standardavvik for biofilmdannelse etter to dager (A 600nm) for bakterier dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

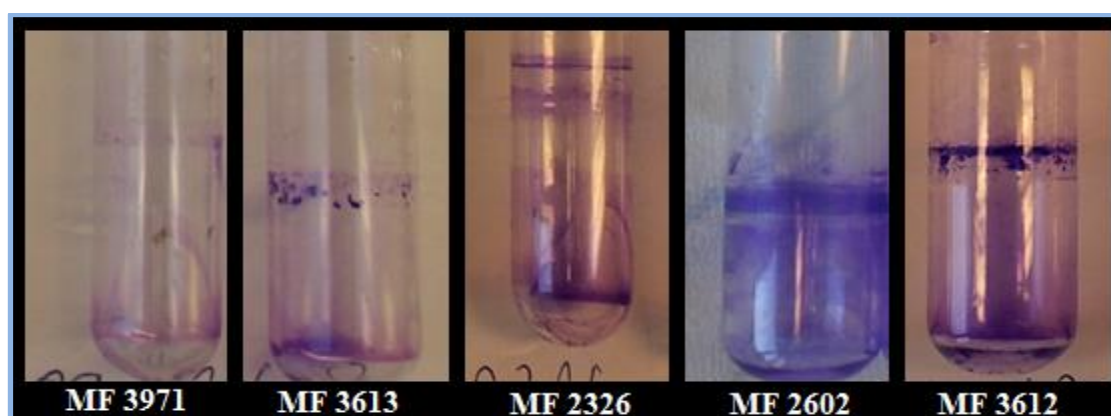
Bakterieslekt	Antall bakteriestammer	Gjennomsnitt	Standardavvik
<i>Serratia</i>	5	0,461	0,317
<i>Acinetobacter</i>	5	0,338	0,335
<i>Pseudomonas</i>	8	0,124	0,182
<i>Bacillus</i>	6	0,121	0,191
<i>Psychrobacter</i>	4	0,091	0,267
<i>Rhodococcus</i>	4	0,007	0,070

Tabell 4.2: Gjennomsnitt og standardavvik for biofilmdannelse etter 14 dager (A 600nm) for bakterier dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

Bakterieslekt	Antall bakteriestammer	Gjennomsnitt	Standardavvik
<i>Pseudomonas</i>	8	2,058	1,375
<i>Acinetobacter</i>	5	1,614	1,122
<i>Psychrobacter</i>	4	1,124	1,373
<i>Bacillus</i>	6	0,342	0,182
<i>Rhodococcus</i>	4	0,217	0,251
<i>Serratia</i>	5	0,208	0,369

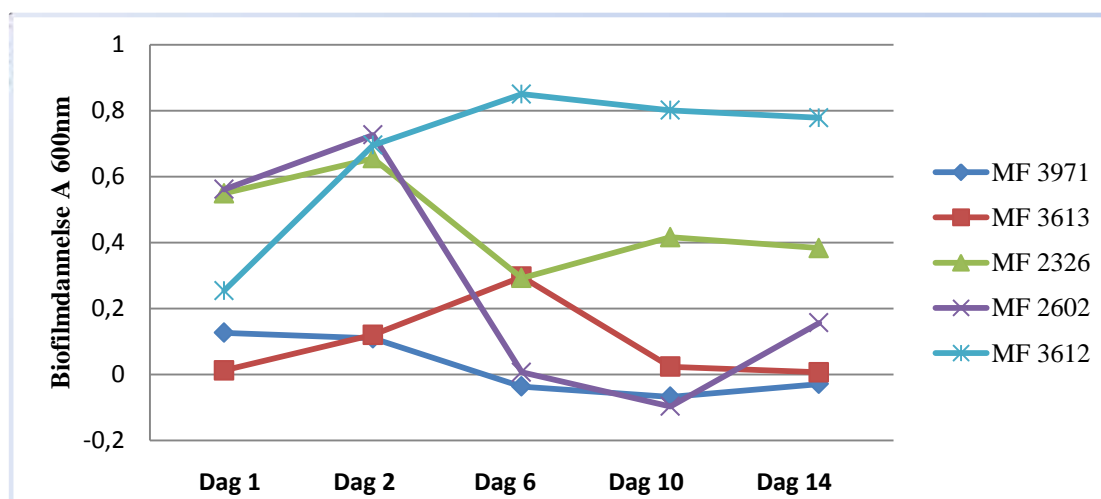
4.1.1 *Serratia* spp.

Figur 4.1 viser biofilmdannelse i glassrør hos fem forskjellige stammer innenfor slekten *Serratia*. Hos *Serratia* spp. man kan se tegn på at flere rør har spredt biofilmdannelse, og ikke like konsentrert dannelse av biofilm i væskeoverflaten. Biofilm hos *Serratia* spp. ble oppløst over tid. Derfor ble glassrør fra dag seks valgt med fordel for dag 14. Unntaket er MF 2602 som allerede etter en dag viser god biofilmdannelse, for deretter å relativt raskt oppløses.



Figur 4.1: Biofilmdannelse hos fem forskjellige stammer av *Serratia* spp. etter seks dagers dagers inkubering, utenom MF 2602 som er inkubert i en dag i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildene er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

Figur 4.2 viser biofilmdannelse over tid for de ulike stammene innenfor slekten *Serratia*. I dette forsøket viste *Serratia* spp. rask biofilmdannelse for så å avta.



Figur 4.2: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) for ulike stammer av *Serratia* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

4.1.2 *Pseudomonas* spp.

Figur 4.3 viser biofilmdannelsen i glassrør for åtte stammer innenfor slekten *Pseudomonas*. Flere stammer innenfor slekten viste seg som gode biofilmdannere. Man ser også at den tykkeste biofilmen dannes i grenseflaten mellom væske og luft. Dog har flere av artene produsert biofilm i store deler av røret. Kraftig pellickel ble observert etter to dager for MF 3601 *P. aeruginosa* for så å forsvinne. En pellickel er biofilm i grenseflaten mellom væske og luft (Liang, Gao et al. 2010).

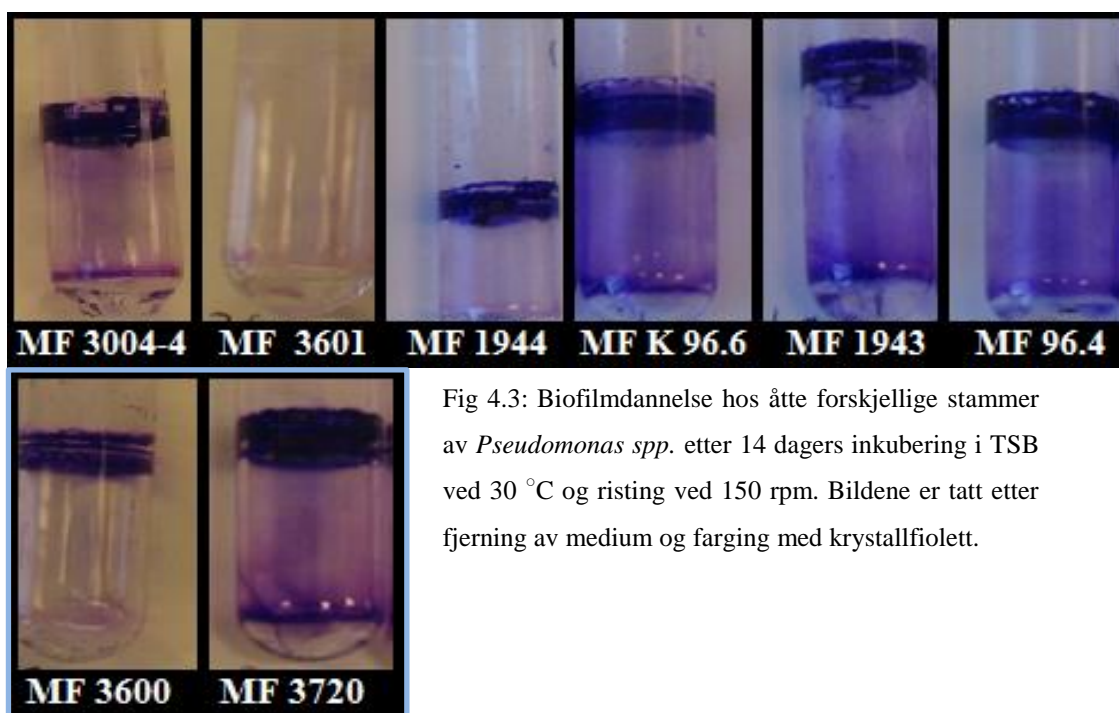
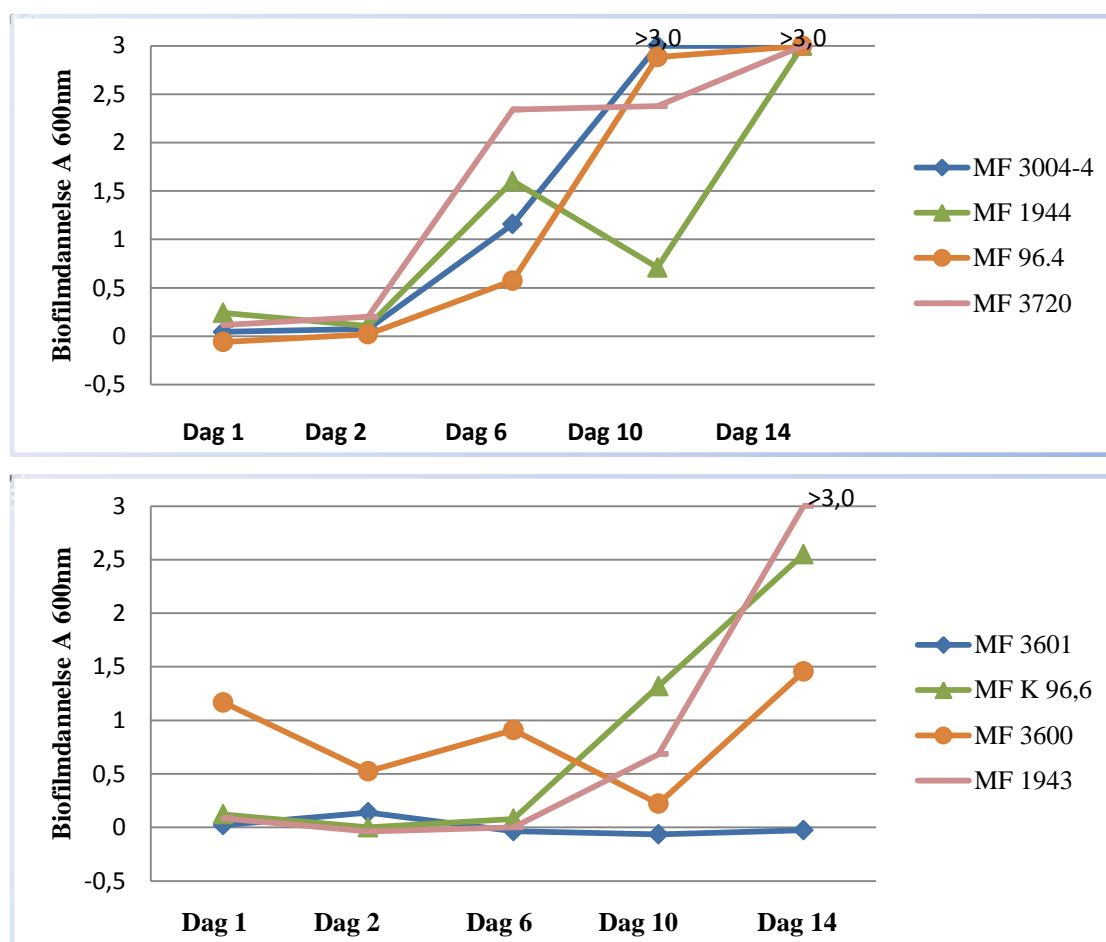


Fig 4.3: Biofilmdannelse hos åtte forskjellige stammer av *Pseudomonas* spp. etter 14 dagers inkubering i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildene er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

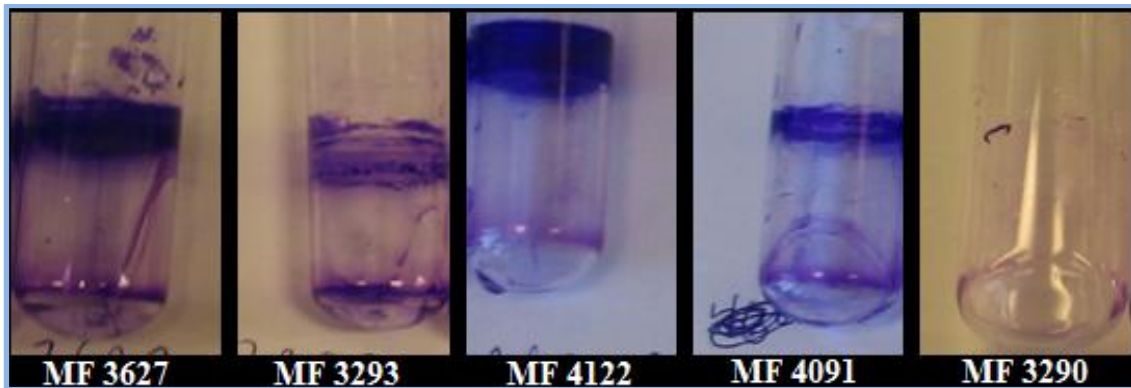
Figur 4.4 viser biofilmdannelse over tid. Man ser at flere av de åtte stammene innenfor slekten *Pseudomonas* viste gode egenskaper for biofilmdannelse. Da henholdsvis hos *P. fragi* MF 1943, *Pseudomonas* sp. MF 3000-4, *P. fluorescens* MF 1944, *P. fragi* MF 96.4 og *P. putida* MF 3720. Verdiene var i tillegg så høye på dag 14 for disse stammene at det ikke lenger var målbare på instrumentet som ble brukt (merket med >3.0). Alle stammene som tilhørte *Pseudomonas* spp. dannet mer biofilm over tid med unntak av MF 1944 som på dag 10 hadde en delvis oppløsning av biofilm. *P. aeruginosa* MF 3601 viste i dette forsøket dårlige egenskaper for biofilmdannels



Figur 4.4: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) for ulike stammer av *Pseudomonas* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

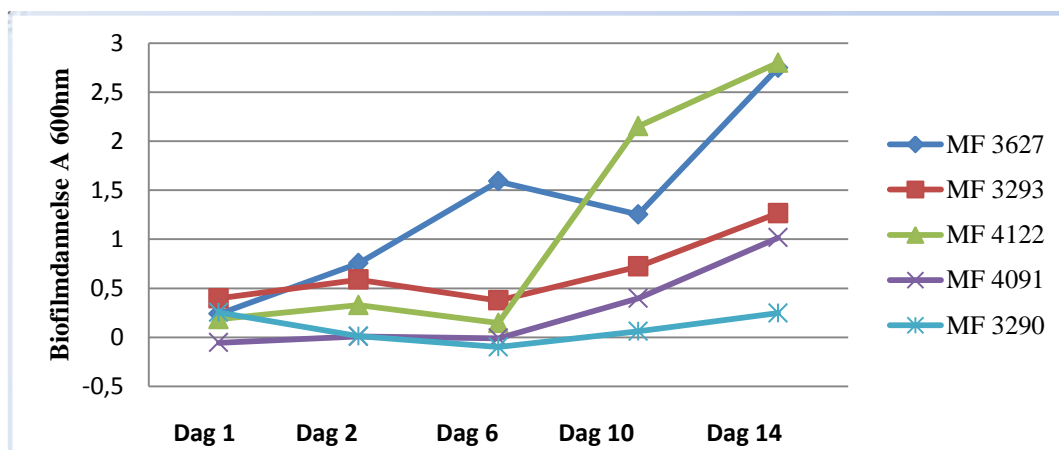
4.1.3 *Acinetobacter* spp.

Figur 4.5 viser biofilmdannelse i glassrør for fem stammer fra slekten *Acinetobacter*. *Acinetobacter* spp. viser i dette forsøket god biofilmdannelse i grenseflaten mellom luft og væske. Dette er gjennomgående hos alle stammer utenom *A. wloffii* MF 3290 (fig 4.6) som tydelig i dette forsøket ikke viser de samme egenskapene for biofilmdannelse. MF 3290 er isolert fra svaber fra klorfotbad i meieri. Det ble også i en større eller mindre grad observert en farget sirkel i bunn av røret. Det antas at dette i hovedsak skyldes avleiringer fra vekstmediet siden dette også ble observert i blank kontroll. Dette var også gjeldende for øvrige bakteriestammer. Ingen pellikkeldannelse ble registrert hos noen av stammene av *Acinetobacter* spp.



Figur 4.5: Biofilmdannelse hos fem forskjellige stammer av *Acinetobacter* spp. etter 14 dagers inkubering i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildene er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

Figur 4.6 viser biofilmdannelse over tid for de stammene som har blitt jobbet med innenfor slekten *Acinetobacter*. *Acinetobacter* spp. viser god biofilmdannelse over en periode på 14 dager. Unntaket er *A. wloffii* MF 3290 som i dette forsøket viste dårlige egenskaper for produksjon av biofilm. Alle stammene viste gradvis økning i biofilmdannelse over en periode på 14 dager.



Figur 4.6: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) for ulike stammer av *Acinetobacter* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

4.1.4 *Bacillus* spp.

Figur 4.7 viser biofilmdannelse i glassrør for seks stammer fra slekten *Bacillus*. For *Bacillus* spp. ble det observert en spredt biofilm i hele røret og ikke en like tydelig ring i grenseflaten mellom væske og luft som for andre slekter. Ut i fra forsøket kan man se resultater som tyder på at

Bacillus spp. er en dårligere biofilmdanner på glass enn *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., og *Psychrobacter* spp. etter 14 dager. Pellikkeldannelse under disse forholdene ble registrert hos *B. subtilis* MF 1987 etter seks dager. Det ble ikke registrert på dag 10, på dag 14 ble det observert en svak pellikkel. MF 4705, også det en *B. subtilis*. dannet en kraftig pellikkel etter seks dager. På dag 10 var den også tilstede, men etter 14 dager var den borte.

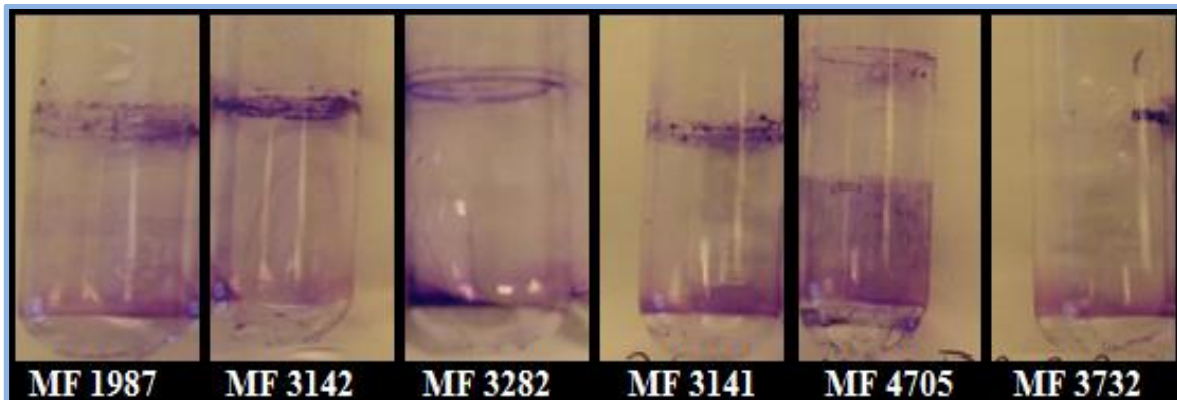
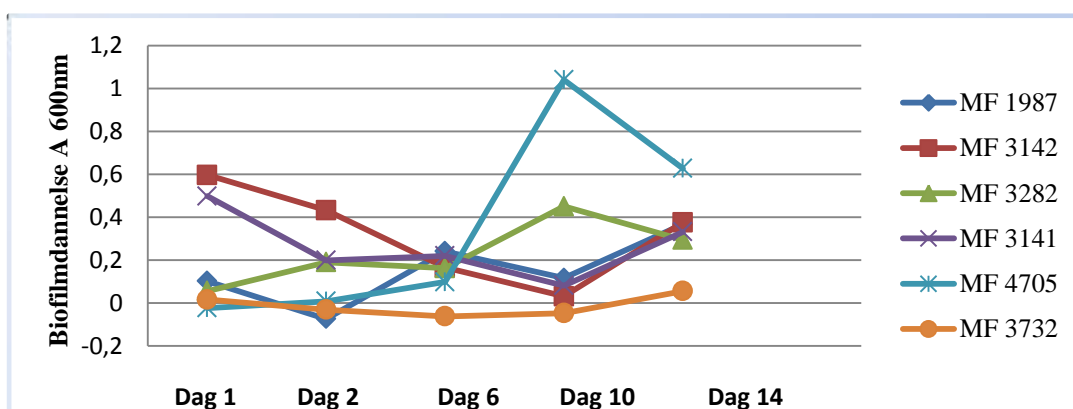


Fig 4.7: Biofilmdannelse hos seks forskjellige stammer av *Bacillus* spp. etter 14 dagers inkubering i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildene er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

Figur 4.8 viser biofilmdannelse hos *Bacillus* spp. over 14 dager. Slekten *Bacillus* viste relativt dårlig biofilmdannelse over en periode på 14 dager. Biofilmdannelsen holdt seg jevnt under 0,4 A 600nm for de fleste stammer. Figuren kan gi indikasjoner på at biofilmdannelsen ser ut til å ta seg opp etter 10 dager for fire av stammene mens det motsatte ser ut til å skje hos *B. subtilis* MF 4705 og *B. fuciformis* MF 3282.



Figur 4.8: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) for ulike stammer av *Bacillus* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

4.1.5 Psychrobacter spp.

I figur 4.9 viser biofilmdannelse i glassrør for fire stammer fra slekten *Psychrobacter*. *Psychrobacter* spp. dannet for noen stammer tykk biofilm i grenseflaten mellom væske og luft. To av artene dannet mer biofilm, der *P. glacinola* MF 4104 markerte seg som en god biofilmdanner. De resterende to viste dårlige egenskaper for biofilmdannelse under de gitte omstendighetene.

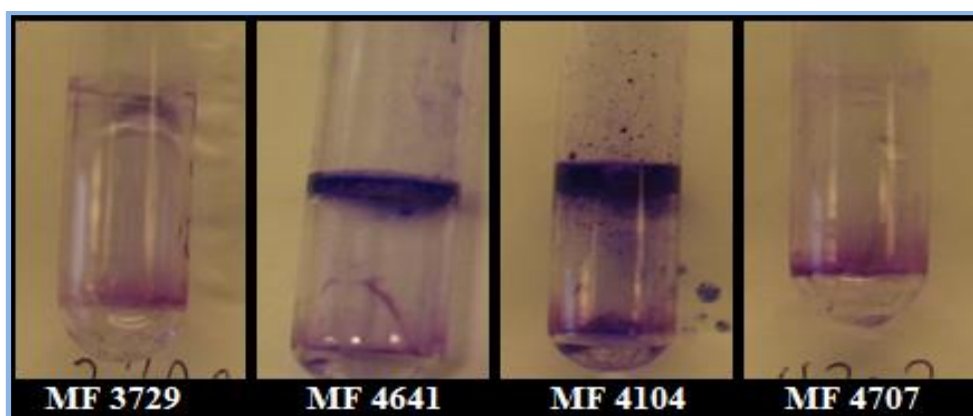
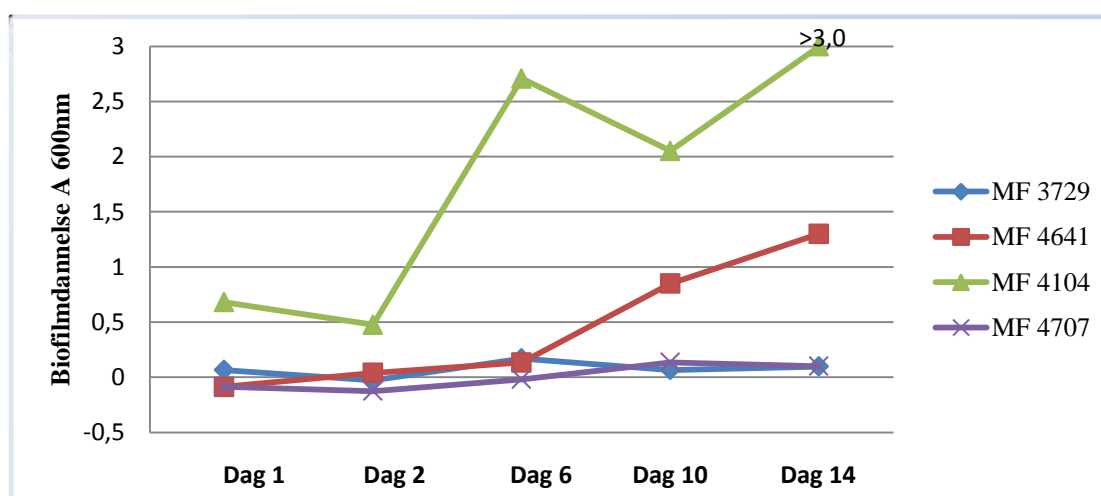


Fig 4.9: Biofilmdannelse hos fire forskjellige stammer av *Psychrobacter* spp. etter 14 dagers inkubering i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildene er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

Figur 4.10 viser biofilmdannelse over 14 dager for fire stammer innenfor slekten *Psychrobacter*. Ut i fra denne profilen ser man at *Psychrobacter* spp. bruker lang tid på å utvikle biofilm, hvis den i hele tatt danner. Unntaket var *P. glacinola* MF 4104 som etter seks dager hadde dannet en solid biofilm.



Figur 4.10: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) for ulike stammer av *Psychrobacter* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

4.1.6 *Rhodococcus* spp.

Figur 4.11 viser biofilmdannelse i glassrør for fire forskjellige stammer innenfor slekten *Rhodococcus*. Forsøket tyder på at *Rhodococcus* spp. ikke er særlig god biofilmdanner. Alle stammer danner en svak sirkel i grenseflaten mellom væske og luft. I tillegg til noe lenger nede i røret som også kan skyldes avleiringer fra vekstmediumet. Pellikkel ble observert hos *R. erythropolis* MF 4633 etter 14 dager.

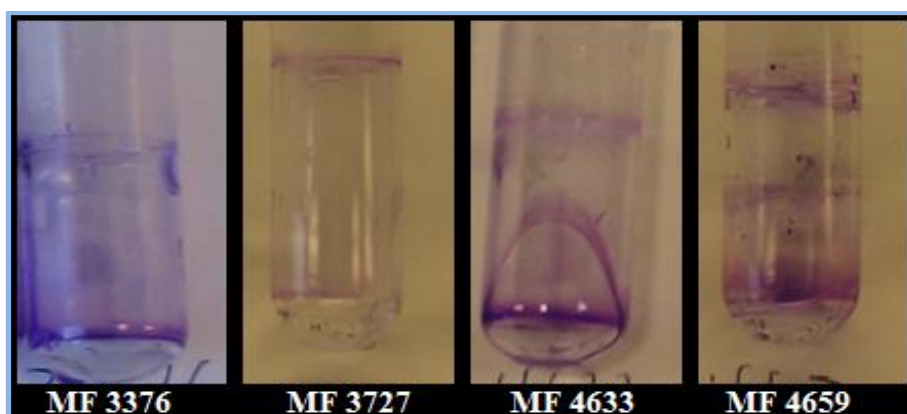
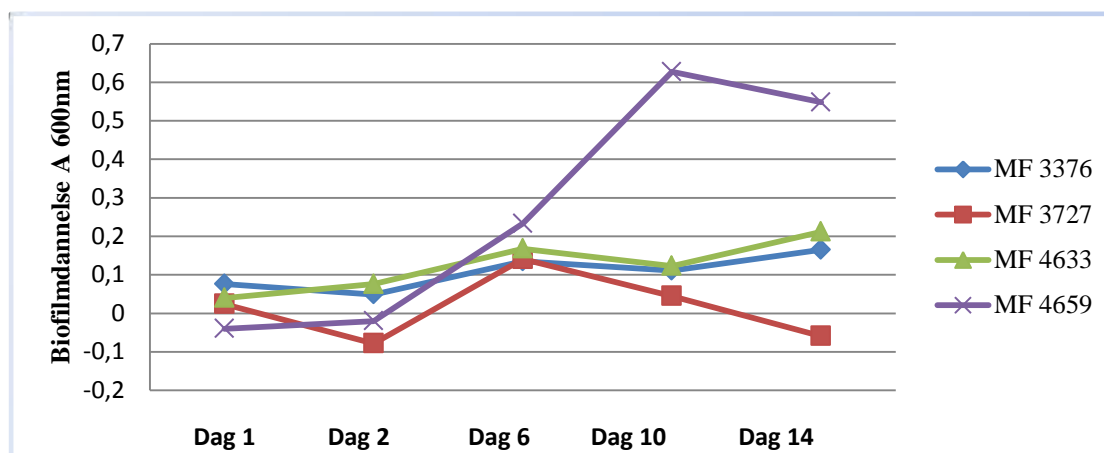


Fig 4.11: Biofilmdannelse hos fire forskjellige stammer av *Rhodococcus* spp. etter 14 dagers inkubering i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildene er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

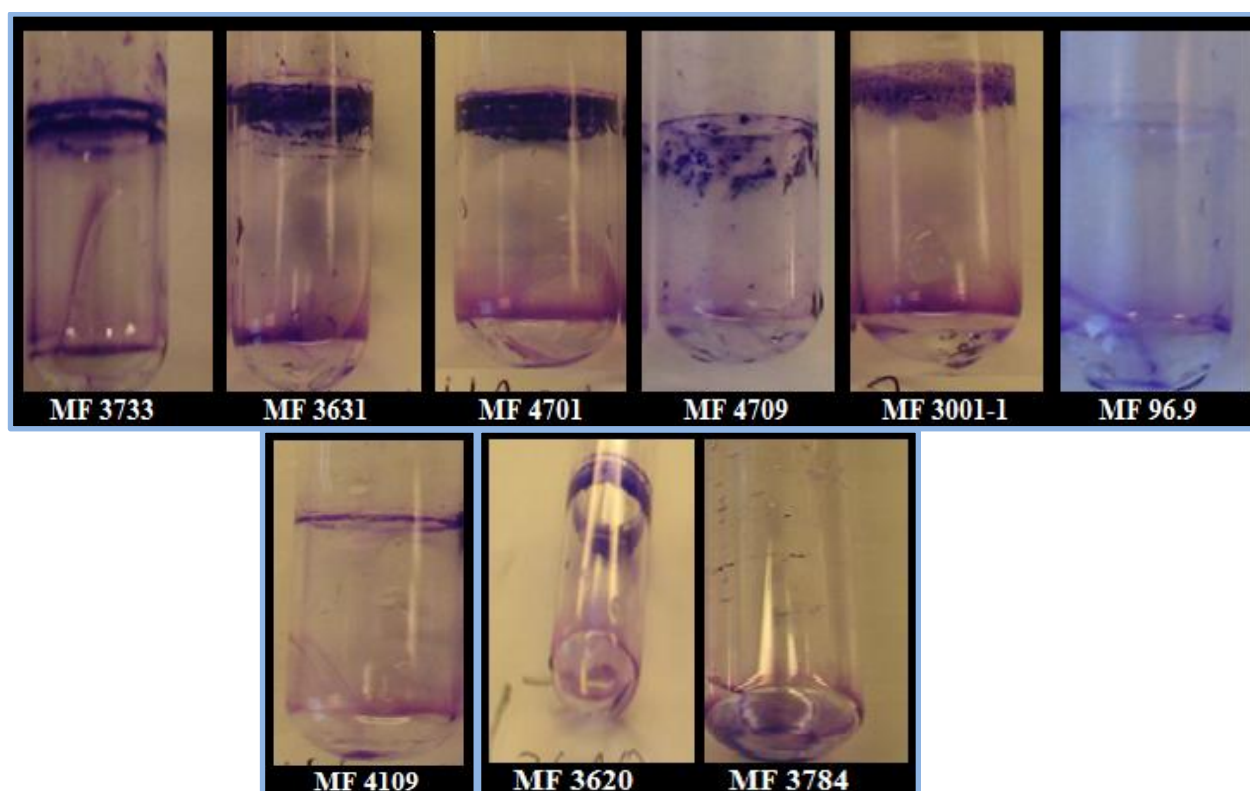
Figur 4.12 viser biofilmdannelse over tid. Man ser at de fire ulike stammene innenfor slekten *Rhodococcus* danner ingen eller lite biofilm i forsøket. Unntaket er *R. fascians* MF 4659 som etter seks dager og utover danner en relativt synlig biofilm i glassrør.



Figur 4.12: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) for ulike stammer av *Rhodococcus* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

4.1.7 *Kocuria* spp i tillegg til ulike slekter med bare en stamme

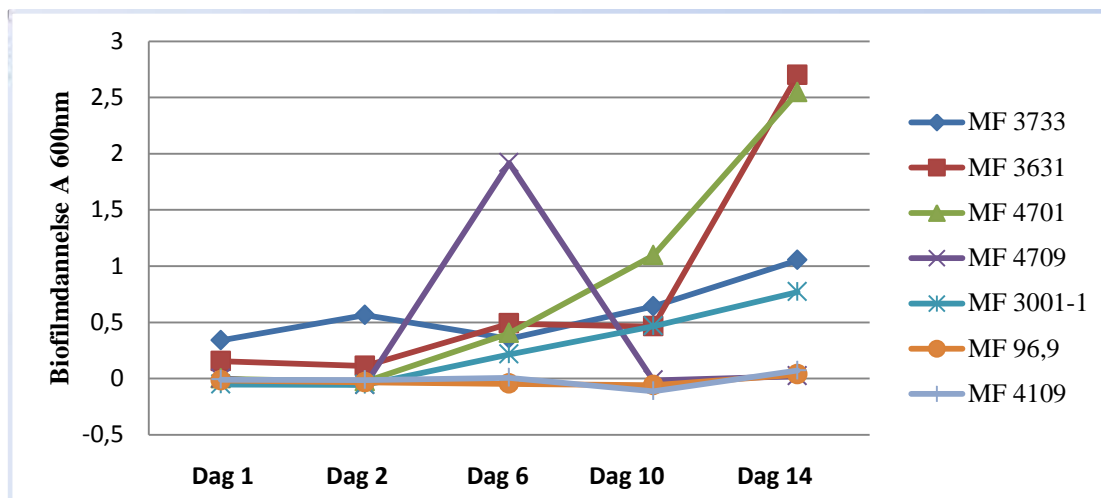
Figur 4.13 viser biofilmdannelse i glassrør for ni forskjellige stammer som kan være vanlige i matindustrien. Alle stammer utenom *Brochotrix thermospacta* MF 96.9, *Kocuria* sp MF 3784. og *Carnobacterium maltaromaticum* MF 4109 lager en solid biofilm i grenseflaten mellom væske og luft. En kraftig pellickel ble observert hos *Kocuria rhizophila* MF 3620, *Kocuria* sp. MF 3784 og *Citrobacter freundii* MF 3631. Da henholdsvis etter 14 dager for MF 3620, etter seks dager for så å forsvinne for MF 3784 og etter 10 dager for så å forsvinne for MF 3631.



Figur 4.13: Biofilmdannelse hos ni forskjellige stammer med ulik slekt for utenom *Kocuria* som har to stammer. Følgende er MF 3733 *Esherichia coli*, MF 3631 *Citrobacter freundii*, MF 4701 *Corynebacterium simulans*, MF 4709 *Curtobacterium flacuumfaciens*, MF 3001-1 *Pantoea agglomerans*, MF 96.9 *Brochotrix thermospacta*, MF 4109 *Carnobacterium maltaromaticum*, MF 3620 *Kocuria rhizophila* og MF 3784 *Kocuria* sp. Disse ble inkubert i 14 dager i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm. Bildet er tatt etter fjerning av medium og farging med krystallfiolett.

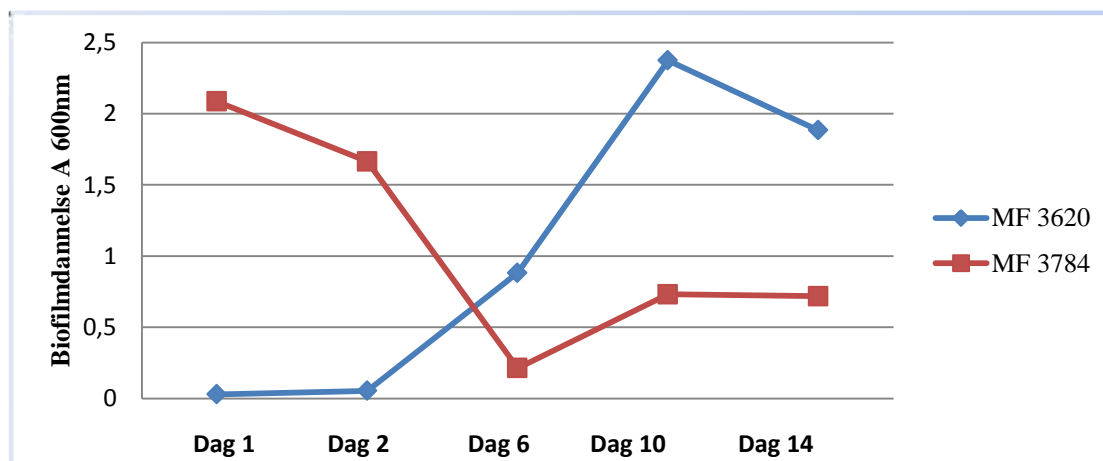
I figur 4.15 ser man biofilmdannelsen over en tidsperiode over 14 dager for flere bakteriestammer som kan være vanlige i matindustrien. Man ser her at *Citrobacter freundii* MF 3631 og *Corynebacterium simulans* MF 4701 skiller seg ut med en kraftigere biofilmdannelse

enn de øvrige. *Brochotrix Thermospacta* MF 96.9 og *Carnobacterium maltaromaticum* MF 4109 dannet i dette forsøket lite biofilm.



Figur 4.14: Biofilmdannelse over tid (A 600nm) hos syv Disse ble inkubert i 14 dager i TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

I figur 4.15 ser man biofilmdannelse for de ulike stammene innenfor *Kocuria* spp. De to stammene viser ulik grad av biofilmdannelse. For *Kocuria* MF 3784, ser man at en nedgang i biofilm frem til dag seks. Mens MF 3620 har en økning i biofilm frem til dag 10.



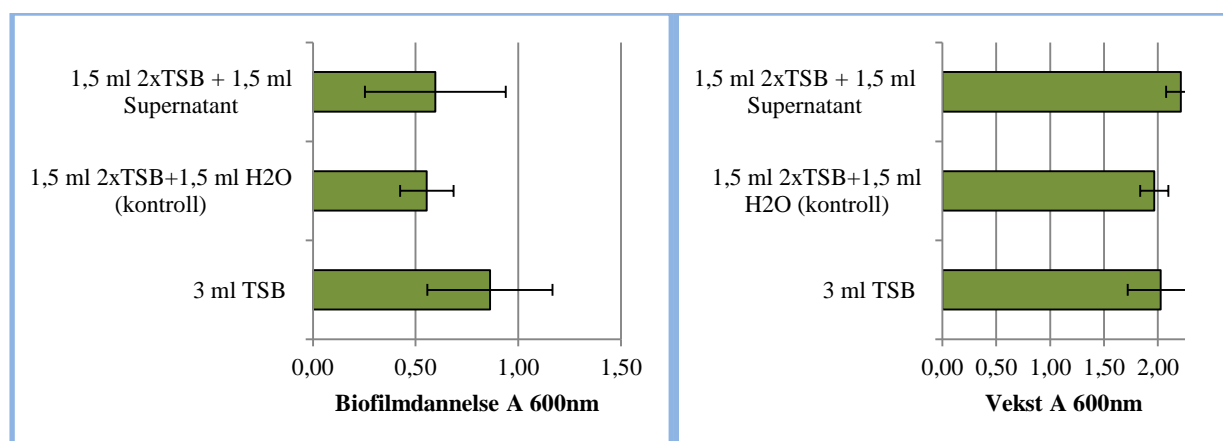
Figur 4.15: Biofilmdannelse (A 600nm) for ulike stammer av *Kocuria* dyrket i glassrør med TSB ved 30 °C og risting ved 150 rpm.

4.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse

Basert på forsøk fra rørm metode ble det plukket ut fire stammer som viste en nedgang i biofilmdannelse, se tabell 3.4 og figur 4.2 og 4.8. Her testet man om supernatant tilsatt vekstmedium inokulert med bakterie hemmet biofilmdannelse. Ingen av de testede stammene ble hemmet signifikant. Man har her valgt å presentere resultatene man fikk med *Serratia marcescens* MF 2602. Denne stammen ble testet ved flere ulike variabler disse var.

- Ulik konsentrasjon på vekstmedium
- Med eller uten filtrering av supernatant
- Ulik lagringstid av supernatant

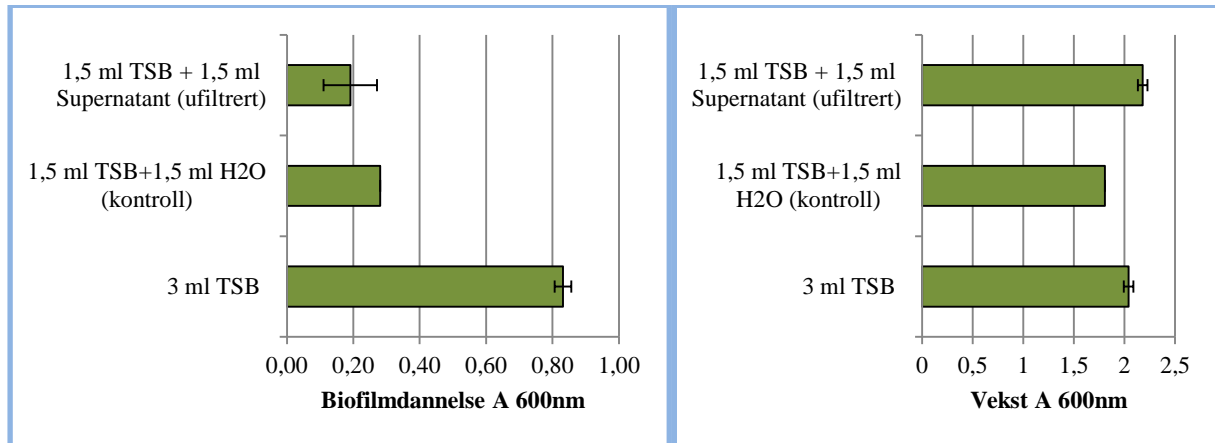
Figur 4.16 viser biofilmdannelse og vekst hos *S. marcescens* MF 2602 ved bruk av ulike konsentrasjoner av vekstmedium og tilsats av filtrert supernatant dyrket i seks dager. Tilsats av supernatant så ut til å ha liten effekt. Man ser her at biofilmdannelsen er størst i vanlig TSB, mens den er relativt lik ved bruk av TSB som er blandet ut i en konsentrasjon som er 2 x sterkere enn hva som er anbefalt fra leverandør. Vekst holdt seg uniform og så ikke ut til å bli påvirket av supernatanten i særlig grad. Alle inokulerte rør ble dyrket i en dag.



Figur 4.16: Vekst og biofilmdannelse i glassrør etter en dag for *S. marcescens* MF 2602, ved bruk av ulike konsentrasjoner på vekstmedium og tilsats av seks dager gammel supernatant fra samme bakterie. Forsøket er basert på tre gjentak, men med data for to gjentak på vekst.

Figur 4.17 viser biofilmdannelse og vekst hos *S. marcescens* MF 2602 ved bruk av ulikt vekstmedium og tilsats av supernatant dyrket i tre dager. Biofilmdannelsen var størst i vanlig

TSB. Man ser en større effekt ved tilsats av ufiltrert supernatant. Vekst holdt seg relativt uniform.



Figur 4.17: Vekst og biofilmdannelse i glassrør etter en dag for *S. marcescens* MF 2602, ved bruk av ulike konsentrasjoner på vekstmedium og tilsats av tre dager gammel ufiltrert supernatant fra samme bakterie. Forsøket er basert på to gjentak med unntak av kontroll (TSB+H₂O) som bare har data for ett forsøk.

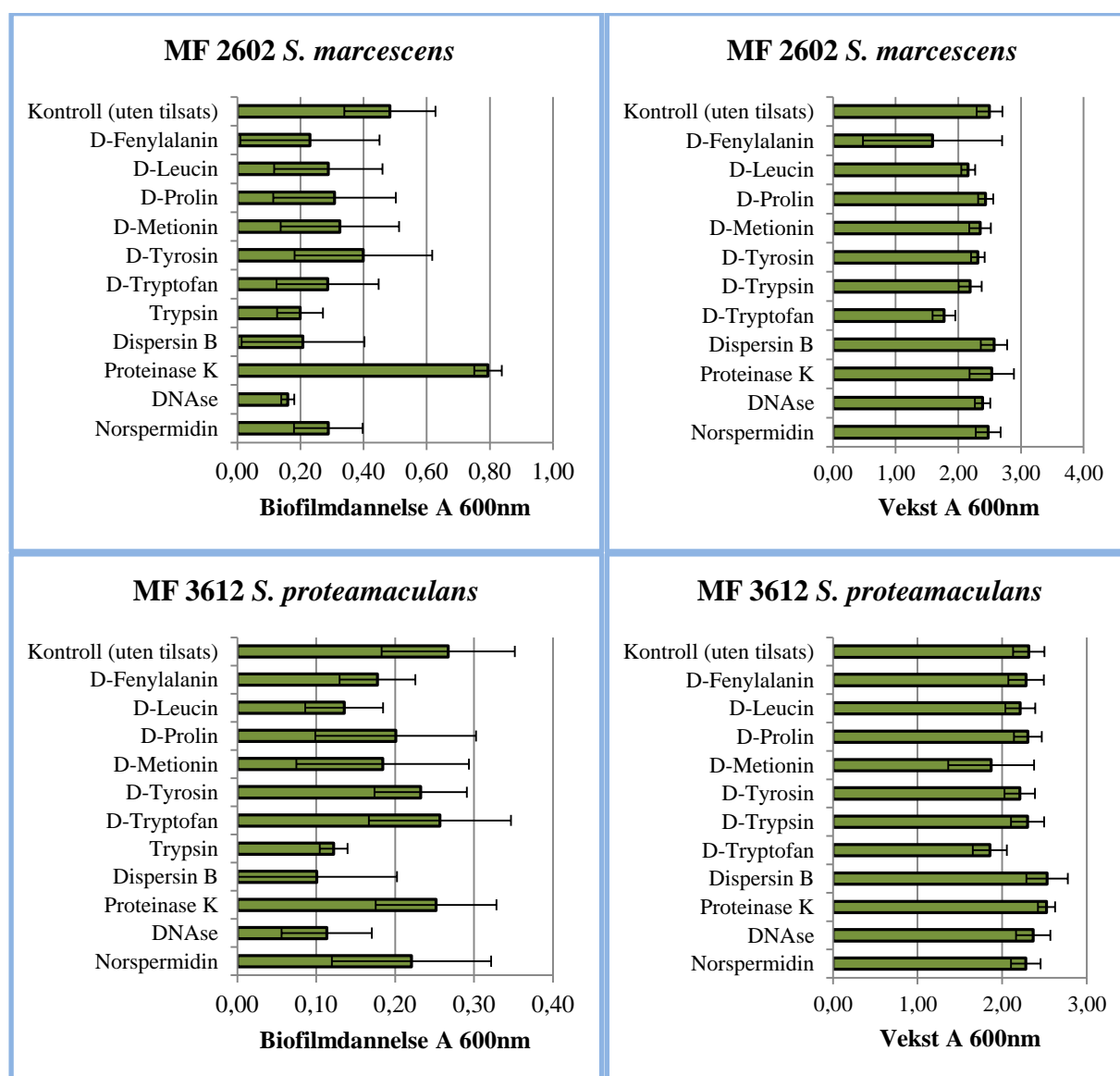
4.3 Effekt av ulike stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

I dette forsøket ble det undersøkt om ulike stoffer ville ha en effekt på biofilmdannelse i mikrotiterbrett. Bakteriestammer gitt i tabell 3.3 ble brukt, målet var å se på effekter man fikk på biofilmdannelse med tilsats av ulike enzymer, D-aminosyrer i tillegg til polyaminet norspermidin. Disse ble blandet ut i en bakterieløsning sammen med vekstmedium i konsentrasjoner oppgitt i tabell 3.5. For diagrammer over bakteriestammer ikke inkludert i resultat, se vedlegg 1.

4.3.1 *Serratia* spp.

Det ble funnet flere signifikante effekter blant stoffer på hemming av biofilmdannelse hos *Serratia* spp. I figur 4.18 ser man et diagram over biofilmdannelse og vekst hos *S. marcescens* MF 2602 og *S. proteamaculans* MF 3612. Figuren viser resultater som tyder på at D-aminosyrer kan ha en effekt både hos MF 2602 og MF 3612 uten at vekst blir hemmet i en stor grad. Man kunne se antydninger til at fenylalanin og tryptofan kan hemme vekst hos MF 2602, mens tryptofan og methionin kan hemme noe hos MF 3612. Så man på de øvrige tre *Serratia*-stammene så man også der en effekt på biofilmdannelse. Flere av disse hadde også en signifikant hemming på biofilm hos slekten *Serratia*. Leucin ($p = 0,013$), Fenylalanin ($0,017$), Prolin ($p = 0,026$). Enzymet dispersin B så ut til å ha en effekt på hemming av biofilm hos alle stammer

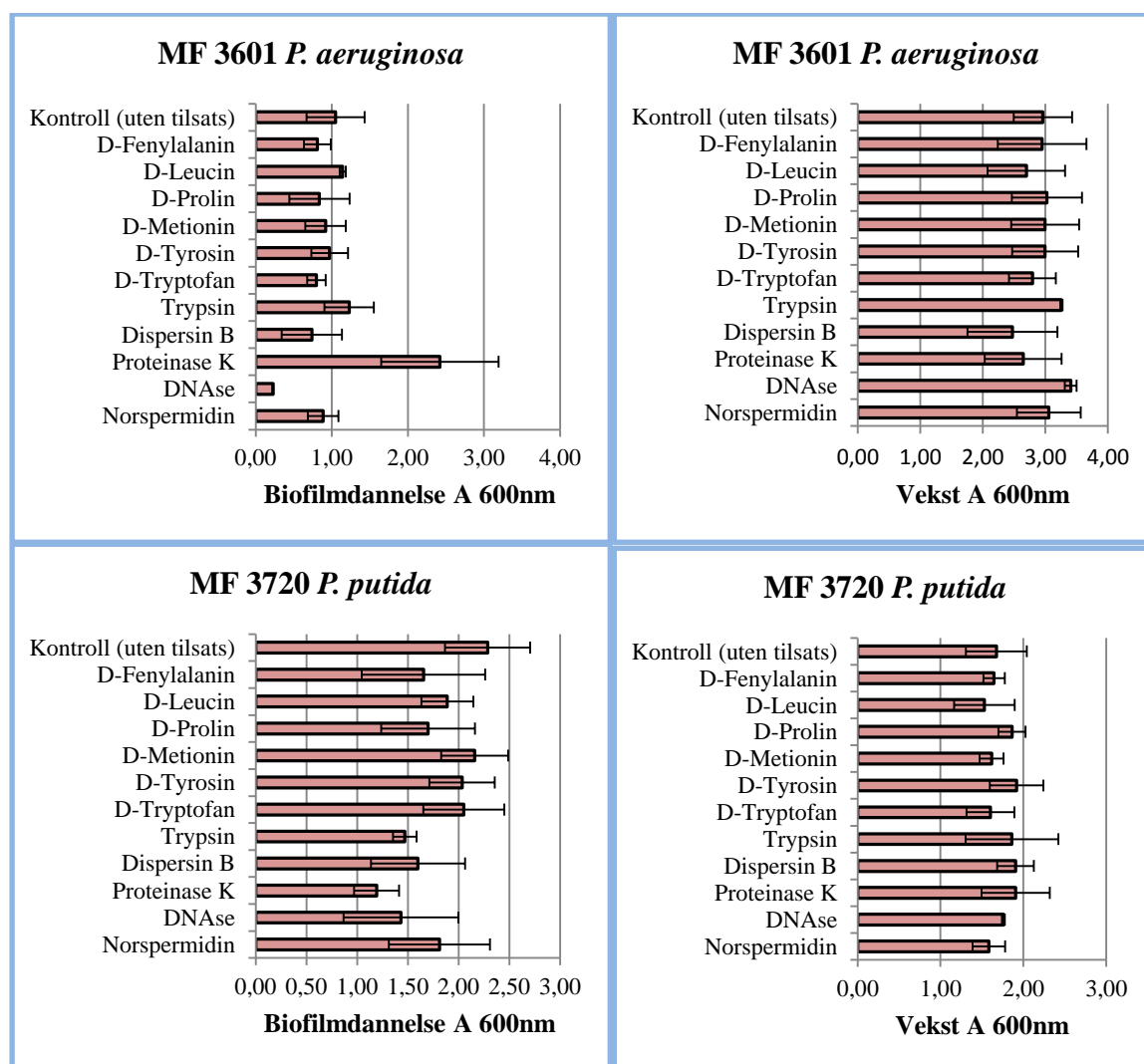
innenfor *Serratia* spp. og denne var signifikant ($p = 0,004$). DNase så ut til å ha en tydelig effekt hos flere men ikke alle *Serratia* spp. og var ikke signifikant. Proteinase K så ut til å kunne fremme vekst hos MF 2602 og være inaktivt hos MF 3612. Man så også en tendens til økning i biofilm hos andre *Serratia* spp. med tilsats av proteinase K.



Figur 4.18: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 2602 og MF 3612 ved tilsats av ulike enzymer og D-aminosyrer. Data i figur er i hovedsak 4.3 gjennomsnitt og standardavvik av tre gjentak sett bort fra kontroll som er fire og trypsin og DNase I fj som er to.

I fj som er to. 11 og *P. putida* MF 3720. Figuren viser at DNase hadde en effekt hos både MF 3720 og MF 3601 dette

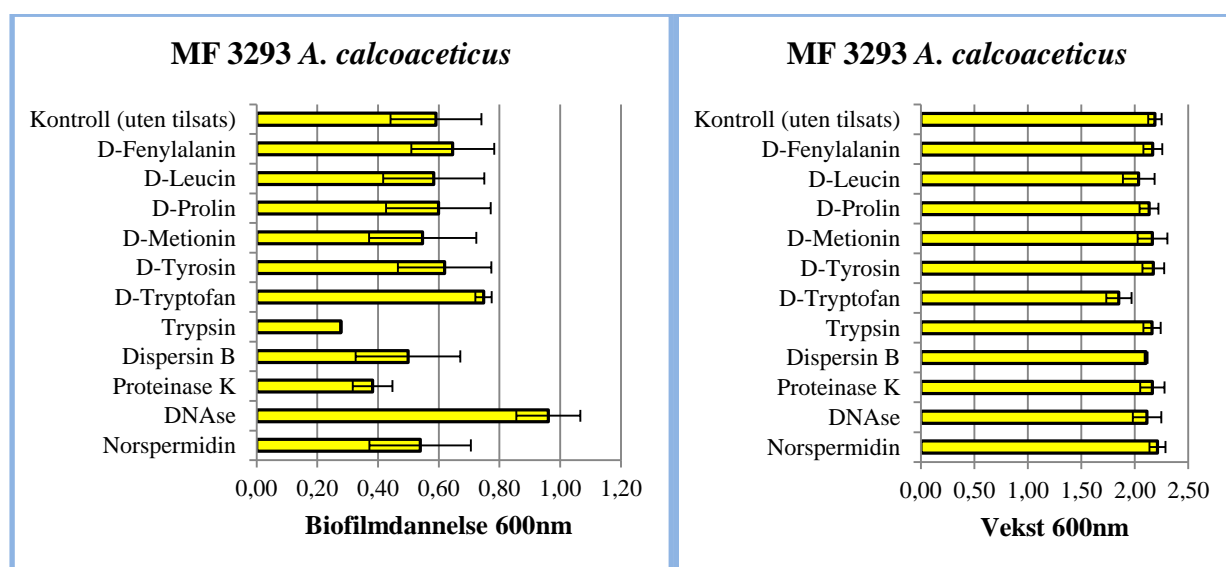
var tilfelle også hos de andre stammer innenfor *Pseudomonas* spp. og denne effekten ble testet statistisk hvor man fant at den hadde en signifikant hemming på biofilmdannelse ($P = 0,031$). Man så også at Dispersin B hindret biofilmdannelse signifikant uten å påvirke vekst i noe særlig grad, dette var også tilfelle hos andre stammene som var med i forsøket ($p = 0,008$). Man så antydninger til at D-aminosyrer kunne virke noe hemmende på biofilmdannelsen hos MF 3720. Det var også tilfellet hos andre stammer av *Pseudomonas* tatt med i dette forsøket, men virkningene var ofte sporadiske og ikke altfor overbevisende. Proteinase K så ut til å vise antydninger til å fremme biofilmdannelse hos MF 3601 dette var også tilfelle hos andre *Pseudomonas* spp. men dog ikke hos MF 3720. Veksten så ut til å påvirkes i liten eller ingen grad av ulike tilsetninger, dette var også tilfelle hos andre *Pseudomonas* spp.



Figur 4.19: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 3601 og MF 3720 ved tilsats av ulike enzymer og D-aminosyrer. Data i figur er i hovedsak gjennomsnitt og standardavvik av tre gjentak sett bort fra kontroll som er fire og trypsin og DNase som er to.

4.3.1 *Acinetobacter* spp.

I figur 4.20 viser et diagram over biofilmdannelse og vekst hos *A. calcoaceticus* MF 3293 i mikrotiterbrett. Man så en større effekt av trypsin hos MF 3293 enn de øvrige virkestoffene. Dette var til dels tilfelle dog ikke i like stor grad hos andre *Acinetobacter* spp. Proteinase K hadde en effekt og sammenligner man alle stammene hadde denne størst effekt på biofilmdannelse, dog ikke signifikant. MF 3293 hemmes i liten eller ingen grad av D-aminosyrer. Dette var også tilfelle hos de andre stammene innenfor *Acinetobacter* spp. i en noe større eller mindre grad. Veksten så ikke ut til å hemmes i noen særlig grad av noen av virkestoffene, og biofilmdannelse i kontroll lå på rundt 0,6 A 600nm dette var tilfellet også hos andre stammer innefor *Acinetobacter* spp. med unntak av MF 3290.

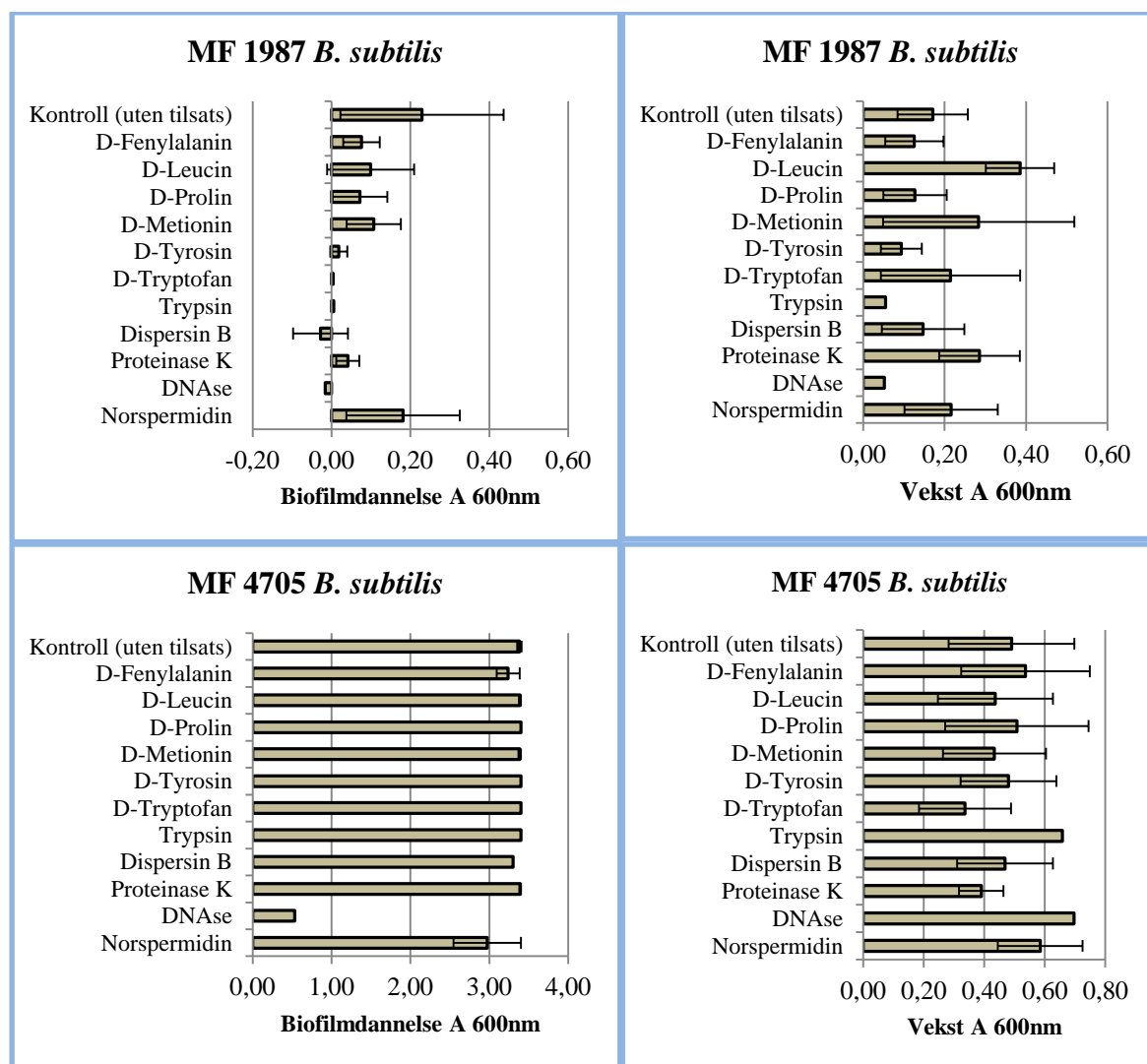


Figur 4.20: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 3290 ved tilsats av ulike enzymer og D-aminosyrer. Data i figur er i hovedsak gjennomsnitt og standardavvik av tre gjentak sett bort fra kontroll som er fire og trypsin og DNase som er to.

4.3.4 *Bacillus* spp.

I figur 4.21 ser man et diagram over biofilmdannelse og vekst hos *B. subtilis* MF 1987 og *B. subtilis* MF 4705. Man ser antydninger til at biofilmdannelsen hos MF 1987 blir hemmet av D-aminosyrer. Dette er ikke tilfellet hos MF 4705 som også er en *B. subtilis* forskjellen på disse to er at de er ulike stammer MF 1987 er en ATCC-stamme mens MF 4705 ble isolert fra en fiskefôrfabrikk. Proteinase K så ut til å virke hemmende hos MF 1987 dette var ikke tilfellet med de andre stammene innenfor *Bacillus* slekten. Hvis en sammenligner biofilmdannelse hos MF 1987 og MF 4705. Ser man en stor forskjell mellom de to, hvor MF 1987 fremviser heller dårlige

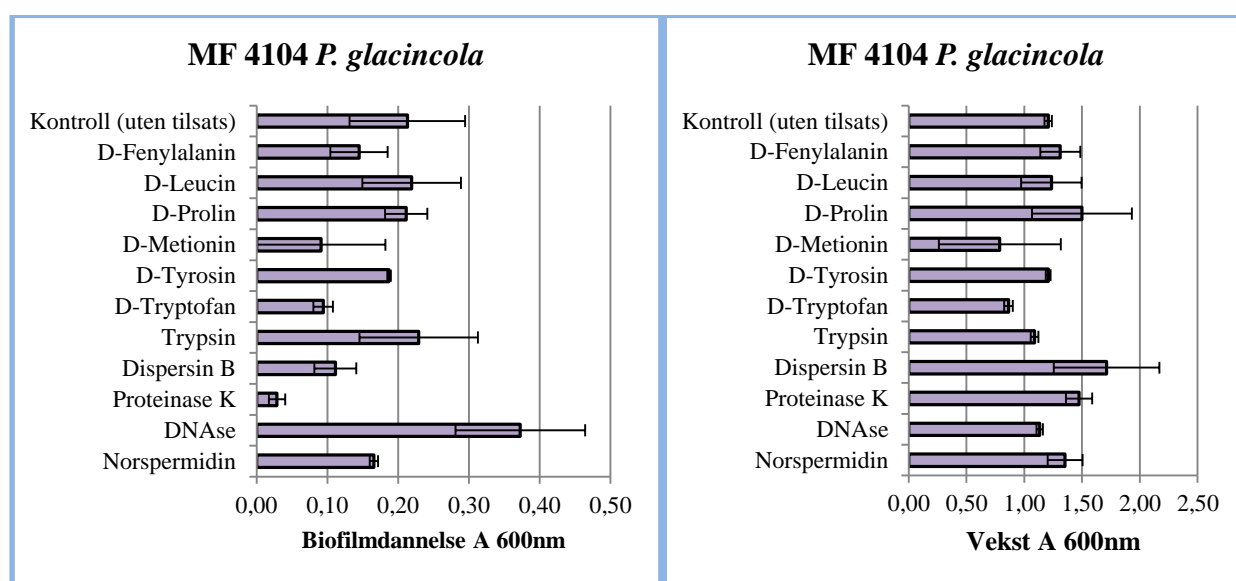
egenskaper for biofilmdannelse over to dager ved testede vilkår. Mens MF 4705 kunne vise til gode. Man ser også en forskjell i vekst hos de to, denne er dog ikke like fremtredende. MF 4705 viste god biofilmdannelse og lot seg ikke hemme av noen av virkestoffene sett bort fra DNase og i en mindre grad muligens norspermidin.



Figur 4.21: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 1987 ved tilsats av ulike enzymer og D-aminosyrer. Data i figur er i hovedsak gjennomsnitt og standardavvik av to gjentak sett bort fra kontroll som er tre og trypsin og DNase som ble utført en gang.

4.3.5 *Psychrobacter* spp.

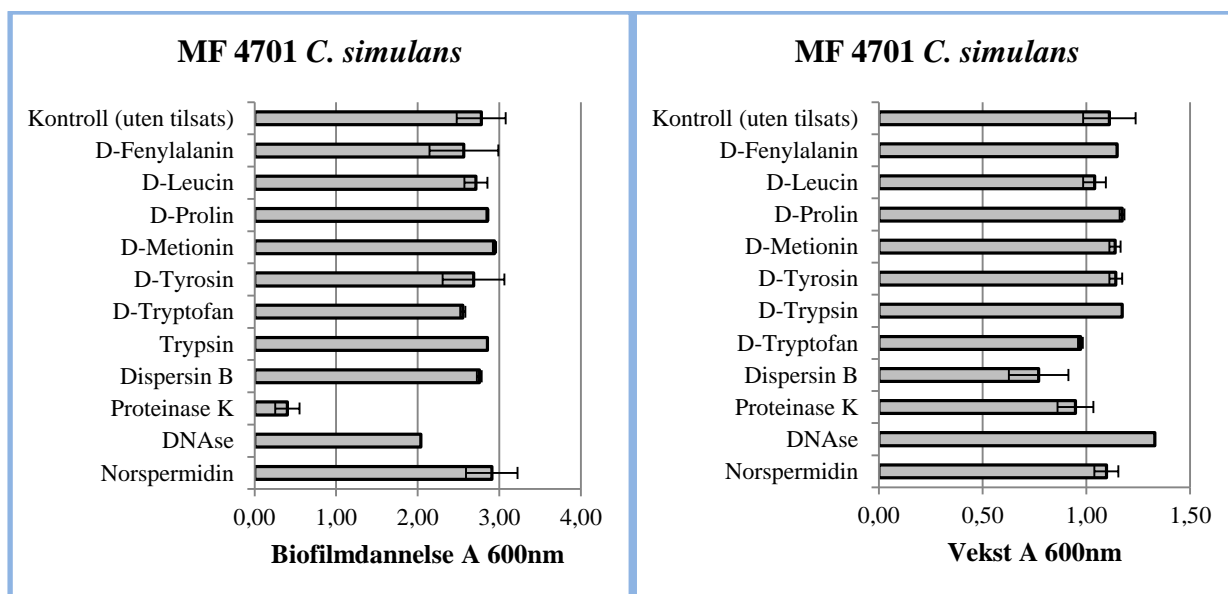
I figur 4.22 ser man et diagram over biofilmdannelse og vekst hos *P. glacincola* MF 4104. De ble funnet at enzymet proteinase K så ut til å hindre biofilmdannelse hos MF 4104 signifikant ($p = 0,031$). Figuren gir en indikasjon på at D-aminosyrer kan ha en effekt hos MF 4104. D-tryptofan og D-methionin ga også indikasjon på å kunne bremse vekst. Ellers ble de lite hensiktsmessig å sammenligne resultatene fra MF 4104 med de tre andre stammene da disse dannet lite eller ingen biofilm over to dager i dette forsøket.



Figur 4.22: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 4104 ved tilsats av ulike enzymer og D-aminosyrer. Data i figur er i hovedsak gjennomsnitt og standardavvik av tre gjentak sett bort fra kontroll som er fire og trypsin og DNase som er to.

4.3.6 Andre bakterieslekter v/ *Corynebacterium simulans*

I figur 4.23 ser man et diagram over biofilmdannelse og vekst hos MF 4701 *C. simulans*. Figuren viser at MF 4701 er en effektiv biofilmdanner. Proteinase K var det eneste virkestoffet hvor man så en effekt på hemming av biofilm hos MF 4701. Man så liten eller ingen effekt av D-aminosyrer på biofilmdannelsen.

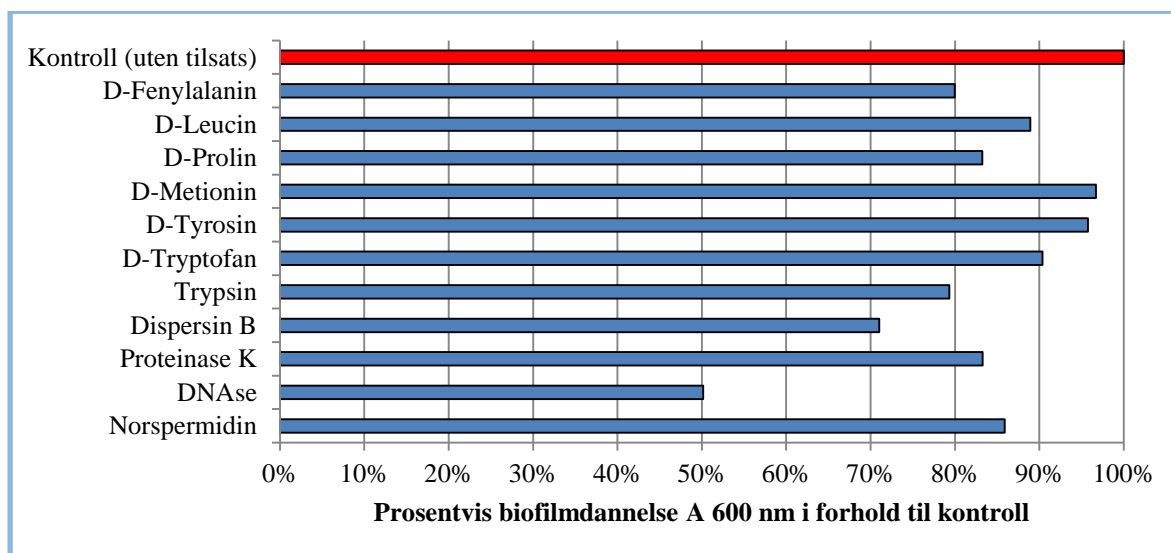


Figur 4.23: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 4701 ved tilsats av ulike enzymer og D-aminosyrer. Data i figur er i hovedsak gjennomsnitt og standardavvik av to gjentak sett bort fra kontroll som er tre og trypsin og DNase som ble utført en gang.

4.3.7 Oppsummering av resultater for effekter av ulike stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

De ulike forbindelsene hadde en varierende effekt på biofilmdannelse. Samlet sett kan man se antydninger til at enzymet DNase hadde størst effekt på hemming av biofilmdannelse hos de 31 bakteriestammene tilknyttet dette forsøket, se figur 4.24. Denne effekten ble også funnet å være signifikant ($p = 0,049$). For slekten *Pseudomonas* ble det observert signifikante effekter på hemming av biofilmdannelse ved tilsats av DNase ($p = 0,031$) og dispersin B ($p = 0,008$). *Serratia* var den slekten hvor man så best effekt på tilsats av D-aminosyrer hvor Leucin ($p = 0,013$), D-fenylalanin ($p = 0,017$) og D-prolin ($p = 0,026$) alle var signifikante. Dispersin B hadde også en signifikant effekt på hemming av biofilm hos *Serratia* spp ($p = 0,004$). Hos

Psychrobacter glacincola ble det observert en signifikant effekt på biofilmdannelse ved tilsats av proteinase K ($p = 0,031$).

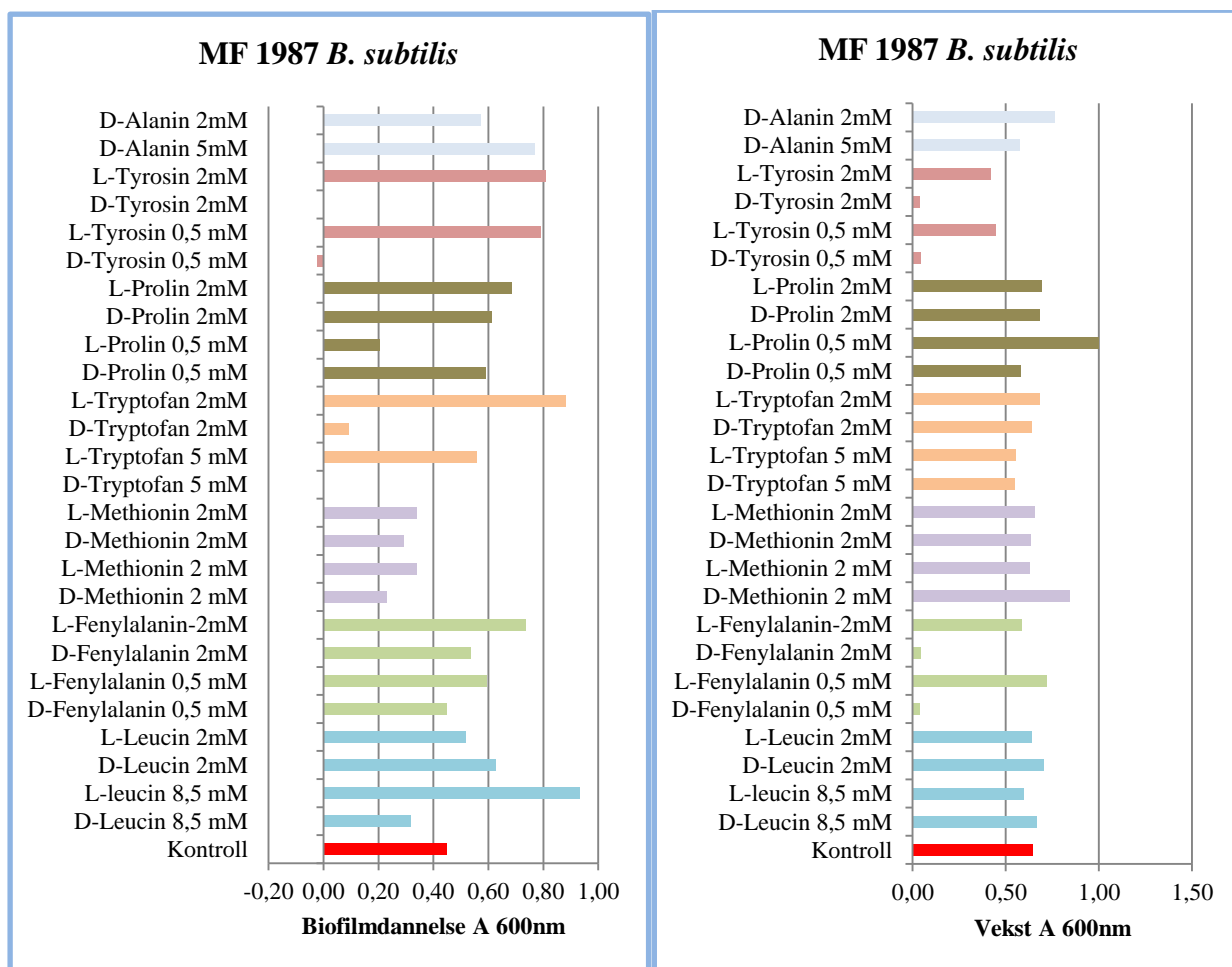


Figur 4.24: Prosentvis total biofilmdannelse i forhold til kontroll i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for ulike stoffer. Data i figur er basert på flere gjentak for hver bakterie (totalt 31) som man så har tatt gjennomsnittet av og lagt sammen til en samlet dataverdi for vært enkelt stoff.

4.4 Effekt på bruk av ulike konsentrasjoner av D- og L-aminosyrer på biofilm i mikrotiterbrett

Utvalgte bakteriestammer hvor man så en effekt på tilsats av D-aminosyrer ble testet med ulike konsentrasjoner av D- og L-aminosyrer. For de fleste bakteriestammene testet var det små eller ingen effekter på hemming av biofilm. Untaket var *Bacillus subtilis* MF 1987 som her blir presentert.

I Figur 4.25 ser man et diagram over biofilmdannelse og vekst hos *B. subtilis* MF 1987. Figuren gir gode indikasjoner på at MF 1987 blir hemmet av D-aminosyrer, der D-tyrosin så ut til å være den mest effektive. Imidlertid viser resultatet at den også har hemmet vekst i dette forsøket. Det samme gjelder for D-fenylalanin, men hvor man ikke har fått like overbevisende resultat på hemming av biofilm. Resultatene viser også at det ser ut til å være en sammenheng mellom konsentrasjon av D-aminosyrer og grad av hemming på biofilmdannelse. Tilsats av L-aminosyrer så i mange tilfeller ut til å fremme biofilmdannelse i forhold til kontroll.



Figur 4.25: Vekst og biofilmdannelse i mikrotiterbrett med TSB ved 30 °C etter to dager for MF 1987 ved tilsats av ulike konsentrasjoner av D- og L-aminosyrer. Data i figur er basert på ett forsøk.

5.0 Diskusjon

Hensikten med dette arbeidet var å kartlegge biofilmdannelse hos ulike slekter av bakterier som ofte forekommer i næringsmiddelindustrien. Samtidig ønsket man å finne ut om ulike kjemiske komponenter kunne oppløse biofilm og om bakterier fra matindustrien også kunne produsere slike tilsvarende forbindelser.

I et innledende forøk (resultat ikke vist) ble biofilmdannelse undersøkt ved bruk av ulikt innhold av NaCl og glukose i tryptone soya broth (TSB), se tabell 3.1. Basert på resultater fra dette forsøket ble generell TSB uten tilsetning valgt. Bakgrunnen for dette valget var marginale forskjeller i biofilmdannelse for TSB kontra TSB tilsatt ekstra glukose og NaCl.

5.1.1 *Serratia* spp.

5.1.1a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Serratia spp. dannet mest biofilm av slektene i dette forsøket etter to dager men. Etter 14 dager var resultatet motsatt og man så en reduisering av biofilm samtidig som man fikk en økning hos andre slekter. Se tabell 4.1 og tabell 4.2. *Serratia* spp. er fakultativt aerob, dette kan man se tegn på da biofilmdannelsen er spredt, men samtidig vil man ha den karakteristiske biofilmringen i grenseflaten mellom væske og luft. Det har tidligere blitt vist at oppløsning av biofilm blant annet avhenger av quorum-sensing og tilgang på næringsstoffer (Miller and Bassler 2001; Smith, Fratamico et al. 2004; Rice, Koh et al. 2005; Van Houdt, Givskov et al. 2007). I en studie utført på *S. marcescens* ble det funnet at biofilm hos denne stammen startet å oppløses etter 75-80 timer. Man observerte også at dette kunne skje fordi om det ikke var mangel på næringsstoffer (Rice, Koh et al. 2005). Dette stemmer godt overens med de resultatene funnet i forsøket. Hvor man så at biofilmdannelsen hos samtlige stammer avtok fra dag to og utover. Best ble dette observert hos *S. marcescens* MF 2602 en ATCC-stamme hvor man så en kraftig nedgang mellom dag to og seks.

5.1.1b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

Flere D-aminosyrer hadde en signifikant effekt på hemming av biofilm hos *Serratia* spp. henholdsvis fenylalanin, prolin og leucin. Man så også en signifikant hemming på biofilmdannelse ved tilsetning av dispersin B. Det har tidligere blitt vist til dispersin B sin evne til å hindre biofilmdannelse hos en rekke bakterier inkludert *Staphylococcus epidermidis* og

Pseudomonas aeruginosa/fluorescens (Itoh, Wang et al. 2005). Man viser her at dette også er tilfelle hos *Serratia* spp. Når det gjelder D-aminosyrer har man sett effekt av disse også tidligere hos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Bacillus subtilis*. Det var da spesielt D-tyrosin og en blanding av flere D-aminosyrer som var effektivt, men methionin, tryptofan og leucin hadde alle en viss effekt, mens D-fenylalanin var inert i studien (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010). Man viser her at man fikk effekter ved bruk av D-aminosyrer hos *Serratia* spp. i tillegg fikk man en hemmende effekt ved tilsats av D-fenylalanin noe som tidligere har blitt vist kunne ha en effekt på *S. aureus* biofilm (Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011).

5.1.2 *Pseudomonas* spp.

5.1.2a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Pseudomonas spp. dannet signifikant mer biofilm i rør etter 14 dager enn *Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp., og *Serratia* spp. se tabell 4.2. De fleste stammene dannet kraftig biofilm i glassrør etter 14 dager se figur 4.4. Unntaket var *P. aeruginosa* MF 3601 som i denne testen viste dårlige egenskaper for biofilmdannelse på glass. *Pseudomonas* spp. er i hovedsak aerob men kan i visse tilfeller bruke nitrat som elektronakseptor og dermed ha mulighet til å kunne vokse ved anaerobe betingelser (Holt, Krieg et al. 1994). Man så hos noen stammer spredt biofilmdannelse i hele røret. Noe som kan tyde på bruk av anaerob metabolisme, eller at oksygentilførelsen også har vært akseptabel lenger nede i glassrøret. *P. aeruginosa* er en bakteriestamme som det har blitt jobbet mye med nettopp på grunn av sin evne til å danne biofilm. Denne bakteriestammens egenskaper som biofilmdanner har blitt dokumentert i en rekke artikler og bøker og den har blitt godt kjent for sin egenskap som gjør at den kan være en fare for personer med cystisk fibrose. (Schaber, Triffo et al. 2007; Ma, Conover et al. 2009; Yan and Fratamico 2009). *P. aeruginosa* dannet lite eller ingen biofilm på glass i dette forsøket. Stammen som ble jobbet med i dette forsøket ble isolert fra slakteri. Hvorfor denne stammen ikke danner biofilm i dette forsøket når den er kjent for sine egenskaper som biofilmdanner kan diskuteres. Det er for eksempel bevist at biofilm dannes både ved lavt og høyt innhold av næringsstoffer. Dog vil biofilm ofte være tykkere og mer tettpakket i et miljø hvor næringsinnholdet er stort (Stellenbosch, Molobela et al. 2009). Så man på biofilmdannelsen i polystyrene mikrotiterbrett var den mye høyere for *P. aeruginosa* der. Muligens kan denne mangelen på biofilmdannelse i glass skyldes MF 3601 sine mulig manglende egenskaper til å feste seg på glassoverflater. Det har tidligere blitt vist at hydrofile overflater (glass og metall) er

vanskeligere å kolonisere enn hydrofobe overflater (plastikk og teflon) (Stellenbosch, Molobela et al. 2009). Samtidig vet man lite om hvordan vekstmediumet i denne oppgaven vil påvirke glassoverflaten det har tidligere blitt kjent at polysakkarider, proteiner, lipider, nukleinsyrer og aromatiske aminosyrer alle kan utfelles til overflater og dermed også lede til endrede kjemiske egenskaper på overflaten, også kalt kondisjoneringsfilm (Dunne 2002; Stellenbosch, Molobela et al. 2009) (Simões, Simões et al. 2010).

Resultatene fra forsøket viste at *P. fluorescens* MF 1944 dannet kraftig biofilm etter 14 dager. I en studie utført med *P. fluorescens* fant man ut at hvis man inkuberte denne bakterien i lenger enn 50 timer så ville biofilmen begynne å oppløses (Allison, Ruiz et al. 1998). Man mener at dette skyldes lyaser som bryter ned eksopolysakkarider som vil føre til en forløsning fra overflaten bakterien er festet til (Stellenbosch, Molobela et al. 2009). Det har tidligere blitt vist at *P. aeruginosa* og *P. fluorescens* kan produsere disse enzymene (Stellenbosch, Molobela et al. 2009). Man mener denne oppløsningen av biofilm henger sammen med mangel på næringstoffer og at lysase aktivitet ble trigget av denne tilstanden (Stellenbosch, Molobela et al. 2009). I dette forsøket fikk man en nedgang i biofilmdannelse fra dag seks til 10, for så igjen få en økning med resultat i en kraftig biofilm etter dag 14. Noe som kan gi indikasjoner på at det har vært en lysase aktivitet men at bakteriecellene så har festet seg igjen. Nå skal det også påpekes at målingene har blitt gjort på forskjellige rør som har blitt lagret over ulik tid. Det er selvfølgelig mulig at bakteriene har oppført seg forskjellig fra rør til rør. Forskjellig konsentrasjon av næringstoffer i vekstmediumet i de forskjellige rørene kan også være en feilkilde.

5.1.2b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

Resultatene viser at biofilmdannelse hos *Pseudomonas* spp. ble hemmet signifikant av enzymene dispersin B og DNAase uten å hemme cellevekst i stor grad. Ellers fant man ingen signifikante effekter. Det har tidligere blitt vist at DNA spiller en viktig rolle hos *Pseudomonas* sp. ved cellens adhesjon til overflater (Andrews, Rolfe et al. 2010). Dette stemmer godt overens med resultatene fra dette forsøket der man så at DNAase hadde en signifikant effekt. Proteinase K så ut til å kunne gi en økning i biofilmdannelse hos noen *Pseudomonas* spp. Dette så man spesielt hos *P. aeruginosa* MF 3601 hvor man så en markant men ikke signifikant økning i biofilmdannelse ved tilsats av proteinase K se figur 4.19. Denne effekten har tidligere blitt vist hos *Rhodococcus ruber* hvor man så en økning av biofilm ved tilsats av Proteinase K mens tilsats av trypsin (også en protease) hadde den motsatte effekten (Gilan and Sivan 2013). Hvorfor man så en økning i

biofilm kan muligens skyldes at man ved tilsats av proteinase K får en ikke tiltenkt nedbryting av ekstracellulære proteaser som er ansvarlige for oppløsning av biofilm hos *P. aeruginosa* (Gilan and Sivan 2013). Man så bare små og sporadiske effekter på tilsats av D-aminosyrer hos *Pseudomonas spp.* Man så liten effekt med tilsats av D-tyrosin i en konsentrasjon på 0,5 mM hos *P. aeruginosa* MF 3601. Det har tidligere blitt gjort forsøk med D-aminosyrer på *P. aeruginosa* man fant da at D-tyrosin (3 μ M) og en mikstur av flere aminosyrer (D-metionin, D-tryptofan, D-tyrosin og D-leucin) med en minimum konsentrasjon på ~10 nM virket hemmende på biofilmdannelse. Hvorfor man ikke fikk en effekt med D-tyrosin er ikke kjent men man har jo tidligere sett at forskjellene kan være markante innenfor samme art hos *Bacillus subtilis* se figur 4.21. Dette kan muligens også være tilfelle i denne sammenligningen.

5.1.3 *Acinetobacter spp.*

5.1.3a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Resultatene fra testen tyder på at *Acinetobacter spp.* sammenlignet med andre slekter i dette forøket var gode biofilmdannere som over tid ville danne en kraftig biofilm. Se tabell 4.1 og 4.2. Samtidig finner man store individuelle forskjeller for eksempel så var forskjellen på biofilmdannelse hos *A. wloffii* MF 3290 og *A. calcoaceticus* MF 3627 ganske markant, se figur 4.6. Slekten *Acinetobacter* har en aerob metabolisme og vil naturligvis derfor søke mot oksygenrike omgivelser (Holt, Krieg et al. 1994). Dette ser man igjen i forsøket hvor fire av fem stammer dannet tykk biofilmring på glassrør i grenseflaten mellom væske og luft. Ingen *Acinetobacter* dannet biofilm i grensen mellom luft og væske eller en såkalt pellikkel. Noe som ble påpekt kunne være tilfelle hos *A. calcoaceticus/baumannii* (Marti, Rodriguez-Bano et al. 2011).

Studier på *A. baumannii*, en nosokomial patogen peker på denne bakteriestammens evne til å danne biofilm på glassoverflater og dens evne til og overleve i ugunstige miljø (Gaddy and Actis 2009; Pour, Dusane et al. 2011). Resultatene fra dette forsøket viser at det er store individuelle forskjeller i biofilmdannelse på glass blant stammer av *Acinetobacter*. Forsøket viser også at andre stammer innenfor slekten *Acinetobacter* besitter egenskaper som gjør dem i stand til å danne biofilm på glassoverflater. Samtidig som de danner kraftig biofilm som kan gjøre dem godt rustet til å overleve i et vannholdig miljø som ofte forekommer i næringsmiddelindustrien (Grinstead 2009; Marti, Rodriguez-Bano et al. 2011).

5.1.3b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

De ble ikke funnet noen signifikante effekter på hemming av biofilm hos *Acinetobacter* spp. Av virkestoffene som ble testet hadde proteinase K den beste samlede effekten på hemming av biofilm. Biofilmdannelsen ble hemmet i liten eller ingen grad av D-aminosyrer hos MF 3293. Dette var til dels tilfelle med andre *Acinetobacter*, dog kunne man se sporadiske effekter. I en studie utført på *A. baumannii* ble det blant annet funnet ut at BAP (biofilm associated protein) spilte en stor rolle i denne bakteriestammens egenskaper til å danne biofilm på overflater (Brossard and Campagnari 2012). Det at enzymet proteinase K hemmet best kan muligens tyde på at dette også kan være en mekanisme hos andre *Acinetobacter* spp.

5.1.4 *Bacillus* spp.

5.1.2a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Resultatet fra forsøket viser at *Bacillus* spp. ikke er den beste biofilmdanner på glass se tabell 4.1 og 4.2. Man kunne observere til dels spredt biofilmdannelse i hele røret se figur 4.7. Man finner også for denne slekten individuelle forskjeller i biofilmdannelse i glassrør og spesielt en stamme skiller seg ut, *B. subtilis* MF 4705 se figur 4.8. *B. subtilis* evne til å danne pellickel i TSB ble også vist i denne oppgaven, hvor den ble observert hos MF 1987-stammen etter seks og delvis etter 14 dager. Hos MF 4705-stammen ble den bare observert etter 10 dager hvor også biofilmdannelsen på glassrør var høyest. *Bacillus* spp. er aerob eller fakultativt aerob. Det betyr at den kan leve i både oksygenfattige og oksygenrike miljøer (Holt, Krieg et al. 1994). Dette kan man muligens se igjen på den noe litt spredte biofilmdannelsen, dog ble også dette observert hos bakteriestammer som var aerobe noe som kan tyde på at oksygeninnholdet også var tilstrekkelig lenger nede i røret. En studie viser til *B. subtilis* evne til å danne pellickel i et biofilm induserende vekstmedium. Hvor man etter tre dager observerte tykk biofilm i grenseflaten mellom luft og væske. Det ble så inkuberte i tre til fem dager til, noe som ville gi en mindre intakt pellickel (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010). Man kan i dette arbeidet til dels bekrefte disse funnene. Hvor pelikkeldannelse hos *B. subtilis* ble observert.

5.1.4b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

De ble ikke funnet noen signifikante effekter på hemming av biofilm hos *Bacillus* spp. Likevel kunne man se indikasjoner på effekter spesielt da hos *B. subtilis* MF 1987 som tilsynelatende viste tegn på at den lot seg hemme av de fleste virkestoffene se figur 4.21. Det er også påfallende at MF 4705 en annen *B. subtilis* oppfører seg så forskjellig. Dette viser at man også må være

forsiktig med å generalisere innenfor en stamme. *B. subtilis* har egenskaper som gjør at den blir hemmet av D-aminosyrer og norspermidin dette har tidligere blitt observert (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011; Kolodkin-Gal, Cao et al. 2012). MF 1987 har blant annet tidligere blitt brukt i forsøk med aminosyrer (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010) Man ser antydninger til en effekt hos flere D-aminosyrer, men ikke norspermidin som tidligere har fått påvist en effekt på hemming av biofilm hos *B. subtilis*. De var som nevnt, helt i starten ikke mulig å påvise noen signifikante forskjeller på slekten som en helhet eller individuelle stammer årsaken til dette skyldes delvis for lite innsamlet data samt liten biofilmdannelse i kontroll. Det er for eksempel mulig at et annet vekstmedium ville gitt en bedre biofilmdannelse.

5.1.5 *Psychrobacter* spp.

5.1.5a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Psychrobacter spp. dannet biofilm i glassrør. Spesielt en stamme utpekte seg *P. glacincola* som etter 14 dager dannet en kraftig biofilm. *P. pulmonis/faecalis* MF 4641 dannet også en relativt solid biofilm mens de to øvrige ikke dannet særlig med biofilm se figur 4.10. *Psychrobacter* spp. har en aerob metabolisme (Holt, Krieg et al. 1994). Dette ser man veldig tydelig hos MF 4641 og MF 4104 hvor det meste av biofilmdannelsen skjer i grenseflaten mellom væske og luft, se figur 4.9. Da denne oppgaven ble skrevet ble det ikke funnet noe relevante studier på biofilm hos *Psychrobacter* spp. Det ble allikevel funnet en studie som hevder å isolert *P. pulmonis* sp. fra lungene til en ett år gammel sau og et 20 dager gammelt lam hvor de eneste kliniske tegnet var en plutselig og brå død. Det mulig å anta at det er snakk om en infeksjon hvor bakterien har dannet biofilm i lungene hos dyret (Vela, Collins et al. 2003). Denne egenskapen har tidligere blant annet blitt påvist hos *Pseudomonas aeruginosa* som har blitt isolert fra pasienter med cystisk fibriose (Høiby, Ciofu et al. 2010). Man har i dette forsøket vist at *psychrobacter* spp. kan være gode biofilmdannere samtidig som det er store individuelle forskjeller på biofilmdannelse i glass hos de forskjellige stammene.

5.1.5b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

Det ble funnet en signifikant effekt på hemming av biofilm ved tilsats av proteinase K uten å hemme cellevekst hos *P. glacincola* MF 4104. Det ble ellers ikke funnet noen signifikante effekter. Resultater fra rørmetode kan gi en indikasjon på at *Psychrobacter* spp. sett under ett, er relativt trege biofilmdannere, dette forklarer hvorfor man etter to dager i mikrotiterbrett bare får

dannet små mengder biofilm i kontroll. Dette gjør at det samtidig blir vanskelig å se effekter av stoffene man tilsatte. En studie peker på *Psychrobacter* spp. sitt nære fylogenetiske slektskap til *Acinetobacter* spp. (Vela, Collins et al. 2003). Man fikk i denne oppgaven en signifikant hemming av biofilm hos MF 4104 med proteinase K noe som også var tilfelle til dels hos *Acinetobacter* spp. Dette kan indikere at disse to bakterieslektene også deler samme mekanisme for biofilmdannelse nemlig BAP.

5.1.6 *Rhodococcus* spp.

5.1.6a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Resultatene fra forsøket viste at *Rhodococcus* spp. dannet lite biofilm over 14 dager unntaket var til dels *R. fascians* som etter 10 og 14 dager utmerket seg som biofilmdanner i forhold til øvrige stammer fra slekten *Rhodococcus* se figur 4.12 i tillegg ble det observert pellikkel hos denne stammen etter 14 dager. *Rhodococcus* spp. har en aerob metabolisme (Holt, Krieg et al. 1994). På grunn av lav biofilmdannelse kan dette ikke være like lett å observere, men man så hos alle stammene en svak ring i grenseflaten mellom væske og luft. Se figur 4.11.

5.1.6b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

Rhodococcus spp ga dårlig biofilmdannelse over to dager noe som også figur 4.12 viser er tilfelle i glassrør. Ved forsøk over 10 dager var biofilmdannelse også lav. Det var derfor vanskelig å vurdere biofilmdannelse med hensyn til virkestoffer.

5.1.7 *Kocuria* spp. i tillegg til ulike slekter med bare en stamme

5.1.7a Rørmetode: biofilmdannelse i glassrør

Kocuria spp:

Resultatene fra forsøket viste at man kunne se en tydelig og sterk biofilmring i grenseflaten mellom væske og luft hos *Kocuria rhizophila* MF 3620. Hos *Kocuria* sp. MF 3784 ble det bare observert biofilm i bunn av glassrøret, se figur 4.13. *Kocuria* spp har en aerob metabolisme indikasjoner på dette ble observert veldig klart hos MF 3620 men ikke hos MF 3784 (Takarada, Sekine et al. 2008). Årsaken til dette kan muligens være at biofilmen i grenseflaten mellom væske og luft har blitt vasket bort hos MF 3784 samtidig som oksygentilførselen også har vært

tilfredsstillende lavere nede i glasset. Muligens kan også MF 3784 være en stamme av *Kocuria kristinae* som er den eneste arten innefor slekten *Kocuria* som har en fakultativ anaerob metabolisme (Savini, Catavittello et al. 2010). Disse to stammene hadde også en veldig ulik vekstkurve der MF 3620 hadde en rask biofilmdannelse som senere ble oppløst, mens MF 3620 var en tregere biofilmdanner men som etter 14 dager hadde lagd en kraftig biofilm. Se figur 4.15.

Øvrige

Man så at flere stammer dannet kraftig biofilm i grenseflaten mellom væske og luft. Felles for alle disse stammene er at de er fakultativt anaerobe med unntak av *Curtobacterium flaccumfaciens* MF 4709 som er obligat aerob (Holt, Krieg et al. 1994) Ser man i figur 4.13 ser man antydninger som tyder på disse foretrekker å oppholde seg i grenseflaten mellom væske og luft. Så man på biofilmdannelsen over tid pekte to stammer seg ut. Dette var *Corynebacterium simulans* MF 4709 og *Citrobacter freundii* MF 3631 disse dannet begge kraftig biofilm etter 14 dager. Se figur 4.14.

5.1.7b Effekt av stoffer på biofilmdannelse i mikrotiterbrett

Flere av stammene testet her, er til forfatterens kunnskap fortsatt relativt lite forsket på når det kommer til temaet biofilm. Eneste unntaket er den patogene mikroorganismen *Esherichia coli*. *Corynebacterium simulans* MF 4701 viste seg som en god biofilmdanner i polystyren. Man fant ingen signifikante effekter men proteinase K så ut til å hemme biofilmdannelsen markant noe som kan antyde at denne bakteriestammen bruker BAP mekanismer for biofilmdannelse, se figur 4.23. Alle stammer ble testet men de fleste viste dårlige egenskaper for biofilmdannelse over to dager noe som førte til at de var lite egnet i dette forsøket. Man kan se indikasjoner på dette i figur 4.14 og figur 4.15. Man skulle tro at *Kocuria* sp. MF 3784 skulle være utmerket til dette forsøket men den oppførte seg ustabil og viste seg heller som en dårlig biofilmdanner i polystyren-mikrotiterplater. Også en annen mer kjent bakterie *E. coli* MF 3733 viste seg som en dårlig biofilmdanner noe som tidligere har blitt observert hos Uropatogen *E. coli* (Ferrières, Hancock et al. 2007). Man fikk også relativt de samme resultatene fra 10 dagers forsøket.

5.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse

Man fikk ingen overbevisende nedgang i biofilmdannelse hos *Serratia marcescens* MF 2602 ved bruk av supernatant fra samme bakteriestamme. Ved bruk av oppkonsentrert TSB (2x TSB) og

filtrert supernatant så man ikke noe nedgang i biofilmdannelse i forhold til i kontroll. Man kunne muligens se en marginal nedgang i biofilmdannelse ved bruk av ufiltrert supernatant inkubert i TSB se figur 4.17 I begge forsøkene holdt biofilmdannelsen hos MF 2602 seg på samme nivå ved inkubering i vanlig TSB uten andre tilsetninger. Dette viser at bakteriestammen har oppført seg på lik måte i de to forsøkene. Ser man generelt på forskjeller mellom de to forsøkene ser man at biofilmdannelse var høyere i forsøk med ufiltrert supernatant. Hva dette skyldes blir ren teori og man kan bare spekulere. Det har for eksempel tidligere blitt vist at et tap i konsentrasjon av næringsstoffer kan virke oppløsende på biofilm hos *Pseudomonas putida* (Gjermansen, Ragas et al. 2005). Mens det motsatte kunne være tilfelle hos *Pseudomonas aeruginosa* (Sauer, Cullen et al. 2004). Det er godt mulig at et høyere nivå av næringsstoffer i forsøket med filtrert supernatant har virket positivt på biofilmdannelsen. I det ene forsøket ble supernatanten filtrert med et 0,2 µm filter det kan godt tenkes at ulike virkestoffer produsert av bakterien ikke ble med i filtreringsprosessen. Ulik dyrkningstid på supernatant er også noe man bør ta i betraktning. Det ble også observert hos to stammer henholdsvis *Bacillus fuciformis* MF 3282 og *S. marcescens* MF 2326 (data ikke vist) at disse dannet marginal biofilm inkubert med 2xTSB + H₂O noe som i teorien skulle gi TSB med vanlig konsentrasjon. Mens man så god biofilmdannelse i TSB. Samtidig var det liten forskjell i vekst dette kan muligens tyde på at det dannes stoffer for eksempel fra Maillard-reakjonen i røret som gjør at disse bakteriestammene foretrekker planktonisk vekst.

5.3 Effekt på bruk av ulike konsentrasjoner av D- og L-aminosyrer på biofilm i mikrotiterbrett

Flere bakteriestammer ble testet for effekten av tilsats av D-aminosyrer kontra L-aminosyrer. Det ble observert varierende resultat hvor *Bacillus subtilis* MF 1987 viste resultater som tyder på at flere D-aminosyrer kan ha en inhiberende effekt på biofilmdannelse se figur 4.24. Hvor også effekten er konsentrasjonsavhengig noe som vil si at økt konsentrasjon ga en bedre effekt. L-aminosyrer og D-aminosyren alanin hadde en motsatt effekt og så ut til å kunne øke biofilmdannelse i forhold til kontroll. Disse var også konsentrasjonsavhengige. Effekten av D-aminosyrer har tidligere blitt beskrevet i litteraturen og man har vist at disse kan ha en effekt hos *B.subtilis* og *Staphylococcus aureus* (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010; Hochbaum, Kolodkin-Gal et al. 2011).

Generelt så man lite effekter av D-aminosyrer kontra L-aminosyrer hos de andre bakteriestammene i forsøket. Man kunne man se enkelte effekter men disse var ofte sporadiske og man kunne ikke se noen klare mønster. Noe som igjen viser at det er farlig å generalisere. Likevel er det viktig og påpeke at dette forsøket bare ble utført en gang, men grunnet oppgavens begrensninger var ikke flere gjentak mulig.

5.4 Bruk av ulike stoffer for hemming av biofilm

Samlet for alle stammene som ble testet i forsøket så man den beste effekten ved bruk av DNase på hemming av biofilm denne effekten ble også funnet signifikant, se figur 4.24. Dette kan antyde at ekstracellulært DNA er en essensiell del av biofilm matriks hos bakterier. Bekreftelser på dette så man særlig hos *Pseudomonas* spp. DNase hadde også liten effekt på vekst dette indikerer at DNase-enzymene ikke har trengt gjennom celleveggen hos bakteriene, noe som også har vært tilfelle i andre studier (Tetz, Artemenko et al. 2009).

Proteinase K så ut til å ha en hemmende effekt på biofilmdannelse hos slekten *Acinetobacter*. Dette var også tilfelle hos *Psychrobacter glacincola* hvor man fant en signifikant effekt på hemming av biofilmdannelse ved tilsats av proteinase K. Disse effektene kan antyde at *Acinetobacter* spp. og *P. glacincola* danner biofilmer som er rike på proteinforbindelser. Hos *Serratia* spp. og hos noen *Pseudomonas*-stammer ble det motsatte observert denne effekten kan muligens skyldes at man ved tilsats av proteinase K får en nedbryting av ekstracellulære proteaser som er ansvarlige for oppløsning av biofilm (Gilan and Sivan 2013).

Dispersin B katalyserer hydrolysen av acetylglukosamin et ekstracellulært polysakkarid. Man så effekter av dette enzymet på hemming av biofilmdannelse hos så godt som samtlige bakterier og effekten var signifikant hos *Serratia* spp. og *Pseudomonas* spp. Noe som tyder på at biofilm matriks i en større eller mindre grad består av polysakkarider (Kaplan, Rangunath et al. 2004).

Trypsin en annen protease, splitter peptidbindinger hos lysin og arginin. Generelt så man en effekt på hemming av biofilmdannelse, i tillegg til at trypsin så ut til å ha en marginalt bedre effekt enn proteinase K se figur 4.24. Denne marginale forskjellen kan skyldes at proteinase K ga økte biofilmdannelse hos noen bakteriestammer, en effekt som ikke ble observert hos trypsin. Ser man i litteraturen har en lignende effekt tidligere blitt observert ved bruk av proteinase K og trypsin i en studie på biofilmdannelse hos *Rhodococcus ruber* (Gilan and Sivan 2013).

D-aminosyrer hadde best effekt på hemming av biofilmdannelse hos *Serratia* spp. der man så signifikante effekter, man så også en bra effekt individuelt hos *Bacillus subtilis*. Ellers så man generelt bare sporadiske effekter, der det var antydninger til at D-fenylalanin og D-prolin hemmet biofilmdannelse noe bedre enn øvrige D-aminosyrer, se figur 4.24. Man har tidligere funnet at D-tyrosin har virket best mot biofilmdannelse hos *B. subtilis* (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010). Dette så man indikasjoner på stemte i aminosyreforsøket men her hemmet også D-

tyrosin vekst. For øvrig kunne man ikke se indikasjoner på at D-tyrosin skulle være mer effektiv enn andre D-aminosyrer (Kolodkin-Gal, Romero et al. 2010).

Norspermidin utmerket seg ikke i dette arbeidet men, var heller ikke inert noe figur 4.24 kan gi indikasjon på. Totalt hadde den en noe bedre prosentvis hemming på gjennomsnittet enn flere av D-aminosyrene.

5.5 Relevans av resultater for kontroll av biofilm i næringsmiddelindustrien

Det ble i denne oppgaven i hovedsak benyttet bakteriestammer isolert fra næringsmiddelindustrien i tillegg til noen lab-stammer. På grunn av denne oppgavens begrensninger ble bakteriestammene utsatt for kontrollerte forhold som ikke er naturlig i det miljøet de ble isolert fra. Det være seg blant annet temperatur, tid og tilgjengelighet på næringsstoffer. I en næringsmiddelbedrift vil ofte temperaturene holde seg lavere og påkjenningene vil generelt være tøffere. I tillegg skal man ikke glemme at bakteriestammer ute i næringsmiddelindustrien sjelden eksisterer alene, de eksiterer sammen med andre stammer og påvirker hverandre både synergistisk og antagonistisk (Burmølle, Webb et al. 2006).

Biofilmer er også sjelden homogene derfor kan det ofte være en utfordring for industrien og velge de rette rengjøringsmidlene. Biofilm er et stort problem i næringsmiddelindustrien og økt kunnskap på dette området er viktig med tanke på fjerning og forebygging. Det finnes også et utall metoder for fjerning av biofilm. Derfor bør man optimalisere for hver en enkel bedrift slik at man får de ønskede resultatene (Grinstead 2009). Denne oppgaven vil da være et eksempel på hvor stor diversiteten innenfor bakterieslekter kan være, noe som er en av flere faktorer som skaper utfordringer når det kommer til renhold og fjerning av biofilm i næringsmiddelindustrien.

6.0 Konklusjon

Resultatene fra denne oppgaven bekrefter det store mangfoldet som ulike bakterieslekter innehar. Ut i fra forsøkene som ble gjort så man blant annet at *Pseudomonas* spp. dannet den kraftigste biofilmen over tid. Noe som gir en indikasjon på at denne slekten kan dominere i næringsmiddelindustrien og produsere biofilm over tid som kan virker som et tilholdssted for andre mikroorganismer.

Serratia spp. utmerket seg som en veldig hurtig biofilmdanner. Dette kan gi indikasjoner på at denne slekten muligens kan fungere som et tidlig oppholdssted hvor andre planktoniske mikroorganismer kan feste seg i en tidlig fase av biofilmutviklingen.

Det ble funnet effekter på hemming av biofilm. Biofilmdannelsen hos *Pseudomonas* spp. lot seg tilsynelatende hemme av DNase og dispersin B noe som kan indikere en biofilm bestående av mye polysakkarid og DNA.

Serratia spp. lot seg hemme av flere virkestoffer. Disse var D-aminosyrene leucin, fenyylalanin, og prolin i tillegg til enzymet dispersin B. Dette kan indikere at *Serratia* spp. bruker D-aminosyrer for regulering og splittelse i aldrende bakteriekulturer, samt danner en biofilm bestående av mye polysakkarid.

Generelt så man best effekt på hemming av biofilm ved tilsetning av enzymet DNase, noe som støtter teorien om at ekstracellulært DNA er en stor del av biofilm matriks.

I tillegg så man variasjoner innenfor slektene, som ikke var mindre enn variasjonene mellom slektene. Dette indikerer at når man jobber med biofilmdannelse hos en spesifikk bakteriestamme bør man være forsiktig med å generalisere og si at dette gjelder for alle bakterier av denne typen.

7.0 Forslag til videre arbeid

Denne oppgaven kan fungere som en plattform for videre forsøk, disse kan være.

- Generelt gjenta forsøkene i denne oppgaven og dermed opparbeide seg et bedre statistisk grunnlag enn det man har i dette arbeidet, samt bekrefte de resultatene allerede funnet
- Se på biofilmdannelse og på effekter av enzymer under andre vekstforhold som for eksempel temperatur, tid og ved bruk av andre vekstmedium
- Jobbe med supernatant fra *Bacillus subtilis* MF 4705 som har en kraftig nedgang i biofilmdannelse på dag 10, men ble forbigått i denne oppgaven
- Benytte en blanding av D-aminosyrer i stedet for å teste de enkeltvis
- Tilsette flere enzymer til en blanding, for eksempel DNase og dispersin B for å se om man får enn enda større effekt på hemming av biofilm hos bakterier.
- Gjøre flere D- og L-aminosyreforsøk med *Bacillus subtilis* MF 1987 samt teste om et annet vekstmedium vil gi bedre vekst og dermed en bedre biofilmdannelse.
- Flere av bakteriestammene i dette forsøket dannet lite biofilm i glass i tillegg til i mikrotiterbrett. Hvorfor det?
- Jobbe med en blanding av flere stammer for eksempel *Serratia*.spp. og *Pseudomonas* spp. for å se hvordan disse påvirker hverandre. Vil for eksempel biofilm fra *Serratia* dominere i starten for så og bli dominert av *Pseudomonas* biofilm?

8.0 Kilder

Allison, D. G., B. Ruiz, et al. (1998). "Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms." FEMS Microbiology Letters **167**(2): 179-184.

Andrews, J. S., S. A. Rolfe, et al. (2010). "Biofilm formation in environmental bacteria is influenced by different macromolecules depending on genus and species." Environmental Microbiology **12**(9): 2496-2507.

Boles, B. R. and A. R. Horswill (2008). "agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms." PLoS Pathog **4**(4): e1000052.

Boles, B. R. and A. R. Horswill (2011). "Staphylococcal biofilm disassembly." Trends in microbiology **19**(9): 449-455.

Bore, E. and S. Langsrud (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.

Branda, S. S., F. Chu, et al. (2006). "A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix." Molecular Microbiology **59**(4): 1229-1238.

Branda, S. S., J. E. González-Pastor, et al. (2001). "Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*." **98**(20): 11621-11626.

Brossard, K. A. and A. A. Campagnari (2012). "The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells." Infection and Immunity **80**(1): 228-233.

Burmølle, M., J. S. Webb, et al. (2006). "Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms." Applied and Environmental Microbiology **72**(6): 3916-3923.

Cava, F., H. Lam, et al. (2011). "Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria." Cellular and Molecular Life Sciences **68**(5): 817-831.

Chaignon, P., I. Sadvovskaya, et al. (2007). "Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition." Applied Microbiology and Biotechnology **75**(1): 125-132.

Drenkard, E. and F. M. Ausubel (2002). "Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation." Nature **416**(6882): 740-743.

Dunne, W. M. (2002). "Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?" Clinical Microbiology Reviews **15**(2): 155-166.

Ferrières, L., V. Hancock, et al. (2007). "Specific selection for virulent urinary tract infectious Escherichia coli strains during catheter-associated biofilm formation." FEMS Immunology & Medical Microbiology **51**(1): 212-219.

Gaddy, J. A. and L. A. Actis (2009). "Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation." Future Microbiology **4**(3): 273-278.

Gilan, I. and A. Sivan (2013). "Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete Rhodococcus ruber C208." FEMS Microbiology Letters **342**(1): 18-23.

Gjermansen, M., P. Ragas, et al. (2005). "Characterization of starvation-induced dispersion in Pseudomonas putida biofilms." Environmental Microbiology **7**(6): 894-904.

Grinstead, D. (2009). Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. Biofilms in the food and beverage industries. P. M. Fratamico, B. A. Annous and N. W. Gunther IV. Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 331-358.

Harmsen, M., M. Lappann, et al. (2010). "Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation by Listeria monocytogenes." Applied and Environmental Microbiology **76**(7): 2271-2279.

Hochbaum, A. I., I. Kolodkin-Gal, et al. (2011). "Inhibitory Effects of D-Amino Acids on Staphylococcus aureus Biofilm Development." Journal of Bacteriology **193**(20): 5616-5622.

Holt, J. G., N. R. Krieg, et al. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins.

Høiby, N., O. Ciofu, et al. (2010). "Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis." Future Microbiology **5**(11): 1663-1674.

Itoh, Y., X. Wang, et al. (2005). "Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms." Journal of Bacteriology **187**(1): 382-387.

Kanamaru, K., K. Kanamaru, et al. (2000). "SdiA, an Escherichia coli homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7." Molecular Microbiology **38**(4): 805-816.

Kaplan, J. B., C. Rangunath, et al. (2004). "Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermis* Biofilms." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(7): 2633-2636.

Kogan, G., I. Sadovskaya, et al. (2006). "Biofilms of clinical strains of Staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesin." FEMS Microbiology Letters **255**(1): 11-16.

Kolodkin-Gal, I., S. Cao, et al. (2012). "A Self-Produced Trigger for Biofilm Disassembly that Targets Exopolysaccharide." Cell **149**(3): 684-692.

Kolodkin-Gal, I., D. Romero, et al. (2010). "D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly." PMC **328**(5978): 627-629.

Korber, D. R., A. K. Mangalappalli-Illathu, et al. (2009). Biofilm formation by food spoilage microorganisms in food processing environments. Biofilm in the food and beverage industry. P. M. Fratamico, B. A. Annous and N. W. Gunther IV. Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 169-192.

Leisner, J. J., B. Laursen, G, et al. (2007). "Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods." FEMS Microbiol Rev. **31**(5): 592-613.

Liang, Y., H. Gao, et al. (2010). "Pellicle formation in *Shewanella oneidensis*." BMC Microbiology **10**(1): 291.

Lipski, A. (2005). "New focus in combating biofilms: The pioneer organisms on cleaned surfaces." Brau Forum (Tysk) **20**(7): 178-179.

Ma, E., C. Wong, et al. (2005). "Kocuria kristinae infection associated with acute cholecystitis." BMC Infectious Diseases **5**(1): 60.

Ma, L., M. Conover, et al. (2009). "Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix." PLoS Pathog **5**(3): e1000354.

Madigan, M. T., J. M. Matinko, et al. (2009). Brock Biology of Microorganisms, Pearson Benjamin Cummings.

Marti, S., J. Rodriguez-Bano, et al. (2011). "Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species." BMC Research Notes **4**(1): 5.

McDougald, D., S. A. Rice, et al. (2012). "Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal." Nat Rev Micro **10**(1): 39-50.

Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annual Review of Microbiology **55**: 165-199.

Møretrø, T., L. Hermansen, et al. (2003). "Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among *Staphylococci* from Food and Food Processing Environments." Applied and Environmental Microbiology **69**(9): 5648-5655.

Møretrø, T., T. Sonerud, et al. (2006). "Evaluation of the Antibacterial Effect of a Triclosan-Containing Floor Used in the Food Industry." Journal of Food Protection **69**(3): 627-633.

Nijland, R., M. J. Hall, et al. (2010). "Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase." PLoS ONE **5**(12): e15668.

Pawar, D. M., M. L. Rossman, et al. (2005). "Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces." Journal of Applied Microbiology **99**(2): 418-425.

Pour, N. K., D. H. Dusane, et al. (2011). "Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters." FEMS Immunology & Medical Microbiology **62**(3): 328-338.

Rice, S. A., K. S. Koh, et al. (2005). "Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues." Journal of Bacteriology **187**(10): 3477-3485.

Rode, T. M., S. Langsrud, et al. (2007). "Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions." International Journal of Food Microbiology **116**(3): 372-383.

Romero, D., H. Vlamakis, et al. (2011). "AN accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms." Molecular Microbiology **80**(5): 1155-1168.

Sauer, K., M. C. Cullen, et al. (2004). "Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm." Journal of Bacteriology **186**(21): 7312-7326.

Savini, V., C. Catavittello, et al. (2010). "Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*." Journal of Medical Microbiology **59**(12): 1395-1402.

Schaber, J. A., W. J. Triffo, et al. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* Forms Biofilms in Acute Infection Independent of Cell-to-Cell Signaling." Infection and Immunity **75**(8): 3715-3721.

Siebel, M. A. and W. G. Characklis (1991). "Observations of binary population biofilms." Biotechnology and Bioengineering **37**(8): 778-789.

Simões, M., L. C. Simões, et al. (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies." LWT - Food Science and Technology **43**(4): 573-583.

Smith, J., P. M. Fratamico, et al. (2009). Molecular mechanisms involved in biofilm formation by food-associated bacteria. Biofilms in the food and beverage industries. P. M. Fratamico, B. A. Annous and N. W. Gunther IV. Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 42-82.

Smith, J. L., P. M. Fratamico, et al. (2004). "Quorum Sensing: A Primer for Food Microbiologists." Journal of Food Protection **67**(5): 1053-1070.

Stellenbosch, E. C., I. Molobela, et al. (2009). Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. Biofilms in the food and beverage industries. P. M. Fratamico, B. A. Annous and N. W. Gunther IV. Cambridge, Woodhead Publishing: 4-41.

Stoodley, P., K. Sauer, et al. (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annual Review of Microbiology **56**: 187-209.

Takarada, H., M. Sekine, et al. (2008). "Complete Genome Sequence of the Soil Actinomycete *Kocuria rhizophila*." Journal of Bacteriology **190**(12): 4139-4146.

Tetz, G. V., N. K. Artemenko, et al. (2009). "Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(3): 1204-1209.

Van Houdt, R., M. Givskov, et al. (2007). "Quorum sensing in *Serratia*." FEMS Microbiology Reviews **31**(4): 407-424.

Vela, A. I., M. D. Collins, et al. (2003). "Psychrobacter pulmonis sp. nov., isolated from the lungs of lambs." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**(2): 415-419.

Walters, M. and V. Sperandio (2006). "Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella." International Journal of Medical Microbiology **296**(2-3): 125-131.

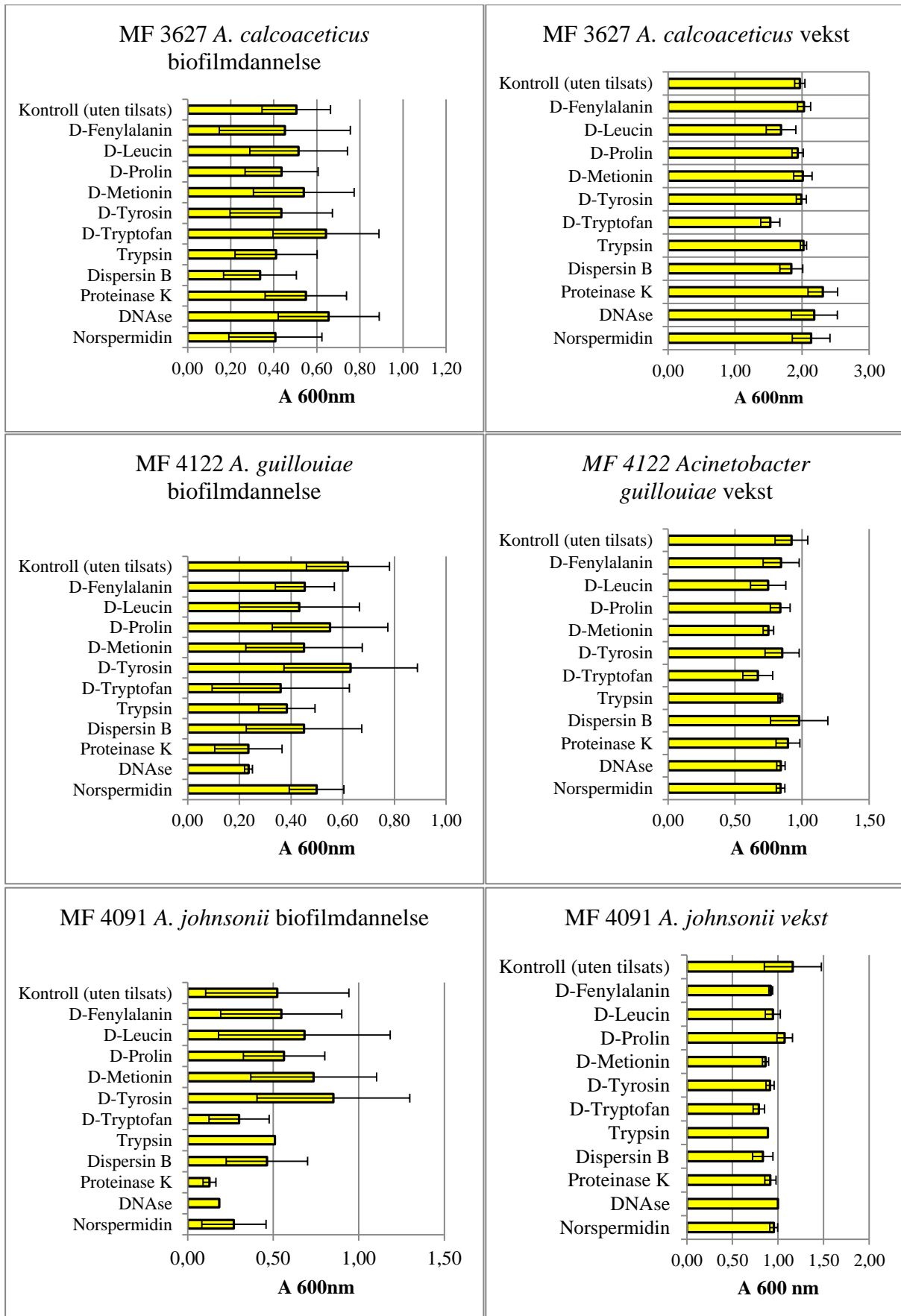
Watnick, P. and R. Kolter (2000). "Biofilm, City of Microbes." Journal of Bacteriology **182**(10): 2675-2679.

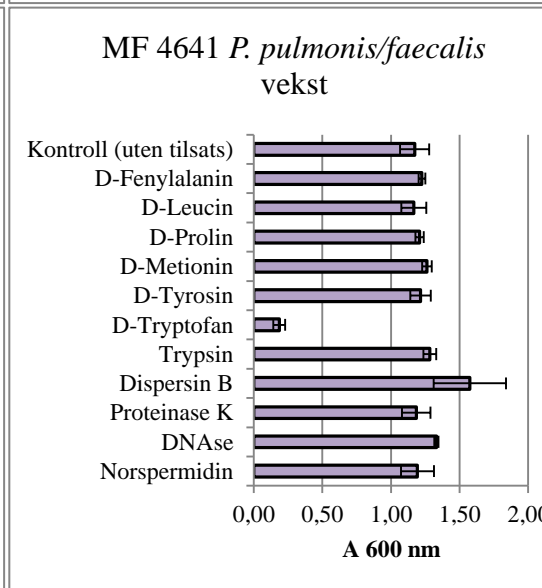
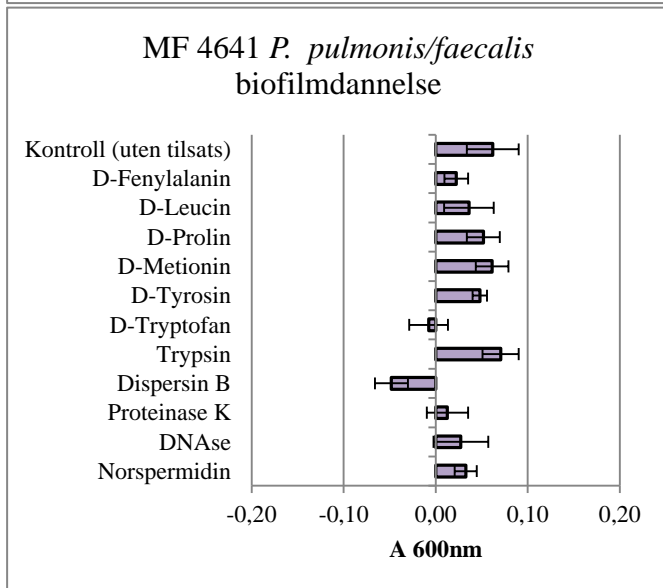
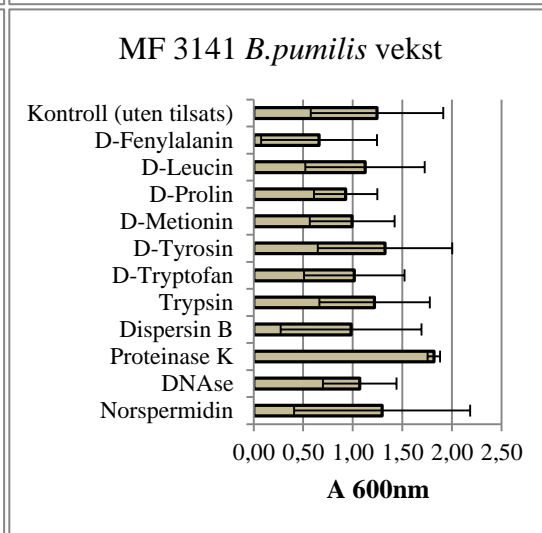
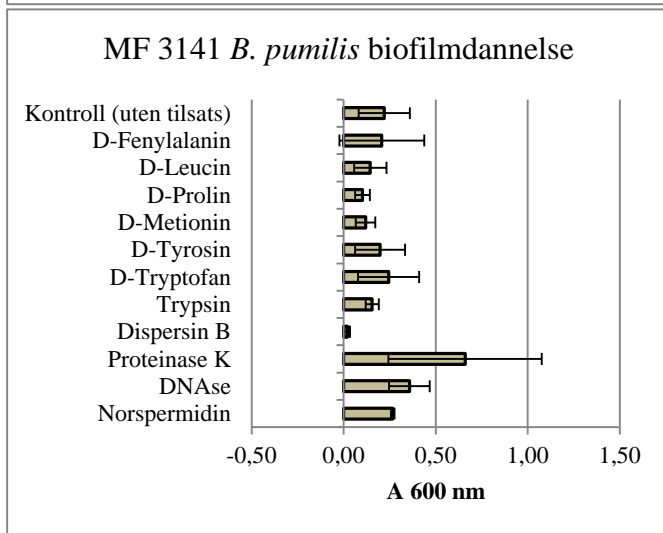
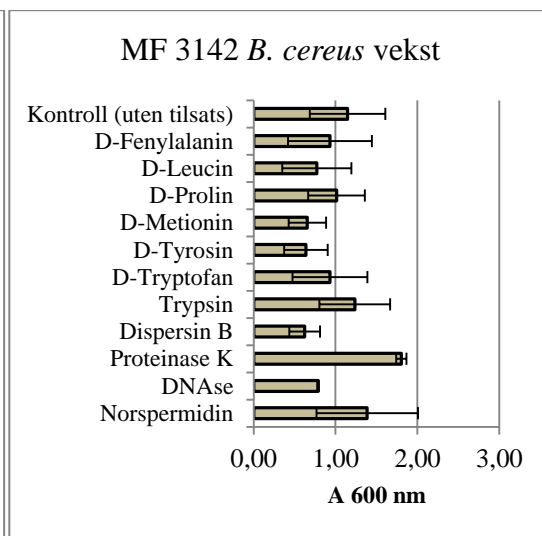
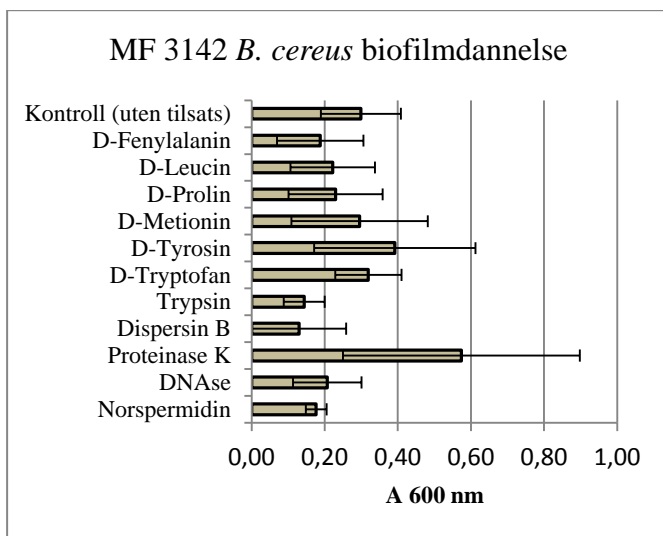
Yan, X. and P. M. Fratamico (2009). A centralized database for use in studying bacterial biofilms and quorum sensing in food processing and other environments: Micro BQs. Biofilms in the food and beverage industries. P. M. Fratamico, B. A. Annous and N. W. Gunther IV. Cambridge, Woodhead Publishing: 152-163.

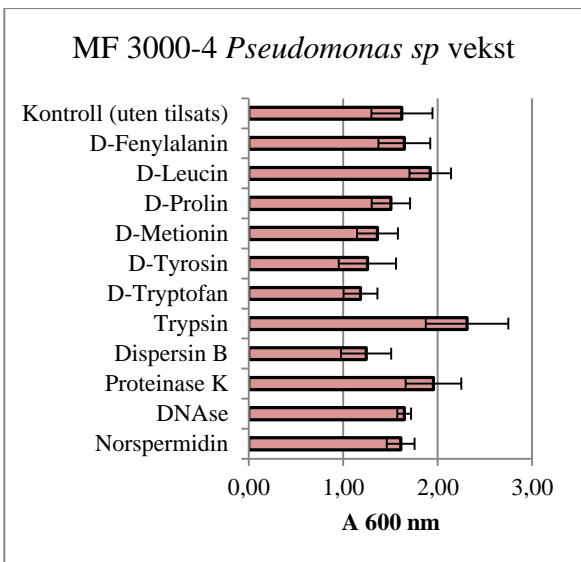
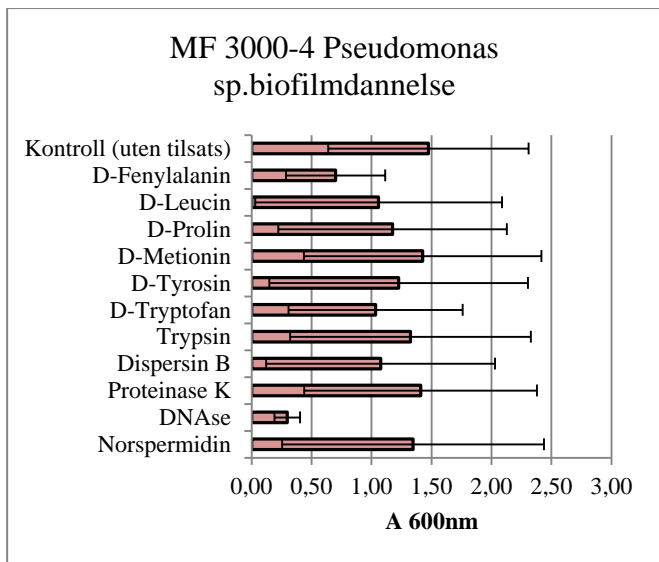
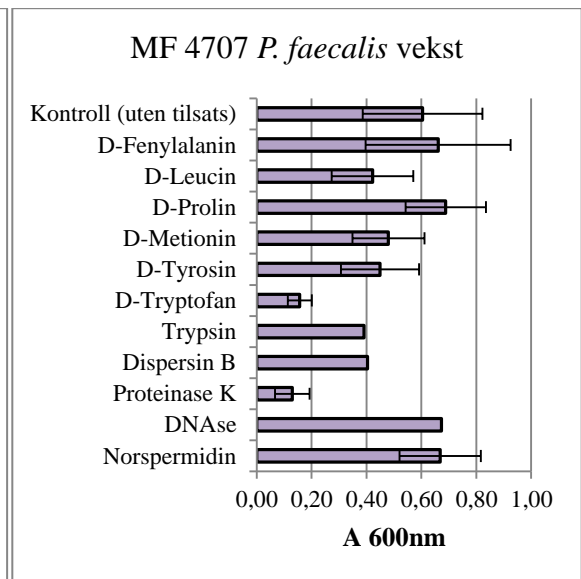
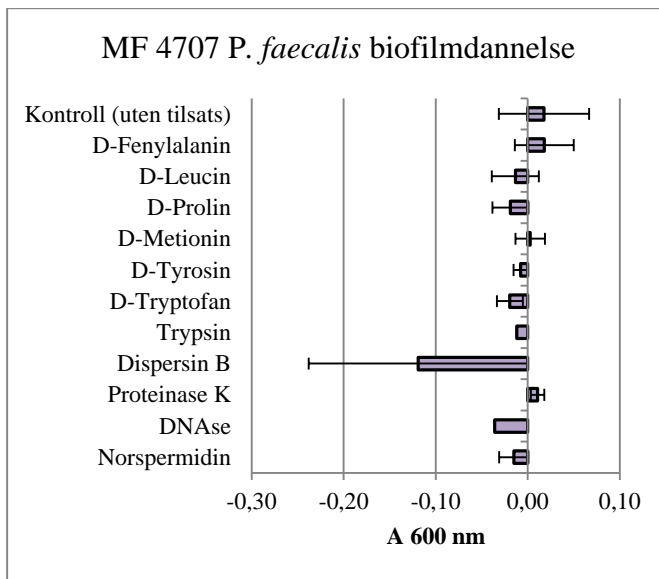
9.0 Vedleggsliste

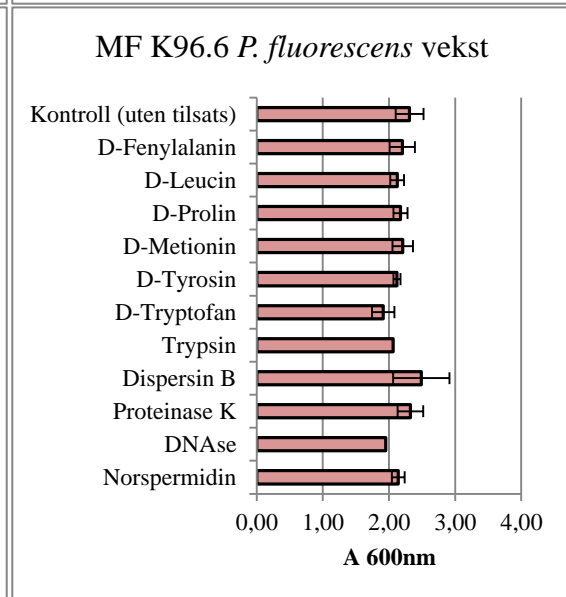
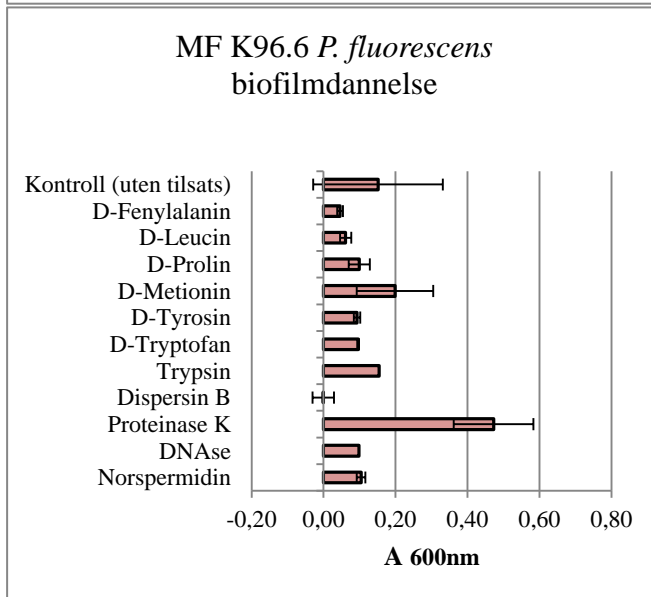
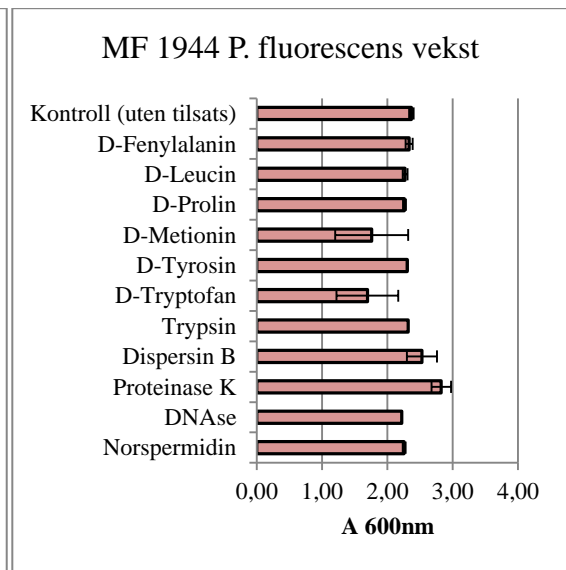
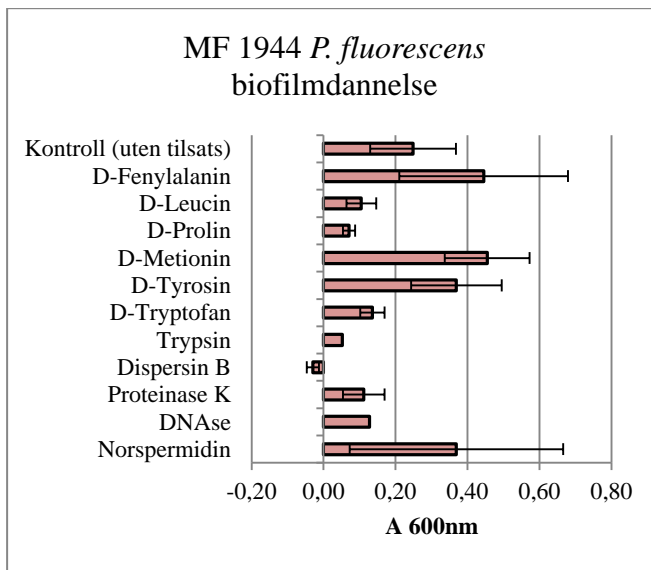
Vedlegg 1: Målinger A 600nm mikrotiterbrett

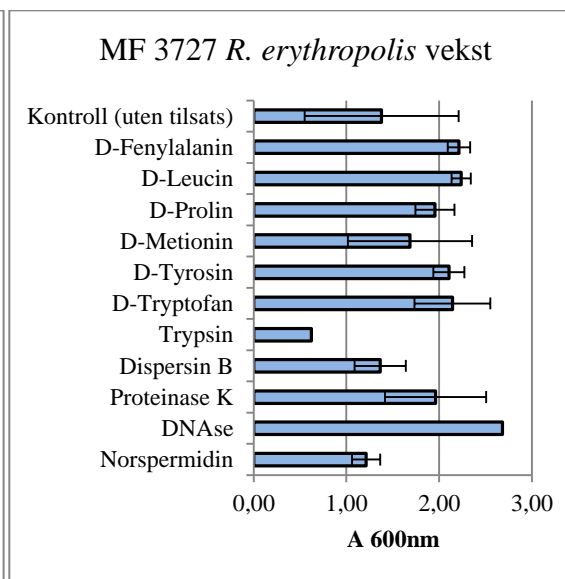
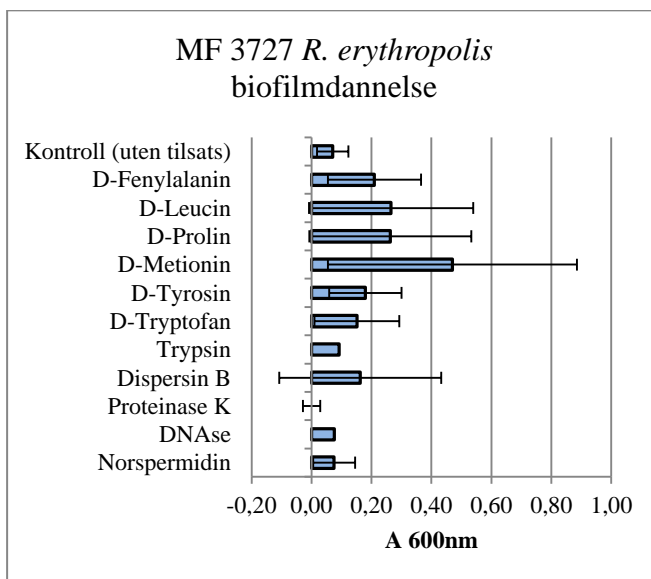
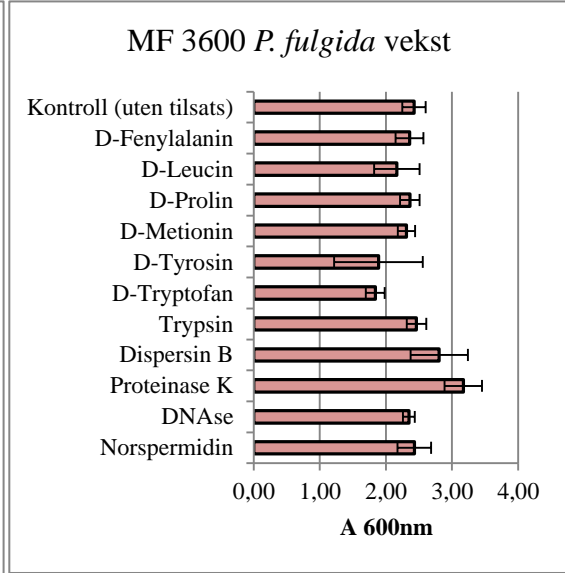
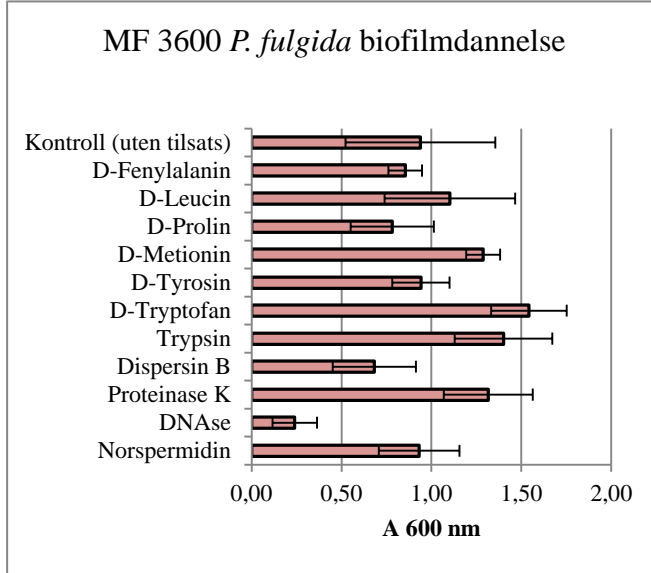
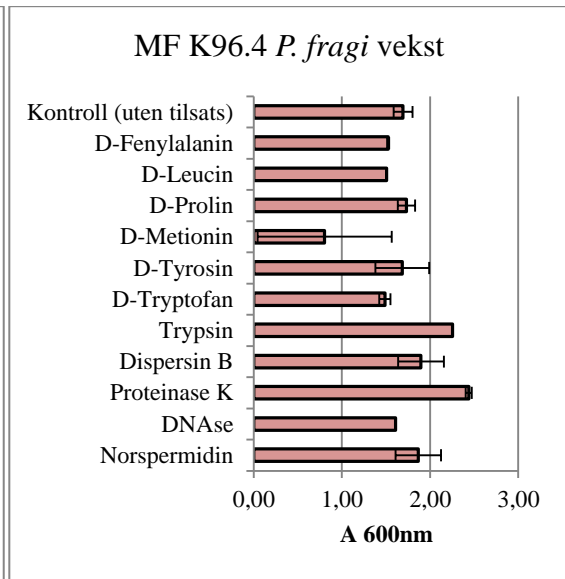
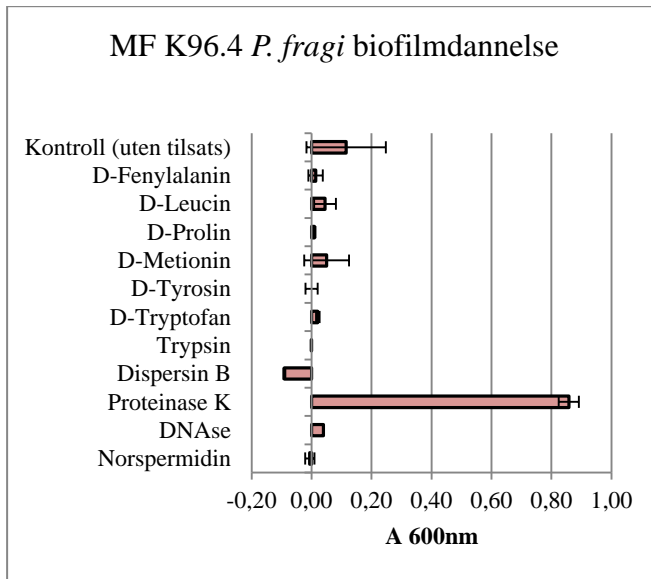
Vedlegg 2: Statistiske beregninger

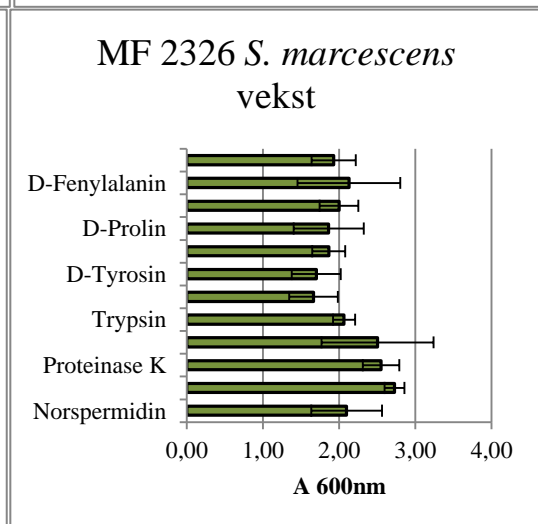
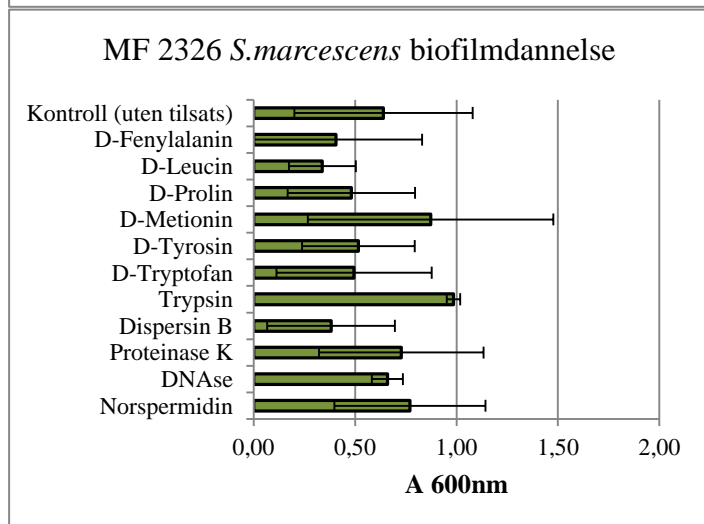
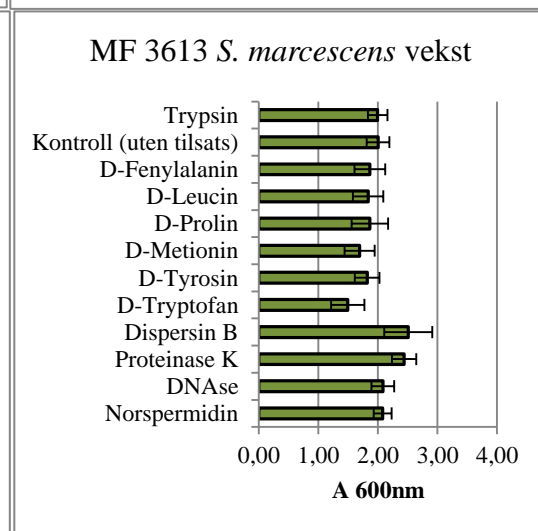
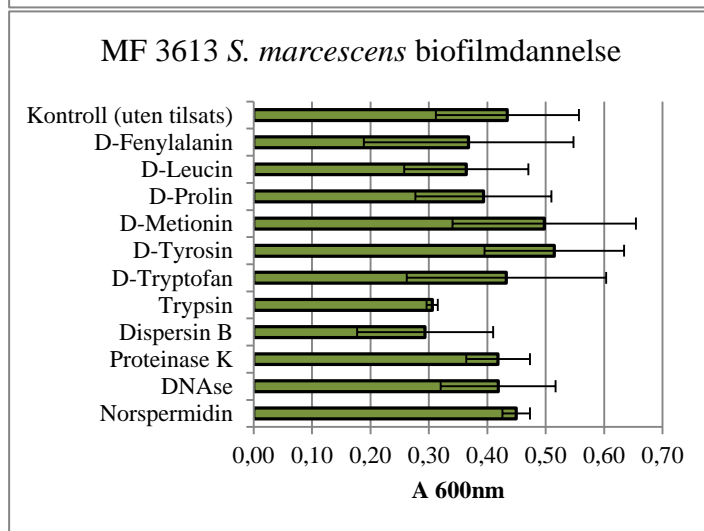
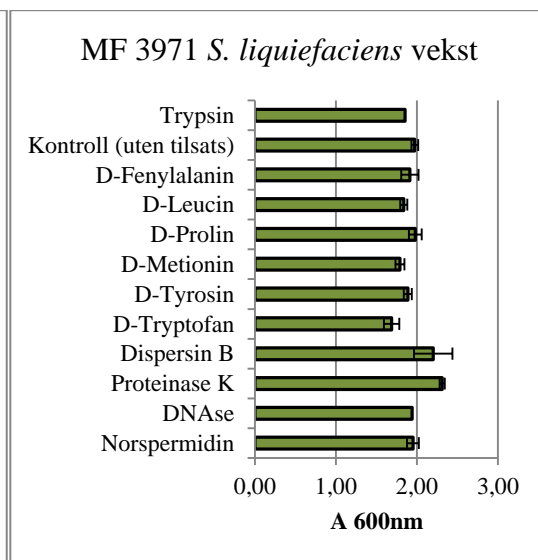
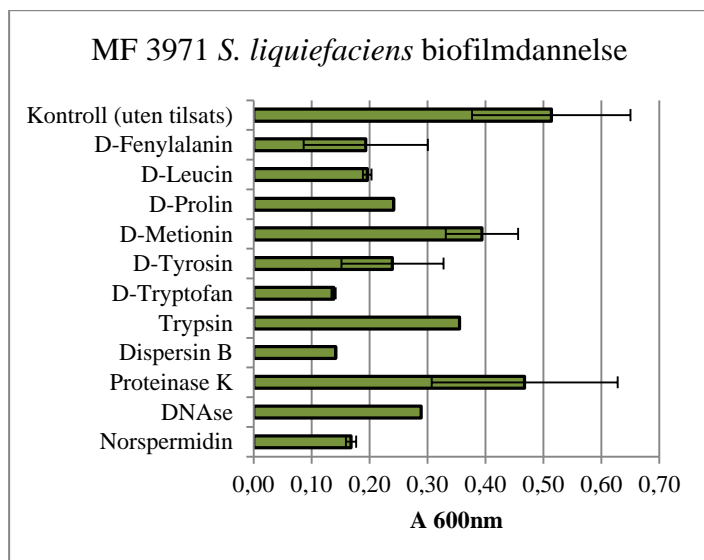


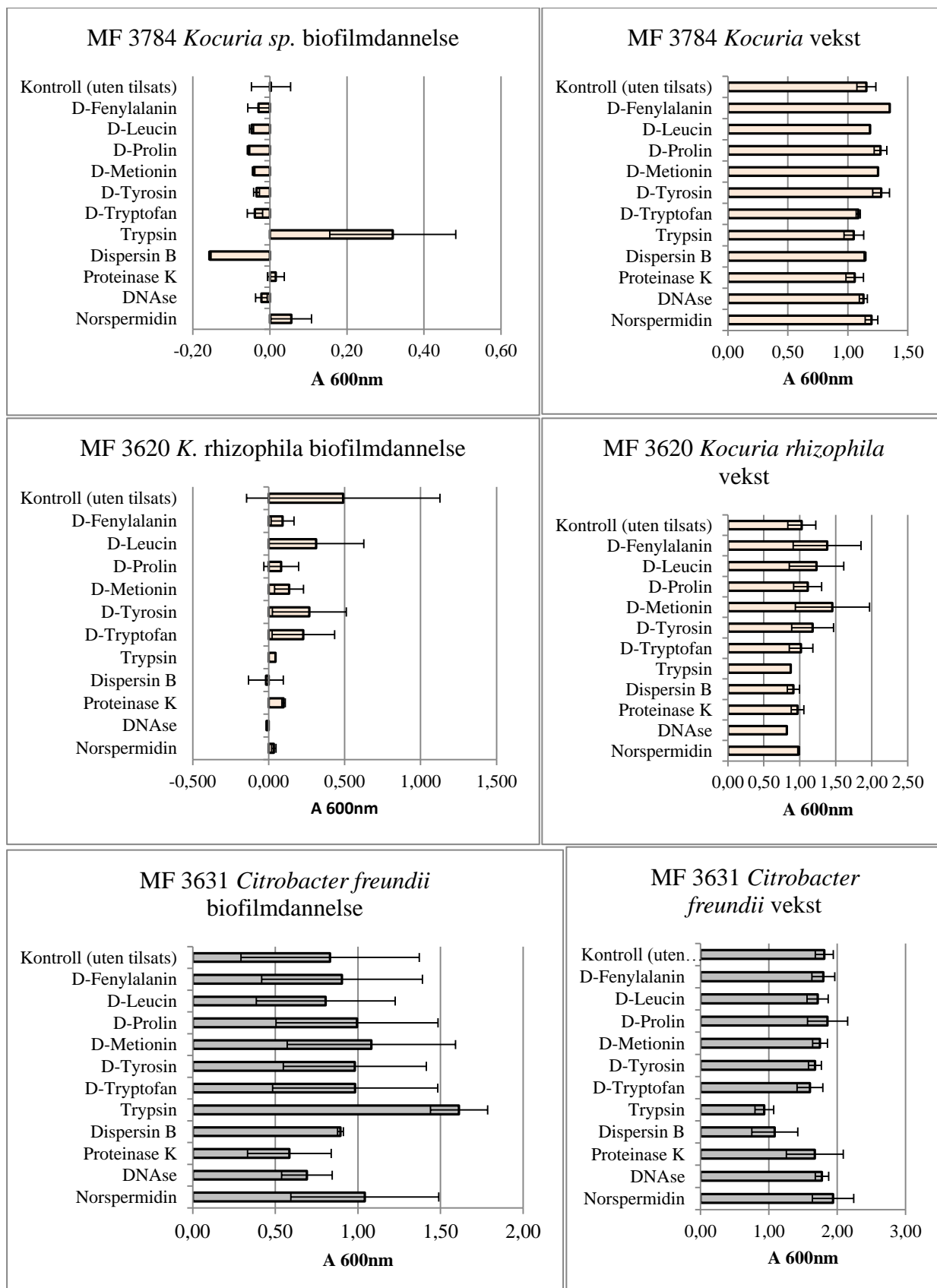


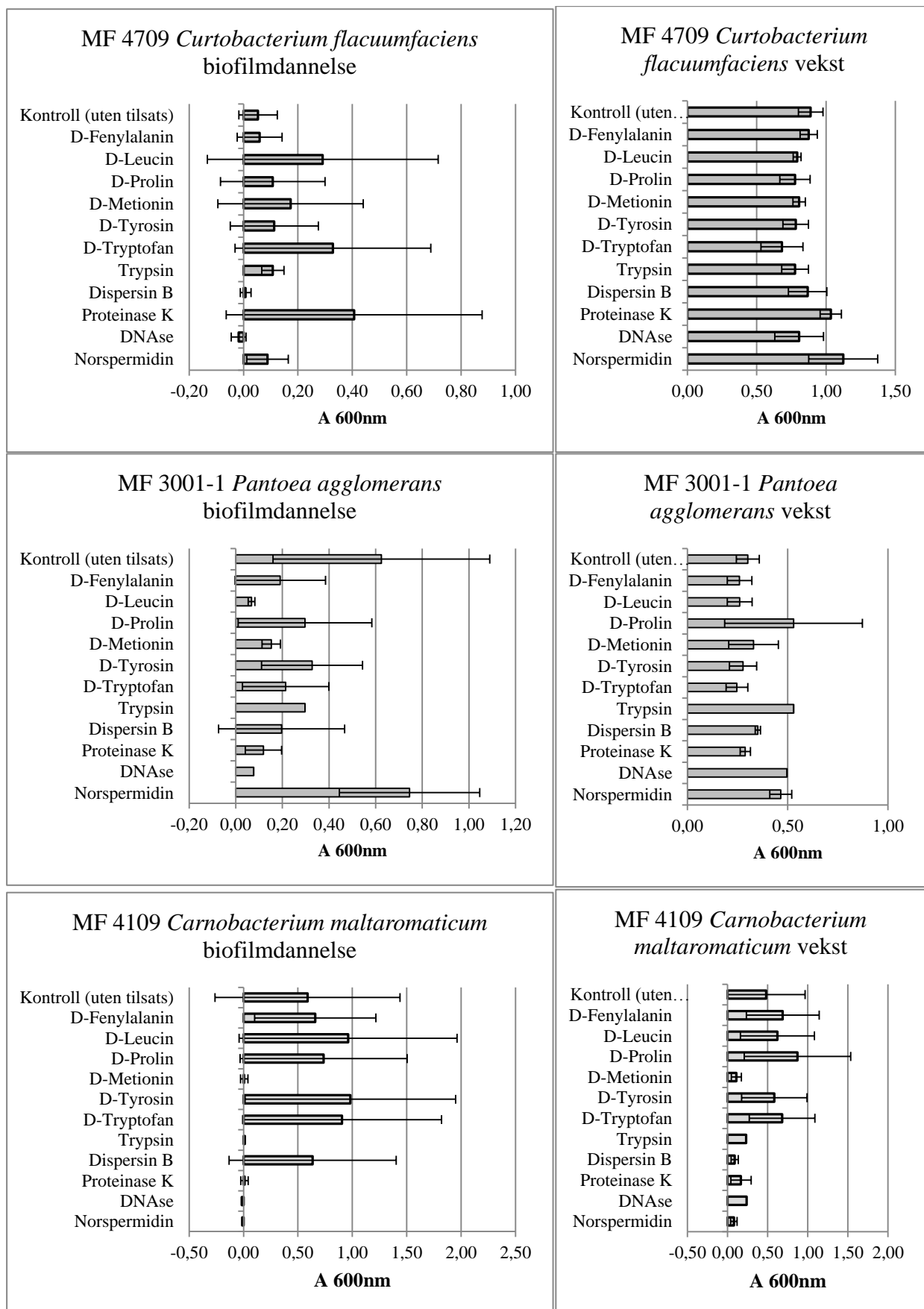












Paired T-Test and CI: Dag 2; Dag 14

Paired T for Dag 2 - Dag 14

	N	Mean	StDev	SE Mean
Dag 2	41	0,206	0,344	0,054
Dag 14	41	1,105	1,160	0,181
Difference	41	-0,898	1,188	0,185

95% CI for mean difference: (-1,273; -0,523)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4,84 P-Value = 0,000

MF 4104 P. glacincola Proteinase: Two-Sample T-Test and CI: Kontroll4104; ProtK 4104

Two-sample T for Kontroll4104 vs ProtK 4104

	N	Mean	StDev	SE Mean
Kontroll4104	4	0.2131	0.0942	0.047
ProtK 4104	3	0.0288	0.0143	0.0083

Difference = mu (Kontroll4104) - mu (ProtK 4104)

Estimate for difference: 0.1843

95% CI for difference: (0.0320; 0.3365)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 3.85 P-Value = 0.031 DF = 3

Pseudomonas

Stammer med biofilm >0.2 - test om effekt av DNase og dispersin B (redigert måtte ta bort en stamme pga den brukte data frå biofilmdannelse over 10 dager)

Paired T-Test and CI: Kontroll; Dnase

Paired T for Kontroll - Dnase

	N	Mean	StDev	SE Mean
Kontroll	5	1,199	0,750	0,335
Dnase	5	0,186	0,102	0,046
Difference	5	1,013	0,696	0,311

95% CI for mean difference: (0,149; 1,878)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 3,25 P-Value = 0,031

Paired T-Test and CI: Kontroll; Disp b

Paired T for Kontroll - Disp b

	N	Mean	StDev	SE Mean
Kontroll	5	1,199	0,750	0,335
Disp b	5	0,813	0,596	0,266
Difference	5	0,3862	0,1765	0,0790

95% CI for mean difference: (0,1670; 0,6054)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 4,89 P-Value = 0,008

Results for: Serratia

Alle fem stammene – bruker snittverdier for hver stamme

Paired T-Test and CI: Biofilm_Dispersin B; Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

Paired T for Biofilm_Dispersin B - Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

	N	Mean	StDev	SE Mean
Biofilm_Dispersin B	5	0,2251	0,1140	0,0510
Biofilm_Kontroll (uten t	5	0,4677	0,1354	0,0605
Difference	5	-0,2426	0,0925	0,0413

95% CI for mean difference: (-0,3574; -0,1278)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -5,87 P-Value = 0,004

MTB > Paired 'Biofilm_DNAse' 'Biofilm_Kontroll (uten tilsats)'.
(Note: The original text contains a typo 'DNAse' which has been corrected to 'DNAse' in the transcription.)**Paired T-Test and CI: Biofilm_D-Leucine; Biofilm_Kontroll (uten tilsats)**

Paired T for Biofilm_D-Leucine - Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

	N	Mean	StDev	SE Mean
Biofilm_D-Leucine	5	0,2645	0,0966	0,0432
Biofilm_Kontroll (uten t	5	0,4677	0,1354	0,0605
Difference	5	-0,2032	0,1066	0,0477

95% CI for mean difference: (-0.3356; -0.0708)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -4.26 P-Value = 0.013

MTB > Paired 'Biofilm_D-Fenylalanin' 'Biofilm_Kontroll (uten tilsats)'

Paired T-Test and CI: Biofilm_D-Fenylalanin; Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

Paired T for Biofilm_D-Fenylalanin - Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

	N	Mean	StDev	SE Mean
Biofilm_D-Fenylalanin	5	0.2752	0.1052	0.0470
Biofilm_Kontroll (uten t	5	0.4677	0.1354	0.0605
Difference	5	-0.1925	0.1097	0.0491

95% CI for mean difference: (-0.3288; -0.0563)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -3.92 P-Value = 0.017

MTB > Paired 'Biofilm_D-Metionin' 'Biofilm_Kontroll (uten tilsats)'

Paired T-Test and CI: Biofilm_D-Proline; Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

Paired T for Biofilm_D-Proline - Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

	N	Mean	StDev	SE Mean
Biofilm_D-Proline	5	0.3251	0.1140	0.0510
Biofilm_Kontroll (uten t	5	0.4677	0.1354	0.0605
Difference	5	-0.1426	0.0925	0.0413

95% CI for mean difference: (-0.2574; -0.0278)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -3.45 P-Value = 0.026

MTB > Paired 'Biofilm_D-Trypsin' 'Biofilm_Kontroll (uten tilsats)'

Paired T-Test and CI: Biofilm_Dispersin B; Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

Paired T for Biofilm_Dispersin B - Biofilm_Kontroll (uten tilsats)

	N	Mean	StDev	SE Mean
Biofilm_Dispersin B	5	0.2251	0.1140	0.0510
Biofilm_Kontroll (uten t	5	0.4677	0.1354	0.0605
Difference	5	-0.2426	0.0925	0.0413

95% CI for mean difference: (-0.3574; -0.1278)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -5.87 P-Value = 0.004

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
Kontroll vs DNase

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0,33525	0,668521505
Variance	0,2069522	0,635408076
Observations	31	31
Hypothesized Mean Difference	0	
df	48	
t Stat	-2,021762286	
P(T<=t) one-tail	0,024397332	
t Critical one-tail	1,677224196	
P(T<=t) two-tail	0,048794664	
t Critical two-tail	2,010634758	