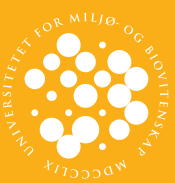


UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



FORORD

Denne masteroppgaven markerer slutten på mastergradsstudiet i Matvitenskap, retning matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap UMB. Arbeidet med masteroppgaven har vært faglig utfordrende, men også svært interessant. Arbeidet med masteroppgaven har i sin helhet blitt utført ved Nofima, Ås.

Gjennom hele prosessen har jeg følt meg godt ivaretatt som masterstudent. Jeg vil rette stor takk til begge veiledere ved Nofima; hovedveileder Even Heir og biveileder Solveig Langsrud. Takk for konstruktive innspill og god oppfølging!

Jeg svært takknemlig for all hjelp vedrørende praktisk veiledning i arbeidet. Jeg er retter derfor stor takk til Anette Wold Åsli, Merete Rusås Jensen, Tove Maugesten og Signe Marie Drømtoorp, samt øvrige ved avdelingen for mikrobiologi.

Jeg vil ellers takke Trond Møretrø og Birgitte Moen for gode innspill underveis i prosessen.

Takk også til hovedveileder ved UMB, Hilde Marit Østlie, for oppfølging underveis i arbeidet.

En stor takk går også til mine venner og familie for støtte, oppmuntring og avkobling.

Ås, 14. mai 2013

Andreas Lorentzen Simensen

SAMMENDRAG

Innsjeningen med oppgaven var å undersøke hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg og overlever på overflater under betingelser som er relevante for matindustriprosesser. Det ble undersøkt hvordan andre bakterier fra matproduksjonsmiljøer påvirker etablering, vekst og biofilmdannelse av *L. monocytogenes* på overflater over tid (dynamikkstudier). Det ble inkludert isolater fra *Listeria* og fra andre slekter ment å representere den naturlige bakgrunnsflora i et matproduksjonsmiljø.

Innledningsvis ble det karakterisert en rekke stammer innen slekten *Listeria* med det formål å kunne velge ut stammer til bruk i videre studier av biofilmdannelse og bakteriedynamikk. Utvalget av stammer ble basert på at disse lot seg differensiere ved bruk av dyrkningsbaserte eller molekylærbiologiske teknikker (sekvens- og molekylær serotyping).

Det ble valgt ut isolater av *L. monocytogenes* fra laks- og fra kjøttindustri. De fleste isolert etter vask og desinfeksjon. Disse hadde ulik genetisk fingerprintprofil og sekvenstypingen viste at de hadde sekvensvariasjoner i utvalgte husholdningsgener og – dermed differensieres i dynamikkstudier. Det ble valgt ut andre *Listeria* fra de samme prosessanleggene, disse lot seg skille ved dyrkningsbaserte teknikker. Det ble også inkludert bakteriestammer for å representere bakgrunnsflora alle isolert etter vask og desinfeksjon i ulike lakseprosesseringsanlegg.

Fire ulike bakteriekulturer som bestod av blandinger av definerte bakterier i to ulike vekstmedier ble inkludert i studier av biofilm. Mediene var ment å simulere næringsbetingelser i henholdsvis laks- og kjøttindustri. Biofilmdannelsen ble utført på kuponger av stål (AISI 304), som er et mye brukt materiale i næringsmiddelindustrien. Her ble det undersøkt hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg og vokser på overflater sammen med andre *Listeria*, med stammer fra bakgrunnsfloraen eller i en mer kompleks multikultur.

I dynamikkstudiene ble det undersøkt hvordan ulike stammer av *L. monocytogenes* konkurrerte med hverandre over tid. Denne konkurransen ble undersøkt der *L. monocytogenes* forelå i miks, og der de konkurrerte i en mer divers multikultur. Sekvenstyping ble brukt for å skille isolatene. Bakteriesammensetningen i multikulturbiofilmer ved forsøksstart og etter 9 dagers biofilmdannelse ble bestemt ved 16S rDNA sekvensanalyser.

Bakteriene inkludert for å representere bakgrunnsflora hemmet vekst av *L. monocytogenes* på stålkupong i begge de undersøkte mediene. Hemmingen bestod i å holde antall *L.*

monocytogenes nede, og således undertrykke biofilmdannelse over tid. Hemmingen var ikke avhengig av vekstmedium. Andre *Listeria*-arter hadde ingen tydelig påvirkning på *L. monocytogenes* vekst i biofilm. Det ble ikke funnet eksempler på bakterier som fremmet vekst av *L. monocytogenes*. At de tre gjentakene med den diverse multikulturen over tid resulterte i tilsvarende bakteriesammensetning i biofilm over tid, indikerte at *Pseudomonas* hadde evne til å utkonkurrere *Listeria*, *Serratia*, *Acinetobacter* og *Stenotrophomonas* der disse forelå i multikultur.

Enkelte isolater av *L. monocytogenes* hadde bedre evne til å delta i biofilm enn andre. Det ble observert at enkelte *L. monocytogenes* isolater dominerte i laksemedium, men ikke i BHI og vice versa. Dette indikerer at bestemte *L. monocytogenes* isolater har optimalisert vekst i visse miljøer.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to study how *L. monocytogenes* establishes and survives on surfaces, under conditions imitating food industry. It was investigated how other *Listeria* species and the bacterial diversity occurring in the food industry affect the growth and survival of *L. monocytogenes* in biofilms.

In the first part of this study, a number of strains within the genus *Listeria* were characterized with the aim to obtain a selection of specific strains that could be differentiated by either culture techniques or molecular subtyping techniques (molecular serotyping or sequence typing). Such strains could be included in further studies of biofilm formation, development and bacterial dynamics.

The selected *L. monocytogenes* strains were originally isolated from salmon – and meat processing plants. The majority was isolated after cleaning and disinfection. By differing in genetic fingerprint profile and showing variations within a specific housekeeping gene by sequence typing, they could be differentiated in studies of biofilm development over time. Strains of other *Listeria*-species were chosen from the same food processing plants and these were differentiated by culture techniques. To represent the naturally occurring flora, strains from several genera were included. These had previously been isolated from two different salmon processing environments after cleaning and disinfection.

The biofilm development was conducted on coupons of stainless steel (AISI 304), a material frequently used in food processing environments. Four different bacterial cultures containing mixtures of specific bacteria were applied in order to study how *L. monocytogenes* in biofilms was affected by other *Listeria* and the naturally occurring bacterial flora. Two different growth mediums were used; one based on salmon and one being standard medium based on meat ingredients, to imitate fish- and meat industry respectively.

The survival of different *L. monocytogenes* strains in biofilms was investigated over time. This competition amongst different strains was studied when *L. monocytogenes* grew in mix and with a more diverse flora. Sequence typing was used to differentiate the strains. The bacterial composition was determined at start of the experiments and after 9 days biofilm formation using 16S rDNA sequence analysis.

Bacteria representing the naturally occurring flora suppressed growth of *L. monocytogenes* on stainless steel in both the examined media. This effect was primarily due to the Gram negative

bacteria and could not be attributed to other *Listeria*. Examples of bacteria able to stimulate *L. monocytogenes* were not observed.

The equivalent development of bacterial composition in biofilms over time indicated that *Pseudomonas* had better survival than *Listeria*, *Serratia*, *Acinetobacter* and *Stenotrophomonas* when present in multiculture biofilms.

Some *L. monocytogenes* strains showed better fitness in biofilms than others. Some were able to compete in just one medium, but not both. These findings indicate that certain *L. monocytogenes* strains have the ability to adapt to certain environments, and not to others.

INNHOLD

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	IV
1. INNLEDNING	1
2. TEORI	2
2.1 Uønskede bakterier i relasjon til mat	2
2.1.1 Produksjonsmiljøets betydning	4
2.2 Slekten <i>Listeria</i>	5
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.3.1 Virulens	7
2.3.2 Listeriose	8
2.3.3 Hygieneregelverket og <i>Listeria</i>	8
2.3.4 Karakterisering av <i>L. monocytogenes</i>	9
2.3.5 Lakseprosessering	12
2.3.6 Kjøttprosessering	12
2.4 Bakgrunnsflora	13
2.5 Generell beskrivelse av biofilm	14
2.5.1 Betingelser for <i>L. monocytogenes</i> feste til overflater	17
2.5.2 <i>L. monocytogenes</i> - vekst på overflater	18
2.5.3 <i>L. monocytogenes</i> - konkurranse med andre bakterier i biofilm	19
3. MATERIALER OG METODER	20
3.1 Utvelgelse av <i>L. monocytogenes</i> isolater	20
3.1.1 Utvelgelse av isolater fra bakgrunnsflora	22
3.1.2 Tillagning av frysekultur	23
3.2 Tillagning og uttesting av medier	23
3.2.1 Medium basert på laks	23
3.2.2 Laksemedium - egnethet som vekstmedium	24
3.2.3 Identifisering av <i>Listeria</i> på selektivt medium	24
3.2.4 Vekstforsøk i BHI og laksemedium	24
3.2 Sekvenstyping	25
3.2.1 PCR	25
3.2.2 Gelelektroforese	26
3.2.3 Pre-sekvensering	27
3.2.4 Sekvensering	27
3.2.5 Bearbeiding av sekvensdata	28

3.3 Serotyping ved hjelp av Multiplex PCR.....	29
3.3.1 Gelelektroforese.....	30
3.4 16S rDNA sekvensering	31
3.4.1 PCR.....	31
3.4.2 Gelelektroforese.....	32
3.4.3 Pre-Sekvensering.....	32
3.4.4 Sekvensering.....	32
3.4.5 Bearbeiding av sekvensdata	32
3.5 Direkte sekvensering	33
3.5.1 Isolering av DNA	33
3.5.2 PCR.....	34
3.5.3 Sekvenserings-PCR	35
3.5.4 Statistisk tilnærming for å bestemme bakteriell konsentrasjonsprofil.....	36
3.6 Innledende Biofilmforsøk	37
3.6.1 Tillagning av bakterieblandinger	37
3.6.2 Bestemmelse av veksthastighet ved Bioscreen.....	37
3.6.3 Initiell festing til stålkupong	38
3.6.4 Bestemmelse av vekst i suspensjon og biofilmdannelse ved døgn 2,5 og 9.....	38
3.6.5 <i>L. monocytogenes</i> i miks.....	39
3.6.6 Listeriamiks.....	39
3.7 Biofilm hovedforsøk	40
3.7.1 <i>L. monocytogenes</i> i miks.....	41
3.7.2 Listeriamiks.....	41
3.7.3 <i>G - miks</i>	42
3.7.4 Multikultur.....	42
3.7.5 Identifisering av <i>L. monocytogenes</i> ved hjelp av sekvenstyping.....	42
3.7.6 Identifisering av bakteriesammensetning i biofilm ved 16S rDNA sekvensering	43
3.7.7 Direktesekvensering	43
3.7.8 Flourescence Mikroskopering	43
4. RESULTATER	44
4.1 Uttesting av medier	44
4.1.1 Vekst i laksemedium.....	44
4.1.2 Visuell differensiering av <i>Listeria</i>	44
4.1.3 Vekstforsøk i laksemedium og BHI	44
4.2 Sekvens- og serotyping av <i>L. monocytogenes</i>	45
4.2.1 Sekvenstyping.....	45
4.2.2 Serotyping.....	47
4.3 Forforsøk – biofilm	49

4.3.1 <i>L. monocytogenes</i> i miks.....	50
4.3.2 <i>L. monocytogenes</i> i miks og Listeriamiks.....	51
4.4 Biofilm hovedforsøk	52
4.4.1 Vekst av <i>L. monocytogenes</i> i miks - og multikultur	53
4.4.2 Vekst av <i>L. monocytogenes</i> i konkurranse med <i>L. spp</i>	55
4.4.3 Vekst av <i>L. monocytogenes</i> i konkurranse med Gram negative.....	56
4.4.4 Hemming av <i>L. monocytogenes</i> i biofilm	57
4.5 Dynamikk i biofilm og suspensjon	58
4.5.1 Baktoriesammensetning i multikultur	61
4.5.2 Initielt feste til stålkupong og veksthastighet i suspensjon.....	64
5. DISKUSJON.....	66
5.1 Typing av <i>L. monocytogenes</i>	67
5.2 Forforsøk biofilm	68
5.3 Biofilm hovedforsøk	70
5.3.1 Vekst av <i>L. monocytogenes</i> i miks- og multikultur	70
5.3.2 Vekst av <i>L. monocytogenes</i> i konkurranse med <i>L. spp</i>	72
5.3.3 Vekst av <i>L. monocytogenes</i> i konkurranse med Gram negative.....	73
5.3.4 Dynamikkstudier av <i>L. monocytogenes</i> i miks	74
5.3.5 Dynamikkstudier av <i>L. monocytogenes</i> i multikultur	75
7. KONKLUSJON	77
8. VIDERE ARBEID	78
9. REFERANSER	79
10. VEDLEGG.....	84
Vedlegg 1 - Vekst i suspensjon, laksemedium og BHI	84
Vedlegg 2 - Medier og løsninger	85

1. INNLEDNING

Listeria er en bakterieslekt som består av en rekke arter, men den eneste som gir sykdom hos mennesker er *L. monocytogenes*. *Listeria* har evne til å etablere seg i matproduksjonsmiljøer og gi opphav til såkalte hus-stammer eller persistente stammer. Slike husstammer kan overleve i årevis i matproduksjonsmiljøer med biofilmdannelse som en mulig overlevelsesstrategi. Kunnskap om hvorfor *Listeria* har evne til å overleve i matproduksjonsmiljø er mangelfull. Ny kunnskap er derfor nødvendig for å forstå hvordan *Listeria* overlever matproduksjonsmiljøer, og hvordan vekst og overlevelse påvirkes av andre bakterier. Dette kan bidra til økt kontroll med *Listeria* i matproduksjonsmiljøer.

Listeria er blant de største mikrobiologiske utfordringene for deler av norsk matvareindustri, inkludert både lakseindustrien og kjøttindustrien. Flere land som importerer norske produkter opererer med nulltoleranse for *L. monocytogenes*. De økonomiske konsekvensene ved tilbakekalling, tapt markedsadgang og økte kontrolltiltak er store. Svinn fra matvareindustrien bidrar ikke bare til økonomiske tap for den enkelte bedrift, men har også betydelig miljørelevans. Nofima har flere pågående prosjekter knyttet til å oppnå økt kontroll med *Listeria* i norsk matproduksjon. Dette inkluderer prosjekter både mot laksenæring og kjøttindustri.

Intensjonen med oppgaven var å undersøke hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg og overlever på overflater under betingelser som er relevante for matindustriprosesser. Det ble undersøkt hvordan andre bakterier fra matproduksjonsmiljøer påvirker etablering, vekst og biofilmdannelse av *L. monocytogenes* på overflater over tid (dynamikkstudier). Det ble inkludert isolater fra *Listeria* og fra andre slekter ment å representere den naturlige bakgrunnsflora i et matproduksjonsmiljø.

Opgaven er relatert til de pågående prosjektene "Tiltak for økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen" og "Kontroll av *Listeria monocytogenes* ved produksjon av animalske produkter".

2. TEORI

2.1 Uønskede bakterier i relasjon til mat

Sammensetningen av den mikrobielle flora som koloniserer et bestemt næringsmiddel vil være avhengig av hvilke mikroorganismer som introduseres og hvordan de vokser og påvirker hverandre i næringsmiddelet over tid (Adams, 2008). Floraens vekst og sammensetning styres av indre parametere slik som vannaktivitet, pH, redokspotensial samt ytre parametere slik som lagringstemperatur, luftfuktighet og omsluttende atmosfære. I tillegg til fysiske og kjemiske parametere i den videre bearbeidingen (intVeld, 1996). Mikroorganismenes egenskaper, ofte kalt implisitte faktorer er viktige for å forstå deres vekst og overlevelse i et næringsmiddel. Slike kan være veksthastighet, optimumstemperatur og krav til næringstilgang (Adams, 2008).

Grovt sett kan mikroorganismer gi opphav til to hovedtyper uønskede manifestasjoner i et næringsmiddel; forringelse og matbåren sykdom. Jos og Veld (1996) deler bakterielle forringere i fire hovedtyper; Gram negative stavformede bakterier, Gram positive sporedannende bakterier, melkesyrebakterier, andre Gram positive bakterier.

Det er vanlig å dele næringsmiddelbårne sykdommer som skyldes bakterier inn i to hovedgrupper; infeksjoner og intoksikasjoner. På bakgrunn av hvordan den bestemte bakterien påvirker verten, eller sykdomsmekanismer deles bakterielle sykdommer inn i fem hovedgrupper (tabell 1) (Granum, 2011).

Det endemiske nivå av næringsmiddelbårne infeksjoner er lavt. Dette henger sammen med en lav forekomst av smitte i norske husdyr og norskproduserte næringsmidler (Granum, 2011). Campylobacteriose er den vanligste årsaken til diaré sykdom i Norge. I 2011 ble det meldt 3005 tilfeller der 39 % ble smittet i Norge (Folkehelseinstituttet, 2012b). Salmonellose er nummer to med 1290 meldte tilfeller, 24 % ble smittet i Norge 2011. Shigellose er nummer tre med 163 tilfeller i 2011 (40 % smittet i Norge). Yersinose er nummer fire med 60 tilfeller i 2011 (55 % smittet i Norge) (Folkehelseinstituttet, 2012b).

Tabell 1 Næringsmiddelbårne sykdommer forårsaket av bakterier, modifisert etter (Granum, 2011).

De fem hovedgrupper næringsmiddelbårne sykdommer forårsaket av bakterier	Agens
Bakterielle intoksikasjoner forårsaket av preformerte toksiner i mat	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> og <i>Clostridium botulinum</i>
Bakterielle infeksjoner hvor enterotoksiner produseres i tarmhulen, normalt uten epiteladheranse	<i>Bacillus cereus</i> (diarétypen) og <i>Clostridium perfringens</i>
Bakterielle infeksjoner med epiteladheranse og enterotoksinproduksjon	<i>Eschericia coli</i> ETEC, <i>E. coli</i> STEC og <i>Vibrio cholerae</i>
Invasive bakterielle tarminfeksjoner	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Eschericia coli</i> EIEC, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> .
Systemiske bakterielle infeksjoner	<i>Listeria monocytogenes</i>

Etter at listeriose ble meldingspliktig i MSIS i 1991 er det beskrevet tre utbrudd av listeriose (Folkehelseinstituttet, 2012a). I det nasjonale utbruddet i 2007 ble 19 pasienter ved Rikshospitalet smittet. Fem personer døde. Smittekilden var en økologisk camembert produsert ved et gårdsmeieri i Nord-Trøndelag. I 2005 ble tre personer smittet ved et sykehus i Ålesund, smittekilden ble vist å være en påleggskutter på kjøkkenet. I 1992 ble det varslet åtte tilfeller av listeriose, kilden ble vist å være varmebehandlet, vakuumpakket kjøttpålegg. Selv om antall smittede er lavt (21 personer i 2011) er andelen som smittes innenlands høy (Folkehelseinstituttet, 2012b).

I deler av matvareindustrien regnes *L. monocytogenes* som den største problembakterien, evnen til å vokse ved kjøleskapstemperaturer har ført til et strengt regelverk. Som igjen bidrar til store kostnader knyttet til bekjempelse, og ikke minst tilbakekalling av produkter. Bare i løpet av inneværende år har det vært flere eksempler på tilbakekalling av norske produkter grunnet *Listeria* (NRK, 2013, Aftenposten, 2013). Kasting av mat bidrar ikke bare til økonomiske tap for den enkelte bedrift, men har også betydelig miljørelevans.

2.1.1 Produksjonsmiljøets betydning

For å kunne produsere næringsmidler med tilfredsstillende hygienisk kvalitet er tilvirker avhengig av å ha kontroll med hvilke mikroorganismer som er tilstede i produktet. Uønskede mikroorganismer kan komme inn i bedriften med råvarer, personell, utstyr, og skadedyr. Dersom disse finner nisjer i miljøet der de kan vokse og etablere seg vil det kunne oppstå fare for rekontaminasjon. En rekke overflater på produksjonsutstyr kan fungere som nisjer slik som transportbånd, valser, overganger mellom tettsittende materialer, slitte eller krakelerte pakninger og ventiler (Tompkin, 2002). Ettersom *L. monocytogenes* blir inaktivert ved varmehandling, er det først og fremst rekontaminasjon som foregår senere i prosessen som er bekymringsverdig.

For å ha kontroll med *L. monocytogenes* bør det rettes tiltak mot organismens spesifikke egenskaper. Luber et al. (2011) listet opp de tre viktigste egenskapene til *L. monocytogenes* med tanke på matvaretrygghet; evnen til å vokse ved lave temperaturer i fuktig industrimiljø, den vide utbredelsen i naturen som gjør at den lett kan introduseres i produksjonsmiljøet og evnen til å føre til listeriose (Luber et al., 2011)

L. monocytogenes kan etablere seg i matproduksjonsmiljøet og være en del av den residente mikrobielle flora i måneder eller år (Tompkin, 2002, Vogel et al., 2001, Møretre & Langsrud, 2004). Den generelle mikroflora som eksisterer i ulike produksjonsmiljøer kan påvirke *L. monocytogenes* evne til vekst på overflater (Carpentier & Cerf, 2011). Tilstedeværelsen av stammer som er gunstige for *L. mono* etablering og vekst bør være bekymringsverdige ut ifra et matvaretrygghetsperspektiv. Fokuset har gjerne vært på bestemte patogener i industrien slik som *L. monocytogenes*, *Pseudomonas* spp. eller *E. coli* (Bagge-Ravn et al., 2003). Hvordan den generelle mikroflora fra matproduksjonsmiljøet påvirker *L. monocytogenes* etablering og vekst på overflater er et mindre utforsket tema.

2.2 Slekten *Listeria*

Slekten *Listeria* består av en åtte arter; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* og to nyrapporterte; *L. marthii* (Graves et al., 2010) og *L. rocourtiae* (Leclercq et al., 2010). Både *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* er patogene for pattedyr, mens de resterende er apatogene. *L. ivanovii* med subspecies *ivanovii* og *londoniensis*, er mest forbundet med sykdom hos småfe (Orsi et al., 2011).

Listeria er en ikke sporedannende, Gram positive, fakultative anaerobe, bevegelige, stavbakterier. Artene innenfor slekten *Listeria* er katalase-positive, oksidase negative, og fermenterer glukose. Det er en rekke egenskaper som skiller arten innen slekten *Listeria*. Det være seg evne til fermentering av mannitol, D-arabitol, D-xylose, rhamnose, methyl- α -D-glukosid, ribose, glukose-1-fosfat og D-tagatose eller ulik hemolytisk aktivitet (Leclercq et al., 2010).

Kulturbaserte teknikker kan brukes for å skille mellom *Listeria* arter. RAPID`L .mono er et kromogent *Listeria* selektivt medium (Jadhav et al., 2012). Ved å benytte seg av at det kun er *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* som har fosfatidylinositol fosfolipase C (PIPLC) aktivitet, kan disse to artene skilles fra resten av slekten (Lauer et al., 2005). Mens *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* opptrer som blåsvarte kolonier på agaren er de resterende arter hvite kolonier. For å skille mellom *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* tilsettes xylose til mediet. Fordi *L. monocytogenes* ikke kan fermentere xylose dannes det blåsvarte kolonier, mens *L. ivanovii* danner blåsvarte gult omsluttete kolonier (Lauer et al., 2005).

2.3 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes er Gram positiv, fakultativ anaerob, katalase positiv, oksidase negativ, ikke sporulerende. Opptrer som kokkoide staver med størrelse 0,4-0,5 µm x 0,5-2,0 µm (Adams, 2008). Bakterien er ubikvitær og isoleres fra en rekke kilder i naturen inkludert jord, kloakk og vegetasjon i forråtnelse (Orsi et al., 2011).

På bakgrunn av evolusjonær avstand kan *L. monocytogenes* deles inn i fire linjer (I, II, III og IV) (Orsi et al., 2011). Linje I har serovariantene 1/2b, 3b, 3c, og 4b. Linje II har serovariantene 1/2a, 1/2c og 3a. De vanligste serovariantene assosiert med human listeriose er 1/2a (linje II), 1/2b og 4b (linje I). Linje III (4a og 4c) og IV er stort sett isolert fra dyr. Minst 95 % av stammene som isoleres fra pasienter eller mat er 1/2a, 1/2b, 1/2c og 4b (Doumith et al., 2004a). Fordi ulike serovarianter ofte assosieres med vidt forskjellige nisjer i utemiljøet (Lyautey et al., 2007), så vel som produksjonsmiljø kan informasjon om serovariant bidra i en eventuell utbruddsopklaring.

Konvensjonell serotyping baserer seg på klumping (agglutination) av somatiske (O) og flagella (H) antigener med ulike antisera. Ulemper med konvensjonell serotyping er at det er dyrt å fremskaffe antisera, i tillegg trengs det mye erfaring for å oppdage agglutineringsreaksjonen (Jadhav et al., 2012). I dag brukes gjerne teknikker med høyere oppløsning, noen av disse beskrives i pkt. 2.3.5.

Optimumstemperatur for vekst er mellom 30 og 35 °C (Adams, 2008), men bakterien har evne til vekst i et bredt temperaturområde (2-45°C) (Gandhi & Chikindas, 2007). Det er først og fremst evnen til å vokse ved kjøleskapstemperatur (2-4 °C) som er problematisk. *L. monocytogenes* er en av de få patogene som kan vokse med en vannaktivitet (a_w) under 0,93 (Farber et al., 1992).

For å kunne opprettholde vekst ved lave temperaturer er *L. monocytogenes* avhengig av å endre fettsyresammensetningen i membranen slik at denne kan fungere optimalt. Dette skjer først og fremst ved å øke forholdet C_{15:0}/C_{17:0}. (Mastronicolis et al., 2006). Det skjer endringer i genuttrykk og en del proteiner blir syntetisert som følge av skiftene ytre betingelser, slik som kuldesjokkproteiner (Csps) (Ko et al., 1994).

L. monocytogenes har ulike måter å overleve syrestress, det være seg induksjon av bestemte proteiner og mekanismer for å opprettholde homeostase (Gandhi & Chikindas, 2007). Panh –

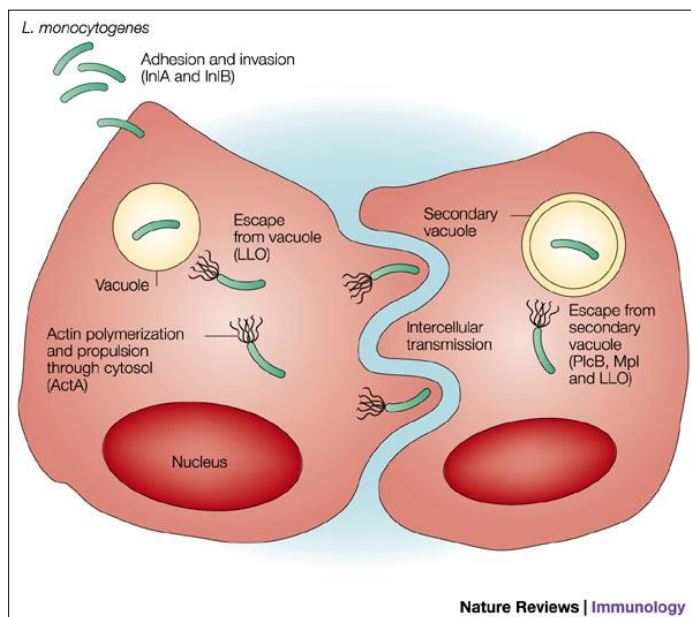
Tanh og Mahoin (2000) fant at *L. monocytogenes* utsatt for en ikke-letal syrebehandling (pH 5.2 2 timer) tålte varme (52 °C), osmotisk stress og alkoholstress langt bedre enn de ubehandlede. Forfatterne pekte derfor på muligheten for kryssbeskyttelse; en barriere som nesten tar knekken på *Listeria* kan gjøre den bedre rustet til å motstå neste barriere. *L. monocytogenes* kan vokse i et bredt pH område (4.39-9.4)(Gandhi & Chikindas, 2007).

Salt er en mye brukt metode for konservering. *L. monocytogenes* har god evne til å tilpasse seg forandringer i osmolariteten (Gandhi & Chikindas, 2007, Lungu et al., 2009)

Dette foregår ved induksjon av bestemte proteiner, eller ved at cellene tar i bruk osmoprotektanter som finnes i løsningen (Gandhi and Chikindas, 2007).

2.3.1 Virulens

Flere virulensfaktorer er kjente for *L. monocytogenes* slik som hemolysin (listeriolysin O), to fosfolipaser og proteinet (ActA) (Kathariou, 2002). *L. monocytogenes* er fakultativ intracellulær, den kan derfor invadere og formere seg i fagocytterende, så vel som ikke fagocytterende celler (Granum, 2011).



Figur 1 Patogenese ved cellulær *L. monocytogenes* infeksjon (Pamer, 2004)

Etter infeksjon i vertscellen blir *L. monocytogenes* omsluttet av en vakuole. Ved hjelp sekresjon av listeriolysin O (LLO) unnslipper bakterien vakuolen og kan fortsette formering i vertscellens cytoplasma. *L. monocytogenes* bruker vertscellens aktin sammen med proteinet actA for å bevege seg intracellulært (Kathariou, 2002). Etter en nabocelles omslutning av bakterien dannes en sekundærvakuole med dobbeltmembran. Igjen bruker *L. monocytogenes*

LLO til å unnsnippe, men inkluderer også fosfatidylcholine-spesifikk fosfolipase (PlcB) og zink metalloproteinase (Mpl)(Pamer, 2004).

2.3.2 Listeriose

Listeriose er en alvorlig tilstand forårsaket av *L. monocytogenes*. Listeriose angriper i første rekke individer med nedsatt immunforsvar. Særlig mottakelige er derfor personer som mottar immunsuppressiv behandling, gravide, spedbarn, eldre eller personer som har underliggende sykdom som kreft eller diabetes. Dødeligheten selv med adekvat behandling er 20-30 % (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Moren kan være symptomfri eller ha influensalignende symptomer som feber, myalgi eller hodepine (Rocourt et al., 2000). Langt alvorligere komplikasjoner kan ramme fosteret dersom bakterien overføres fra mor til foster. Dette innebærer spontanabort, dødfødsel, dødelig sepsis hos foster og nyfødte, og meningitt (Silver, 1998). Neonatal listeriose skjer i den første leveuken, der fosteret infiseres gjennom placenta. En systemisk infeksjon fører til føtal distres, prematur fødsel eller død. Risiko for død minsker i løpet av svangerskapet. Ved tidlig behandling kan barnet bli friskt, men sykdommen vanskelig å oppdage (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Listeriose kan også forekomme i spedbarn (late-onset listeriose), overføringen skjer da som i neonatalt tilfelle gjennom placenta eller oralt ved fødselen i kontakt med en kontaminert fødselskanal (Silver, 1998).

2.3.3 Hygieneregelverket og *Listeria*

EUs hygieneregelverk ble gjeldende i Norge fra 1.3.2010 (Mattilsynet, 2010) stiller myndighetene følgende krav til virksomhetene: I spiseklare næringsmidler som er ment for spedbarn eller til spesielle medisinske formål skal det ikke kunne påvises *L. monocytogenes* i 25 g i hele produktets holdbarhetstid. For andre spiseklare næringsmidler som understøtter vekst av *L. monocytogenes* finnes det to kriterier å velge mellom. Enten skal nivået *L. monocytogenes* være lavere enn grenseverdien satt til 100 cfu/g i hele produktets holdbarhetstid. Eller fravær av *L. monocytogenes* i 25 g innenfor produsentens umiddelbare kontroll.

Det første alternativet kan kun benyttes dersom det er gjennomført studier som viser at grenseverdien ikke overskrides i holdbarhetstiden under de betingelsene som er ment for

produktets lagring og distribusjon. Det er da vanlig å sette tilstrekkelig lave grenseverdier underveis i prosessen for å sikre seg at produktet ikke overskrider grenseverdien på 100 cfu/g i holdbarhetstiden. Slike studier skal gjennomføres etter vedlegg II i forskriften (Mattilsynet, 2010). Det finnes egne veiledningsdokumenter både til produsenten og til laboratoriene som utfører studiene. Etersom svært få produsenter har valgt å gjennomføre slike studier betyr det i praksis at kravet om fravær av *L. monocytogenes* i 25 g er vanlig (Mattilsynet, 2013).

2.3.4 Karakterisering av *L. monocytogenes*

Serotyping har vært en standard metode for å gruppere *Listeria* inn i en av de 16 serovariantene (Jadhav et al., 2012). Men ettersom serotyping gir en grov gruppering, er det nødvendig med mer høydetaljerte teknikker for å være i stand til å spore *L. monocytogenes* smitekilder, smitteveier samt dynamikkstudier. Vanlige teknikker er multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis MLVA og multi locus sekvenstyping (MLST) pulsfelt gelelektroforese (PGFE), random amplified polymorphic DNA (RAPD). Teknikkene brukes gjerne i kombinasjon for å oppnå maksimal oppløsning (Parisi et al., 2010).

MLEE (Multilocus enzym elektroforese) baserer seg på at ulike enzymer tilstede i bakteriecellen vil vandre ulikt gjennom en gel. Ulike varianter av enzymer blir gruppert i elektroforetiske typer (ET). ET-6 mest vanlig i Norge (Katla et al., 2002). Multilocus enzym elektroforese (MEE) var mye brukt tidligere, men er erstattet av nyere metoder som MLVA og MLST på grunn fordi metoden var arbeidskrevende og hadde lavere oppløselighet.

Ribotyping, PFGE (pulsfelt gelelektroforese) og AFLP (amplified fragment polymorphism) er alle subtypemetoder som baserer seg på bruk av restriksjonsenzymer. Ribotyping baserer seg på polymorfisme i rRNA genet. Genomisk DNA blir brutt ned med restriksjonsenzymer som *EcoRI*, *PvuII* og *XhoI*. Det dannes 500 små fragmenter som ved hjelp av southern blot kan hybridiseres med de genene som koder for det ribosomale RNA (Jadhav et al., 2012). I pulsfelt gelelektroforese (PFGE) brukes restriksjonsenzymer som kutter det genomiske DNA sjeldnere enn ved ribotyping. Dette resulterer i 8-25 større fragmenter som er mellom 40 og 600 kb. Metoden er sensitiv og kan detektere punktmutasjoner, insertsjoner, delesjoner og transposisjoner.

Molekylær serotyping baserer seg på at de ulike serovariantene varierer i bestemte områder innen genomet. Doumith et al. 2004, utviklet en metode for å serotype ved bruk av multiplex PCR. Ved å velge ut bestemte gener som kun innehas av bestemte serovarianter er det mulig å

skille de fire vanligste serovariantene (1/2a, 1/2b, 1/2c og 4b) i distinkte grupper. Metoden kan imidlertid ikke skille 1/2a fra 3a, 1/2c fra 3c, 1/2b fra 3b og 7, og 4b fra 4d og 4e. Forfatterne peker på at serovariantene 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d, og 7 sjeldent blir isolert fra mat og sjeldent er årsak til listeriose. Metoden er svært enkel fordi PCR-produktene skilles ved gelelektroforese uten videre analyser.

Tabell 2 Bakgrunn for å skille *L. monocytogenes* i ulike serovarianter (Doumith et al., 2004a)

Gen	Produktstørrelse (bp)	<i>L. monocytogenes</i> serovariant
<i>lmo0737</i>	691	1/2a, 1/2c, 3a og 3c
<i>lmo1118</i>	906	1/2c og 3c
ORF2819	471	1/2b, 3b, 4b, 4d og 4e.
ORF2110	597	4b, 4d og 4e.
<i>prs</i>	370	Alle <i>Listeria</i> .

Polymerase kjedereaksjon (PCR) benyttes for og effektivt kunne amplifisere DNA fragmenter som opprinnelig foreligger i svært små mengder. Dobbeltrådet DNA denatureres ved oppvarming slik at det dannes to enkeltråder. Temperaturen senkes slik at primerene fester seg til de komplementære baser på templatet. DNA polymerase sørger for at dNTP inkorporeres på den frie 3'OH enden på primeren og det skjer således en syntese av DNA. Repeterte sykluser med denaturering og DNA syntese amplifiserer området mellom primerene slik at mengden DNA blir doblet i hver runde (Watson et al., 2007).

Hovedprinsippet bak sekvenseringen er å benytte dideoksynukleotider som kjedeterminatorer. Fordi det trengs en fri hydroksylgruppe på 3' posisjon på ribose for å danne en fosfodiesterbinding med neste nukleotid, hindrer dideoksynukleotidet videre elongering. Ved å benytte seg av ddNTP vil det genereres kjeder av ulik lengde. En sekvensator kan ved elektroforese i kapillærer bestemme størrelsen til fragmentene og dermed nukleotidsekvensen (Watson et al., 2007).

I MLST blir syv loci fra husholdningsgenene i bakteriegenomet analysert med tanke på nukleotidforskjeller. Hvert av de syv genene denoteres et bestemt allelnummer basert på aminosyresekvens. På bakgrunn av hvilke alleler et bestemt isolat uttrykker, gis den en bestemt sekvenstype (ST)(Salcedo et al., 2002). Ettersom sekvensøkene gjøres i en database på nett det er svært enkelt å sammenlikne resultater mellom laboratorier.

Tabell 3 Husholdningsgenene i MLST (Salcedo et al., 2002)

Locus	Genets funksjon	Forward primer	Reverse primer
<i>abcZ</i>	ABC transporter	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>bglA</i>	Beta glucosidase	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>cat</i>	Catalase	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>dapE</i>	Succinyl diaminopimelate desuccinylase	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>dat</i>	D-amino acid aminotranferase	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>Idh</i>	L-lactate dehydrogenase	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTTTC
<i>IhkA</i>	Histidine kinase	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	TTGTGAGCGGATAACAATTT

MLVA baserer seg på multiplex PCR amplifisering av en rekke repeterte enheter i arvestoffet eller variabel number tandem-repeat (VNTR) loci. Disse blir separert ved kapillær elektroforese, deretter blir PCR-produktene gitt allelnummer som kan brukes til å identifisere det bestemte isolatet (Lindstedt et al., 2008).

2.3.5 Lakseprosessering

Gram og Huss (1996) definerer lettkonserverte fiskeprodukter ved at denne gruppen har saltnivå under 6 % i vannfasen og pH høyere enn 5. Konserveringsteknikker som gir produktet sorbat, benzoat, NO₂ eller røyk er vanlig for slike produkter. Typiske produktteksempler vil være saltet, marinert, fermentert, kaldrøkt eller gravet fisk. Slike produkter selges gjerne som vakuumpakkede kjølevarer og kan understøtte vekst av *L. monocytogenes*. Som fakultativ anaerob er ikke vakuumpakningen en god måte å hemme *L. monocytogenes*. Pakking med CO₂ i modifisert atmosfære er mer effektivt enn vakuumpakning (Rutherford et al., 2007). Kaldrøkte og gravede produkter har vært ansett som særlig problematiske og har vært knyttet til sporadiske tilfeller av listeriose i Sverige (Loncarevic et al., 1998). Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) konservert ved graving ble vist å være sannsynlig årsak til et utbrudd i Sverige på nittitallet (Ericsson et al., 1997).

Rørvik et al. 1995 undersøkte forekomsten av *L. monocytogenes* i et produksjonsanlegg for røkelaks. Hyppig forekomst av *L. monocytogenes* i røykeri sett i sammenheng med lav forekomst i slaktehus og fravær av bakterien i nyslaktet fisk impliserte at det fantes et reservoar for smitte i røykeriet. Videre ble det vist at klone ET-6, som ellers dominerte i røykeriet var den eneste som ble oppdaget i ferdig produkt (Rorvik et al., 1995). Vogel *et al.* 2001 kartla smitteveier for *L. monocytogenes* i tre ulike anlegg for kaldrøkt laks. Det ble funnet samme stamme i det ferdige produktet som i produksjonslokalene og på utstyr, mens den generelle tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* i rå fisk var lav. Begge disse studiene viste at det er gode holdepunkter for å anta at smitekilden for *L. monocytogenes* er produksjonsmiljøet og ikke råvaren.

2.3.6 Kjøttprosessering

Kjølelagrede spiseklare produkter med lang holdbarhet er særlig problematiske med tanke på listeriose. Etersom bakterien kan fortsette vekst ved kjøleskapstemperatur og således komme opp i høye konsentrasjoner. Rørvik og Yndestad (1991) undersøkte forekomsten av *L. monocytogenes* i mange ulike matvaregrupper i Norge. Det ble ikke bare oppdaget *L. monocytogenes* i produkter ment for varmebehandling (rå kylling, kjøttdeig og frossenfisk), men også i spiseklare produkter (importert mykost, vakuumpakkede prosesserte kjøttprodukter, røkelaks og pillede reker). I de spiseklare produktene varierte forekomsten av *L. monocytogenes* fra 9-18 % positive prøver. Fire av osteprøvene ble vist å ha mer enn 10³ cfu/g (Rørvik & Yndestad, 1991).

Suihko et al (2001) tok prøver fra utstyr, personell og produksjonsmiljø ved ulike prosessanlegg for kjøtt og kylling og sjømat. Samme isolat (tilsvarende ribotype RT) ble påvist ved produksjonsstart, under prosess og etter vask og desinfeksjon. Biofilmdannelse på produksjonsutstyr ble pekt på som en mulig forklaring (Suihko et al., 2002)

2.4 Bakgrunnsflora

Overflater i matproduksjonsmiljø kan inneha en divers flora, mange bakterieslekter overlever vask og desinfeksjon (Langsrud et al., 2003). Bagge-Ravn et al. (2003) identifiserte mikrofloraen som festet seg til produksjonsutstyr i fire ulike prosessanlegg for fiskeprodukter. I produksjonsanlegg for kaldrøkt laks dominerte *Pseudomonas*, *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Cyrtobacter*, *Acinetobacter* og melkesyrebakterier. Der det ble produsert nedlagt sild dominerte *Pseudomonas*, *Alcaligenes* og *Enterobacteriaceae*. I anlegget for kaviar dominerte *Psychrobacter*, *Staphylococcus* og gjær. *Pseudomonas* og gjær ble vist å være dominerende i alle de fire anleggende, både under produksjon og etter vask og desinfeksjon.

Acinetobacter spp. er Gram negative, oksidase negative, obligat aerobe, ikke- sporedannende kokkobasiller. Opptre som kokker i stasjoner vekst, ellers som staver. Vanlige i jord og vann og deltakere av den humane hudflora (Madigan et al., 2009). Vekstområdet er mellom 20-30 °C, med optimum mellom 33-35 °C. Det er kjent at *Acinetobacter spp.* kan danne biofilmer i grenseflaten mellom overflater og vann, denne er høyere ved 25 °C enn ved 37 °C (Marti et al., 2011).

Pseudomonas spp. Gram-negative, mikroaerofile, staver. Er vanlige forringelsesbakterier, særlig i aerobt lagrede matvarer med høyt vanninnhold og nærmest nøytral pH. Eksempler på slike kan være rødt kjøtt, fjørfe, melk og melkeprodukter (intVeld, 1996). *Pseudomonas* er vist å være dominerende etter vask og desinfeksjon i prosessanlegg for fiskeprodukter (Bagge-Ravn et al., 2003)

Serratia spp. er Gram-negative, fakultativ anaerobe, stavformede. Finnes vidt distribuert mange i naturen og er isolert fra fruktjuice og fersk fisk (Singh et al., 1997). Fører til uheldige smakskomponenter i melk og melkeprodukter og betraktet som forringere av melkeprodukter slike produkter (Abdou, 2003).

Stenotrophomonas spp. er Gram-negative, obligat aerobe, staver og isoleres fra miljø (Coenye et al., 2004). *Stenotrophomonas maltophilia* er kjent som forringer i tunfisk (Ben-Gigirey et al., 2002). Isolert fra matproduksjonsmiljø etter vask og desinfeksjon (Carpentier & Chassaing, 2004)

Brochotrix er Gram positiv, stavformet, fakultativt anerob, kan vokse ved kjøleskapstemperatur (Hwang & Sheen, 2011). Den er gjerne deltakende i den aerobe forringelsesflora på kjøtt, men ikke sett på som viktige forringere (Nychas et al., 2008). Men *Brochotrix thermosphacta* er vist å utkonkurrere *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, og *Pseudomonas* i MAP og vakuumpakket kjøtt (Pin et al., 2002)

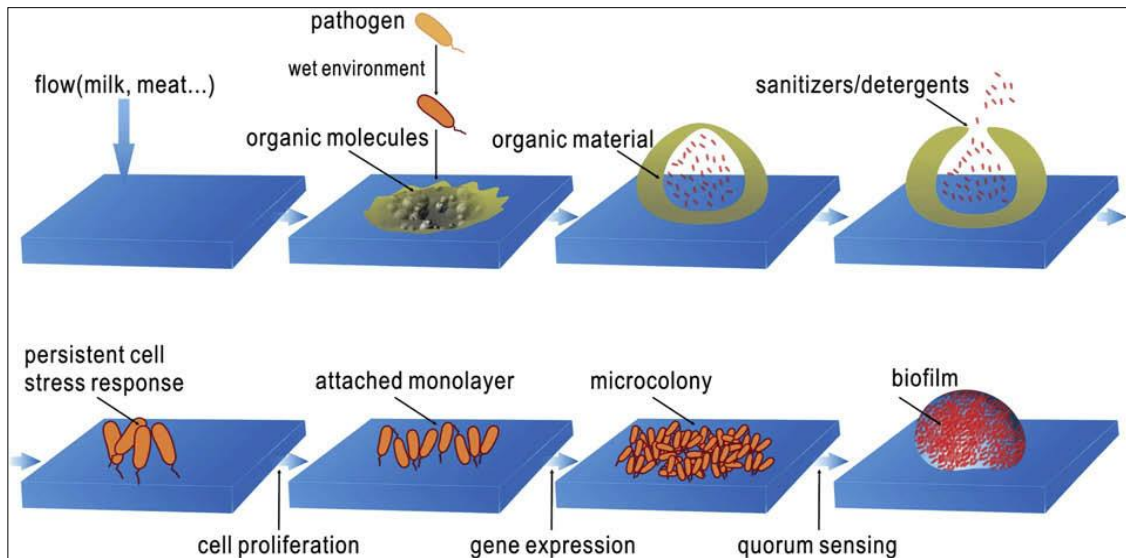
2.5 Generell beskrivelse av biofilm

En biofilm er en kompleks, irreversibelt festet aggregering av mikrobielle celler og deres ekstracellulære polymeriske substans (EPS)(Donlan, 2002). Ikke-cellulære substanser slik som smuss, skitt, leire og blod kan også finnes i aggregeringen. Et slikt samfunn kan bestå av en eller flere arter, det kan være ett enkelt lag eller kompleks struktur. Cellene i biofilmen er forskjellig fra de planktoniske (frittlevende) med hensyn til dannelse av ekstracellulær polymerisk substans (EPS) redusert veksthastighet og opp- og nedregulering av spesifikke gener (Donlan, 2002).

En rekke faktorer påvirker dannelsen og utviklingen av biofilm; Hvilke stammer som fester seg, underlagets overflateegenskaper og fysiske parametere i miljøet slik som pH, næringstilgang og temperatur (Palmer et al., 2007).

Tabell 4 Sentrale variable for cellefeste og biofilmdannelse. Modifisert etter (Donlan, 2002)

Underlag	Omsluttende væske	Bakteriecellen
Tekstur/mikrotopografi	strømningshastighet	Celleoverflate hydrofobisitet
Hydrofobisitet	pH	Fimbrier
Organisk materiale	Temperatur	Flageller
	Kationer	EPS



Figur 2 Gangen i biofilmdannelse på matkontaktoverflater. Smuss avsettes på overflate eller utstyr. Mikroorganismer tiltrekkes de organiske molekylene. Persistente stammer overlever vask og desinfeksjon og danner grunnlaget for videre biofilmdannelse. Hentet fra (Shi & Zhu, 2009)

Dannelsen av biofilm skjer trinnvis; initialt feste, irreversibelt feste, utvikling av biofilmarkitektur/dannelse av mikrokolonier, modning og dispersjon (Srey 2013).

Det initielle feste til underlaget kan foregå aktivt eller passivt. Aktivt ved at cellene selv beveger seg til underlaget, passivt ved sedimentasjon. De svake interaksjonene mellom cellene og underlaget danner det reversible feste, krefter som virker inn er van der Waalske, elektrostatiske krefter og hydrofobe interaksjoner (Kumar & Anand, 1998). Når cellene er festet reversibelt har de brownske bevegelser og kan enkelt fjernes ved skylling.

Underlagets fysiske egenskaper er av avgjørende betydning for bakterienes initielle feste (Shi & Zhu, 2009). Ulike molekyler, organiske som uorganiske kan adsorberes til overflater og skaper et dekkende lag (conditioning film). Matkontaktoverflatens mikrotopografi er viktig da en glatt og blank overflate vil gi dårligere grobunn for feste enn en slitt og ru overflate. Næringstilgangen i miljøet og bakterienes vekststadium er også av betydning for feste. Dersom det skjer en væskestrøm over underlaget vil dette gjøre feste vanskeligere (Donlan, 2002).

De frastøtende kreftene som virker mellom bakterieoverflaten og underlaget vil vanligvis hindre direkte kontakt (Chmielewski). Dersom både underlaget og bakteriecellens overflate er hydrofobe vil de hydrofobe interaksjonene øke. Celleoverflatens hydrofobisitet, nærvær av fimbrier, flageller og ekstracellulær polymerisk substans (EPS) er i så måte viktige for å senke de frastøtende kreftene og bidra til feste (Donlan, 2002). Slike utstikkere kan da danne en bro mellom bakterie og underlag. Ulike bindinger og interaksjoner legger grunnlaget for det

irreversible feste. I det irreversible festet er dipol-dipol interaksjoner, hydrogen-, ione- og kovalente bindinger og hydrofobe interaksjoner (Kumar & Anand, 1998). Når det har skjedd et skifte fra reversibel til irreversibelt feste kan cellene ikke lenger enkelt skyldes bort, og er å betrakte som permanent bundet til overflaten.

Cellene som sitter festet irreversibelt skiller ut EPS. Hovedkomponentene i EPS er polysakkarider, proteiner, fosfolipider og nukleinsyrer er hovedkomponentene i EPS (Shi & Zhu, 2009). Utskillingen av EPS styrker bindingen mellom underlaget og biofilmen i tillegg til å beskytte koloniene mot ytre stress (Donlan, 2002). Mikrokoloniene er biofilmens grunnleggende enhet for videre strukturdannelse.

En moden biofilm er et komplekst økosystem. Selv om hvert biofilmsamfunn kan sies å være unikt, deler de mange fellestrekk; mikrokolonier bestående av bakterieceller omsluttet av EPS og adskilt av vannkanaler. Væskestrømmen i vannkanalene bidrar til diffusjon av næringsstoffer til cellene i biofilmen (Kumar & Anand, 1998). Genutveksling av ekstrakromosomalt DNA (plasmider) gjennom konjugasjon (overføring av plasmider mellom celler), dette skjer hyppigere mellom celler i biofilm. (Hausner & Wuertz, 1999). Fordi plasmider kan kode for motstandsdyktighet mot antimikrobielle midler, kan seleksjon og spredning av resistens mot slike midler være forbundet med biofilm (Donlan, 2002).

For å kunne kolonisere nye nisjer har bakteriene evnen til å slippe taket fra biofilmens overflate, nydannede celler kan dermed flasse av (Kumar & Anand, 1998). Dette er å betrakte som det siste trinnet i biofilmsyklusen. Relativt store partikler av biomasse kan løsne fra biofilmen og tilta prosessen med biofilmdannelse et annet sted eller feste seg til produkt.

2.5.1 Betingelser for *L. monocytogenes* feste til overflater

En rekke faktorer er involvert i *L. monocytogenes* etablering og vekst på overflater. Det initielle feste til overflaten vil avhenge av materialet overflaten består av. Fysiske og kjemiske parametere i miljøet slik som temperatur, pH og næringstilgang vil påvirke bakteriens fysiologiske egenskaper. *L. monocytogenes* celleoverflate endres kontinuerlig under påvirkning av omgivelsene, denne er viktig med tanke på feste til overflater (Palmer et al., 2007, Rodrigues & McLandsborough, 2009)

L. monocytogenes kan feste seg til vanlige matkontaktoverflater slik som rustfritt stål, glass og plastmaterialer (Djordjevic et al., 2002). Det er gjort en rekke studier på hvilke materialer som er gunstige med tanke på *L. monocytogenes* feste til overflater. Ved å sammenlikne ulike materialers evne til feste av *L. monocytogenes* kan de materialer som ikke danner grobunn for feste være mer aktuelle for bruk i matproduksjon. Beresford et al. (2001) testet hvordan *L. monocytogenes* festet seg til 17 ulike matkontaktmaterialer. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i *L. monocytogenes* feste til disse overflatene. Det er også vist at *L. monocytogenes* fester seg dårligere til rustfritt stål enn til gummi og polytetrafluoretylene (Sinde & Carballo, 2000).

Det er antatt at flagellen spiller en viktig rolle med tanke på det initielle feste til overflater. Det er Flagellens rolle i biofilmdannelsen er heller å frakte *L. monocytogenes* til underlaget enn å bidra direkte til feste (Lemon et al., 2007). *L. monocytogenes* evne til å feste seg til overflater øker med temperaturen i intervallet 10-30 °C (Møretrø & Langsrud, 2004).

2.5.2 *L. monocytogenes* - vekst på overflater

Dersom en bestemt stamme kan delta i en biofilm på overflater eller utstyr i et matproduksjonsmiljø, vil denne opplagt ha større potensial til å smitte over på mat, og dermed ha større mulighet til å forårsake sykdom hos mennesker. En virulent stamme som ikke kan delta i biofilm, og således ha mindre mulighet for å smitte over på matvare, har denne mindre mulighet for å skape sykdom. Serovarianter som er gode biofilmdannere kan derfor tenkes å utgjøre en større trussel sett fra et matvaretrygghetsperspektiv. Av de fire evolusjonære linjene *L. monocytogenes* deles inn i, er det linje I og II som vanligvis er assosiert med sykdom hos mennesker (Orsi et al., 2011). Serovariant 1/2a (linje II) er oftest isolert fra matkilder, mens serovariant 1/2b og 4b oftest er knyttet til utbrudd, til sammen står disse tre serovariantene for om lag 95 % av de humane listeriosetilfellene (Kathariou, 2002).

Djordjevic et al. 2002 utførte et mikrotiterplate assay med 31 ulike stammer. I et slikt assay brukes farging med krystallfiolett som en indikasjon på overflatevekst. Forfatterne fant at linje I var signifikant bedre til å danne biofilm enn linje II og III. Borucki et al. 2003 fant også en sammenheng mellom fylogenetisk linje og biofilmdannelse ved bruk av samme metode. Ved å teste 80 *L. monocytogenes* isolater ble det observert høyere biofilmdannelse hos linje II.

Det ble ikke funnet korrelasjon mellom serovariant og adsorbte celler. Heller ingen mellom kilde og adsorbte celler. Utbruddsstammer skilte seg ikke mellom andre stammer. De fleste stammene dannet ikke biofilm, de kun festet seg til overflatene som enkeltceller. Ingen trender funnet med tanke på mat- eller kliniske isolater. Fant kun 1 av 36 isolater som lagde aggregater på BHI (Kalmokoff et al., 2001).

Fordi stammer ute i matproduksjonsmiljø må konkurrere under vidt forskjellige betingelser for å kunne feste seg og vokse, er det i mange tilfeller vanskelig å avgjøre hvorvidt laborietester har god overføringsverdi med tanke på å forklare enkelte stammers persistens. Det å teste stammers evne til feste og vekst enkeltvis vil alltid være en grov forenkling fordi virkeligheten i matproduksjonsmiljøet kan være langt mer kompleks. Når samme stamme isoleres fra det samme produksjonsanlegget over tid sies den å være persistent, i motsatt fall er den sporadisk. Det foreligger imidlertid ingen absolutt definisjon av persistens. Derfor er det en viss fare for at antatt sporadiske stammer egentlig er persistente, dermed bør de heller anses for å være antatt ikke-persistente (Kastbjerg & Gram, 2009).

2.5.3 *L. monocytogenes* - konkurranse med andre bakterier i biofilm

Biofilmen dannet i et matproduksjonsmiljø kan være svært kompleks; en rekke arter kan delta i bakteriesamfunnet, smuss fra utilfredsstillende vask og desinfeksjon kan være innesluttet i det tredimensjonale nettverket (Rodrigues & McLandsborough, 2009). De ulike artene som er tilstede i et bestemt produksjonsmiljø vil påvirke *L. monocytogenes* evne til å vokse og etablere seg. Det er mulig å tenke seg ulike scenarier for hvordan *L. monocytogenes* reagerer i nærvær av andre arter; den blir ikke påvirket, den blir stimulert eller undertrykt.

L. monocytogenes blir i mange tilfeller undertrykt når den blir dyrket sammen med andre arter, sammenliknet med vekst i monokultur (Carpentier & Cerf, 2011). Norwood og Gilmour (2001) viste at *L. monocytogenes* i monokultur festet seg langt bedre til rustfrie stålkuponger i monokultur enn sammen med *Pseudomonas fragi* og *Staphylococcus xylosus* i multikultur, denne tendensen ble observert ved 4, 18 og 30 °C. Carpentier og chassaing brukte 29 stammer isolert fra matvareindustri etter vask og desinfeksjon, disse ble dyrket på stålkuponger for å se hvordan de påvirket vekst av *L. monocytogenes* ved 25 °C. Det ble vist at *Pseudomonas fluorescens* blandet med *L. monocytogenes* førte til en 3-log reduksjon av sistnevnte. *Kocuria varians*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia* og *Comamonas testosteroni* var de eneste fire som hadde en positiv effekt på veksten av *L. monocytogenes*. I alt elleve stammer hadde ingen effekt.

Hvilke mikroorganismer som er tilstede sammen med *L. monocytogenes* kan ha betydning for hvordan feste til overflaten foregår; i monokultur er den vist å feste seg som enkeltceller eller mikrokolonier til overflater (Kalmokoff et al., 2001), i duokultur med *Kocuria varians* samlet *L. monocytogenes* seg rundt mikrokoloniene som var dannet av partnerstammen. (Carpentier & Chassaing, 2004). Det er kjent at *Pseudomonas fluorescens* produserer bestemte biosurfaktanter som kan hindre kolonisering av *L. monocytogenes* på rustfritt stål (Meylheuc et al., 2006). Samtidig er det mulig at *Pseudomonas* initielle mikrokolonidannelse kan bidra til at *L. monocytogenes* lettere festes til overflater (Møretrø & Langsrud, 2004).

I matproduksjonsmiljø isoleres gjerne flere arter innen slekten *Listeria* enn *L. monocytogenes* (Doijad et al., 2011). Carvalheira et al. viste at *L. innocua* har en hemmende virkning på *L. monocytogenes* dersom denne ble tilsatt i høyere initiell konsentrasjon, men det motsatte ble observert når *L. monocytogenes* ble tilsatt i høyest konsentrasjon.

3. MATERIALER OG METODER

Alt arbeid med *Listeria* ble utført på patogen-laboratoriet hos Nofima Mat, Ås.

3.1 Utvelgelse av *L. monocytogenes* isolater

Fra Nofimas stammesamling ble valgt ut en rekke isolater primært fra laks- eller kjøttindustrien (tabell 5). Hensikten med å velge seg ut et bredt spekter isolater var å inkludere representative *Listeria*-stammer fra ulike deler av norsk matindustri, med hovedfokus på stammer fra to ulike bransjer; laksenæring og kjøttindustri. For å få en representativ samling av isolater ble det inkludert *L. monocytogenes* isolater med forskjellige genetiske fingerprintprofiler basert på MLVA data, utført i et annet prosjekt. Det ble også inkludert referanseisolater samt en *L. monocytogenes* isolat fra utbruddet i Norge i 2007 knyttet til økologisk produsert ost. *L. monocytogenes* isolatene ble i det videre arbeidet sekvenstypet for å finne kandidater som kunne differensieres i dynamikkstudier. Isolater av *L. monocytogenes* og *L. spp* inkludert i frysekultursamling er vist i tabell 1.

Tabell 5 Oversikt over *L. monocytogenes* og *L. spp* benyttet i oppgaven. Art og stammenummer i databasen, fingerprintprofil, kilde, prøvetype og hvor i prosessen isoleringen er gjort.

<i>Listeria</i> Stamme (art og MF-nr ¹)	MLVA	Kilde	Prøvetype	Isolert under Produksjon(U)/ Etter renhold(E)
<i>L.m.</i> 1509 ²	-	Human, utbrudd	-	-
<i>L.m.</i> 2624 ³	-	Kanin	-	-
<i>L.m.</i> 3006 ⁴	-	Ku	-	-
<i>L.m.</i> 3853	G	Laks, Anlegg 1	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 3858	F	Laks, Anlegg 1	Miljø	E
<i>L.m.</i> 3860	D	Laks, Anlegg 1	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 4077	H	Laks, Anlegg 2	Miljø	E
<i>L.m.</i> 3923	F	Laks, Anlegg 2	Utstyr	U
<i>L.m.</i> 3927	D	Laks, Anlegg 2	Miljø	U
<i>L.m.</i> 3939	B	Laks, Anlegg 3	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 4001	B	Laks, Anlegg 4	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 3995	I	Laks, Anlegg 4	Miljø	E
<i>L.m.</i> 3870	G	Laks, Anlegg 1	Utstyr	U
<i>L.m.</i> 3921	H	Laks, Anlegg 2	Miljø	U
<i>L.m.</i> 3949	H	Laks, Anlegg 2	Miljø	E
<i>L.m.</i> 4254	H	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 4245	H	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 4284	R	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 4319	R	Laks, Anlegg 2	Miljø	E
<i>L.m.</i> 4627	T	Kjøtt, Anlegg 1	Miljø	E
<i>L.m.</i> 4562	S	Kjøtt, Anlegg 1	Utstyr	U
<i>L.m.</i> 4554	U	Kjøtt, Anlegg 1	Miljø	U
<i>L.m.</i> 4545	S	Kjøtt, Anlegg 1	Miljø	E
<i>L.m.</i> 4712	I	Kjøtt, Anlegg 2	Sliceravfall	U
<i>L.m.</i> 2184	Ukjent	Kjøtt, Anlegg 3	Miljø	E
<i>L.m.</i> 3132	Ukjent	Ukjent	Utstyr	E
<i>L.m.</i> 3131 ⁵	Ukjent	Ukjent	Spekepølse	-
<i>L.m.</i> 3134 ⁵	Ukjent	Ukjent	Utstyr	U
<i>L.m.</i> 3638 ⁶	I	Ost, utbrudd	Ost	-
<i>L. spp</i> 4402	-	Laks, Anlegg 2	Miljø	E
<i>L. spp</i> 3861	-	Laks, Anlegg 1	Utstyr	E
<i>L. spp</i> 3940	-	Laks, Anlegg 3	Utstyr	E
<i>L. spp</i> 4031	-	Laks, Anlegg 4	Utstyr	E
<i>L. spp</i> 4022	-	Laks, Anlegg	Miljø	E
<i>L. spp</i> 3871	-	Laks, Anlegg 1	Utstyr	U
<i>L. spp</i> 3950	-	Laks, Anlegg 2	Miljø	E
<i>L. spp</i> 4401	-	Laks, Anlegg 2	Miljø	
<i>L. spp</i> 4385	-	Laks, Anlegg 4	Miljø	
<i>L. spp</i> 4608	-	Laks, Anlegg 2	Miljø	
<i>L. spp</i> 4052	-	Laks, Anlegg 3	Miljø	

¹ Nofimas stammesamling

² Også betegnet ILSI-1 (International Life Sciences Institute stammesamling)

³ Også betegnet EGDe. Referansestamme (Murray et al., 1926)

⁴ Også betegnet ILSI-3 (International Life Sciences Institute stammesamling)

⁵ Mottatt av Dr. M. Hebraud, INRA, Frankrike

⁶ Mottatt av Prof. G. Kapperud, Nasjonalt Folkehelseinstitutt, Oslo, Norge

3.1.1 Utvelgelse av isolater fra bakgrunnsflora

Det ble valgt ut 12 isolater fra Nofimas stammesamling som alle hadde blitt isolert etter renhold i lakseprosesseringsindustri (Tabell 6). Flere av stammene hadde felles prøvepunkt som *L. monocytogenes* på produksjonsutstyret. Hensikten med å velge ut stammer fra den generelle bakgrunnsfloraen i industrien var å inkludere disse i bakteriedynamikkstudier. De utvalgte isolatene fra bakgrunnsfloraen viste seg å være Gram negative, og vil som gruppe omtales som Gram negative i den videre beskrivelsen.

Tabell 6 Ulike isolater fra bakgrunnsflora.

Stamme (art og MF-nr ¹)	Kilde	Prøvetype	Isolert under Produksjon(U)/ Etter renhold(E)
<i>Pseudomonas fragi</i> K96.4	Laks, Anlegg 3 ²	Utstyr	E
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K96.6	Laks, Anlegg 3 ²	Utstyr	E
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K96.7	Laks, Anlegg 3 ²	Utstyr	E
<i>Brochotrix thermospacta</i> K96.9	Laks, Anlegg 3 ²	Utstyr	E
<i>Serratia liquefaciens</i> 3971	Laks, Anlegg 3 ²	Utstyr	E
<i>Acinetobacter johnsonii</i> 4091	Laks, Anlegg 3	Utstyr	E
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4092	Laks, Anlegg 3	Utstyr	E
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 4098	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>Acinetobacter sp.</i> 4122	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>Acinetobacter junii</i> 4124	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>Chryseobacterium sp.</i> 4128	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 4129	Laks, Anlegg 2	Utstyr	E

¹ Nofimas stammesamling

² Prøvepunkt med *Listeria*

3.1.2 Tillagning av frysekultur

Isolatene ble fryst ned enkeltvis som renkulturer slik at de enklere kunne benyttes ved behov.

Prosedyre

Isolatene ble ved hjelp av en podeøse overført til BHI-skåler (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) og inkubert ved 30 °C i ett døgn for *Listeria*, og 25 °C i to døgn for florastammer. Tre til fire kolonier ble overført til 5 ml BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) og inkubert ved 30 °C i ett døgn for *Listeria*-isolater, og 25 °C i to døgn for florastammer. 800 µl bakteriekultur ble overført til cryorør (Nalgene® Thermo SCIENTIFIC) tilsatt 200 µl glyserol. Glyserol (85 %) ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter, og deretter avkjølt til romtemperatur før bruk. Cryorørene ble fryst ned og oppbevart ved -20 °C.

3.2 Tillagning og uttesting av medier

3.2.1 Medium basert på laks

For å kunne simulere vekstforholdene i et anlegg for prosessering av fersk laks ble det tillagd en laksemedium basert på fersk laksefilet.

Prosedyre

Drøye 5 kilo fersk laksefilet (*Salmo Salar*) med skinn og pinnebein ble skåret opp i biter à 30 g. 100 g laks og 100 ml vann ble deretter veid ut i sterile poser i en fortynningsautomat (Dilumat3, mk2). Disse ble homogenisert ved hjelp av en stomacher (Colworth Stomacher 400). Væsken ble overført til 200 ml sentrifugerør og sentrifugert (RC 5C Plus Superspeed Centrifuge, SORVALL) ved 8120 rpm i 30 minutter. Supernatanten fra sentrifugeringen ble blandet sammen til en batch. Denne ble fordelt i flasker á 1 liter og autoklavert ved 121 °C i 15 minutter i en Certoclav (GmbH, Austria). Væsken ble kjølt ned til 4 °C før den ble fordelt i sentrifugerør og sentrifugert en gang til ved samme betingelser. Laksemediet ble overført til 50 ml rør (Nunc) og oppbevart ved -40 °C. Før bruk ble laksemediet tint ved 4 °C.

3.2.2 Laksemedium - egnethet som vekstmedium

Laksemediets egnethet som vekstmedium ble utprøvd for å se om mediet kunne inkluderes i det videre arbeidet. Alle de utvalgte isolater innenfor *Listeria* og Gram negative ble testet.

Prosedyre

Isolater av *Listeria* og Gram negative ble ved hjelp av en podeøse tatt opp fra frysekultur og overført til reagensrør med 2 ml laksemedium. Rørene ble inkubert ved 37 °C i et døgn.

Synlig blakket løsning ble antatt å indikere vekst.

3.2.3 Identifisering av *Listeria* på selektivt medium

Hensikten med uttesting av dette mediet var å forsikre seg om at det var mulig å skille *L. monocytogenes* fra *L. spp* i videre studier av dynamikk i bakteriesamfunn.

Prosedyre

Isolater av *Listeria* ble ved hjelp av en podeøse tatt opp fra frysekultur og strøket ut på Rapid`l mono Agar 90 mm petriskåler (RLM) (RAPID`L.MONO™, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Skålene ble inkubert i 1 døgn ved 37 °C. Det ble observert hvordan *L. monocytogenes* vokste på disse.

3.2.4 Vekstforsøk i BHI og laksemedium

Det ble målt vekst i cfu/ml etter ett og tre døgn for *Listeria* og Gram negative ved 20 °C i både laksemedium og BHI (Oxoid).

Prosedyre

Isolater av *Listeria* og Gram negative ble ved hjelp av en podeøse tatt opp fra frysekultur og overført til 5 ml laksemedium og BHI. før inkubasjon ved 20 °C. Inkuberingen foregikk med risting. Det ble gjort uttak etter ett- og tre døgn.

Hver prøve ble fortynnet ved tifold fortynningsrekke i sterilt peptonvann (4,5 ml). Det ble brukt en automatisert platetespreder (Whitley Automatic Spiral plater WASP, Don Whitley scientific Limited, Storbritannia), spredningen ble gjort på BHI-skåler. Skålene ble inkubert ved 25 °C i to døgn. Bestemmelse av cfu/ml ble gjort ved hjelp av en automatisk tellemaskin (Acolyte Colony Counter, Synbiosis, USA).

Det ble også kvantifisert vekst i cfu/ml etter 2 døgn av *Listeria* og Gram negative ved 15 °C i laksemedium og BHI.

3.2 Sekvenstyping

Det ble utført en sekvenstyping der målet var å finne variasjon i de fire genene *abc*, *cato*, *dap*, og *bgl* for de valgte isolatene. Fordi det kun brukes fire gener er metoden benyttet å betrakte som en partiell MLST. MLST som metode er beskrevet i teoridelen. Dersom variasjonen innenfor et gen var tilstrekkelig stor, kunne dette brukes ved identifisering i dynamikkstudier. Det ble valgt ut atten isolater *L. monocytogenes*. Disse ble primært utvalgt på bakgrunn av ulik MLVA-profil og for å dekke laks- og kjøttindustri.

Prosedyre

Atten isolater *L. monocytogenes* ble tatt opp fra tint frysekultur, strøket ut på BHI-agar med podenål og inkubert ved 37 °C i 1 døgn.

3.2.1 PCR

For å amplifisere de ønskede DNA-fragmentene ble det utført en PCR. Bakgrunnen for metoden er beskrevet i teoridelen.

Prosedyre

Ved hjelp av en 200 µl pipettespiss ble det plukket en koloni fra respektiv skål. Disse ble avsatt bunnen av en 96-brønns PCR plate (Thermo-Fast®). For å hindre kontaminasjon i brønnene ble det tredd over en plastfilm. 96-brønns PCR platen ble siden plassert i mikrobølgeovn i 1 min på maks effekt (750W). Oversikt over hvilke primere som ble benyttet er gitt i tabell 7.

Tabell 7 Primere benyttet i PCR (Pasteurinstituttet, 2011b). Forward (F) og Reverse (R)

Primer	Oligonukleotidsekvens
<i>abcZoF</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
<i>abcZoR</i>	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>bglAoF</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
<i>bglAoR</i>	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>catoF</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
<i>catoR</i>	TTGTGAGCGGATAACAATTT
<i>dapEoF</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
<i>dapEoR</i>	TTGTGAGCGGATAACAATTT

Et kommersielt kit (Qiagen® Multiplex PCR kit) ble benyttet ved PCR. Blandingsforholdene i mixen er gitt i tabell 8.

Tabell 8 Qiagen Multiplex PCR

2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	6 µl
10pmol/µl Primer F	0,25 µl
10pmol/µl Primer R	0,25 µl
dH ₂ O	5,5 µl
Total	12 µl

PCR ble utført i en PCR maskin (Veriti 96 well thermal cycler, Applied Biosystems) med temperaturprofil vist i tabell 9.

Tabell 9 PCR protokoll

Initiering	15 min	95 °C	} x35
Denaturering	30 s	94 °C	
Annealing	30 s	52 °C / 45 °C ¹	
Extension	1 min	72 °C	
Final extension	10 min	72 °C	

¹ Annealingtemperaturen ble holdt på 52 °C for alle gener unntatt *bglA* ved 45 °C¹.

3.2.2 Gelelektroforese

For å kontrollere om amplifiseringen av DNA var tilfredsstillende ble det utført en gel elektroforese. Ved å sammenlikne båndene dannet i gelen med en kjent molekylvektstandard gir dette informasjon om størrelsen på produktet dannet i PCR. Tydelige definerte bånd med riktig størrelse indikerte dannelse av PCR produkt.

Prosedyre

For å lage 0,7 % agarosegel ble det benyttet 0,7 g agarose (Multi ABgarose) og 100 ml 0,5 X TBE buffer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.3). For å løse agarosen fullstending ble løsningen kokt opp tre ganger i mikrobølgeovn. Agaroseløsningen ble avkjølt til 50 °C og lagret ved denne temperatur til den skulle benyttes.

80 ml 0,7 % agarosegel ble tilsatt 8 µl Gel Red og tilsatt et elektroforesekar (wide mini-sub® cell GT BIO-RAD). Størrelsesstandard VI ble tilsatt i første brønn på hver gel slik at størrelsen på PCR-produktene i ettertid kunne estimeres.

I en 96-brønns PCR plate ble det blandet 2 µl Orange G, 2,5 µl PCR-produkt og 2,5 µl dH₂O. Ved å koble karet til en strømkilde (Power-Pac 200, BIO-RAD) ved 100 V i 30 min. Gelen ble fotografert under UV-lys (GelDoc™ EZ Imager, BIO-RAD).

3.2.3 Pre-sekvensering

Det var nødvendig å forsikre seg om at rester av primere, nukleotider og andre eventuelle urenheter ikke skulle forstyrre den videre analysen. Rensing av PCR produktet ble derfor gjennomført.

Prosedyre

I rensingen ble det brukt 2 µl ExosapIt (Affimetrix 78201, BioNordica) fortynnet 1:5 og 5 µl PCR-produkt. PCR produktet ble fortynnet avhengig av båndintensiteten. Sterke bånd ble fortynnet 1:10 i dH₂O.

Tabell 10 Temperaturprofil under pre-sekvenserings-PCR

37 °C	30 min
80 °C	15 min
4 °C	Hold

3.2.4 Sekvensering

Prinsippene bak sekvenseringen er beskrevet i teoridelen.

Prosedyre

Ved sekvenseringen ble det benyttet MicroAmp Optical 96 well reaction plate (MicroAmp™, Applied Bio systems). Reagenser og blandingsforhold for mastermix er gitt i tabell 11.

Tabell 11 Blandingsforhold Mastermix

Mastermix	µl
Big Dye buffer	1,5
Big Dye 1.1	1,0
Primer oF 3,2 µM GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA ¹	1,0
dH ₂ O	5,5
Renset PCR-produkt	1
Total ₂	10

¹ BigDye terminator v/1.1 Cycle Seq Kit (Applied Biosystems)

Temperaturprofil for sekvenserings-PCR er gitt i tabell 12.

Tabell 12 Temperaturprofil sekvenserings-PCR

96 °C i 15 s	15 s	} x25
50 °C i 10 s	10 s	
60 °C i 4 min	4 min	
4 °C hold	hold	

Det ble foretatt en felling for å fjerne ekstensjonsproduktet fra primeren dannet ved pre-sekvenseringen. Blandingen ble tilsatt direkte i reaksjonsplaten fra foregående reaksjon. Blandingsforholdet vises i tabell 13.

Tabell 13 Blandingsforhold ved felling

Mastermix	µl
X-terminator Solution ¹	10
SAM solution	45

¹ BigDye X Terminator Purification Kit, 20 ml (Applied Biosystems)

Platen ble forseglet med brønnlokkstrips og ristet i 30 minutter ved 1500 rpm, før sentrifugering 2500 rpm i 2 minutter. Ved tomme brønner ble det tilsatt 65 µl vann, slik at instrumentet ikke skulle ta inn luft. Sekvenseringen ble utført med (ABI 3130xl Genetic Analyser). Instrumentet benytter seg av kapillær elektroforese til å separere fragmenter av ulik lengde, med flourmerkede primere.

3.2.5 Bearbeiding av sekvensdata

Det ble benyttet to ulike dataprogrammer for å analysere sekvensdata:

- Sequence Scanner versjon 1.0 (Applied Biosystems®, 2005)
- Biolign versjon 2.0.9 (Biolign alignment and multiple contig editor, Copyright© 200-2001, Tom Hall).

For å forsikre seg om at sekvenseringen hadde gått riktig for seg, ble sekvensene åpnet i Sequence skanner. Informasjon om fragmentlengde og intensitet av nukleotidene ble her undersøkt. I de sekvensene det ikke var mulig å fastslå baser (A,T,G, C) nøyaktig over intervaller på mer enn en håndfull baser, ble disse sekvensene forkastet.

I Biolign ble sekvensene sortert etter gen (*abc*, *cato*, *dap* og *bgl*). Nødvendige justeringer ble gjort i form av å klippe bort endene da en del støy kan forekomme der primeren fester seg.

Sekvensene ble sammenliknet med kjente sekvenser i *Listeria monocytogenes* MLST single locus Query, en database tilgjengelig på nett (Pasteurinstituttet, 2011a).

3.3 Serotyping ved hjelp av Multiplex PCR

Metoden er basert på arbeidet gjort av Doumith et al (2004), denne er beskrevet i teoridelen. Hensikten var å skille serovariantene (1/2a, 1/2b, 1/2c og 4b) i fire distinkte grupper. Det ble benyttet stammer med kjent serovariant som kontroll.

Prosedyre

En fersk koloni fra frysekultur ble dyrket overnatt på BHI-skål, ble ved hjelp av en 200µl pipettespiss plukket fra skål og ført ned i en 96-brønns PCR plate. Platen ble filmovertrukket før mikrobølging i ett minutt på maks effekt. Primerene benyttet i PCR reaksjonen vises i tabell 14.

Tabell 14 Primere benyttet i PCR. Forward (F) og Reverse (R) (Doumith et al., 2004a).

Primer	Primersekvens 5-3'
<i>lmo0737</i>	F-AGGGCTTCAAGGACTTACCC R-ACGATTTCTGCTTGCCATTC
<i>lmo1118</i>	F-AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R-CGGCTTGTTCCGCATACTTA
ORF2819	F-AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R-CATCACTAAAGCCTCCCATTG
ORF2110	F-AGTGGACAATTGATTGGTGAA R-CATCCATCCCTTACTTTGGAC
<i>prs</i>	F-GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R-CAAAGAAACCTTGGATTGCGG

Det ble tillagd mastermix med blandingsforhold som vist i tabell 15.

Tabell 15 Quiagen Multiplex PCR

Mastermix	μl
2xQ	6
lmo0737F /lmo07377R	0,2
lmo1118F/ lmo1118R ¹	0,3
ORF2819F/ ORF2819R	0,2
ORF2110F/ ORF2110R	0,2
Prs	0,3
dH ₂ O	3,6
Totalt volum	12

Fordi det viste seg vanskelig å påvise det største fragmentet ble det gjort en PCR reaksjon der målet kun var å finne ut hvilke isolater som uttrykte dette fragmentet. Det ble kjørt PCR med betingelser vist i tabell 16.

Tabell 16 temperaturprofil PCR

Initiering	94 °C	3 min	
Denaturering	94 °C	0,40 min	} x35
Annealing	53 °C	1,15 min	
Extension	72 °C	1,15 min	
Final extension	72 °C	7 min	

3.3.1 Gelelektroforese

I PCR reaksjonen ble de fem genene *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* og *prs* amplifisert.

Prosedyre

Det ble benyttet samme prosedyre for gel-elektroforese som under pkt. 3.2.2, bortsett fra at karet ble koblet til strømkilden i 60 min.

3.4 16S rDNA sekvensering

Det ble plukket kolonier fra skåler med mellom 30-300 tellbare kolonier som beskrevet i pkt 3.7.5. Her ble det plukket både fra RLM- og BHI-skåler. Hver enkelt koloni ble strøket ut på BHI-skåler. Skålene ble inkubert ved 20 °C i 2 døgn.

Prosedyre

En koloni (1-2 mm) ble plukket fra skål med en 200 µl pipettespiss og avsatt i bunnen av en 96-brønns PCR-plate (Thermo-Fast®). PCR-platen ble deretter forseglet med brønnlokkstrips og plassert i mikrobølgeovn på maksimal effekt (750 W) i ett minutt.

3.4.1 PCR

Prosedyre

Følgende primere ble benyttet i PCR reaksjonen:

Tabell 17 Primere benyttet i PCR

Mangala F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
Mangala R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT

Det ble tillag mastermix med blandingsforhold vist i tabell 18.

Tabell 18 Blandingsforhold og reagenser Mastermix

5`hot Mastermix	5 µl
10pmol/µl Mangala F	0,25 µl
10pmol/µl Mangala R	0,25 µl
dH ₂ O	7 µl
Total	12,5 µl

PCR ble utført med temperaturprofil vist i tabell 19.

Tabell 19 PCR protokoll

Initiering	15 min	95 °C	} x35
Denaturering	30 s	94 °C	
Annealing	90 s	60 °C	
Extension	90 s	72 °C	
Final extension	10 min	72 °C	

3.4.2 Gelelektroforese

Etter PCR reaksjonen ble gel-elektroforesen utført for å kontrollere om dannelsen av PCR produkt hadde vært vellykket. Distinkte bånd i området indikerte vellykket PCR. Det ble benyttet samme prosedyre for gel-elektroforese som under sekvenstypingen pkt. 3.2.2

3.4.3 Pre-Sekvensering

Det ble foretatt en pre-sekvensering som beskrevet i pkt. 3.2.3

3.4.4 Sekvensering

Sekvenseringen ble utført på samme måte som i pkt. 3.2.4. Med unntak av at primeren Mangala F 3,2 μ M ble benyttet i mastermix i stedet for primer of 3,2 μ M.

3.4.5 Bearbeiding av sekvensdata

Behandlingen av sekvensdata ble som beskrevet i pkt. 3.4.5 gjort i Sequence skanner versjon 1.0 og Biolign versjon 2.0.9. Redigerte sekvenser som ble lagret som Fasta-filer og deretter lastet opp i 16s databasen (Blast server for the identification of prokaryotes) tilgjengelig på (<http://bioinfo.unice.fr/blast/>).

3.5 Direkte sekvensering

Hensikten med direkte sekvenseringen var å bestemme bakteriesammensetningen i suspensjon og i biofilm (på kupong). Det ble kun gjort direkte sekvensering av det siste gjentak i multikultur.

3.5.1 Isolering av DNA

Suspensjonsprøvene ble tatt direkte fra suspensjonen i multikultur. Prøvene fra biofilm ble tatt fra sonikeringsvæske. Etter prøveuttak av multikultur ved døgn 2,5 og 9 ble prøvene oppbevart ved -20 °C.

Prosedyre

Det ble benyttet et kommersielt kit (Blood & tissue kit, Qiagen) ved isoleringen av DNA. Tinte prøver ble sentrifugert ved 14000 rpm i 5 min. Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i 500 µl lysesbuffer (2x TE/ 1,2 % Triton X-100). Løsningen ble overført til Lysing Matrix B Fast-Prep rør (MP, medinor). Lysing av cellemembran ved Fast-Prep 2x 40 sek x 6 m/s. Mellom hver knusing ble løsningene holdt på is i 5 min. 360 µl av supernatanten ble overført til nye rør. For å inaktivere enzymene RNase og DNase ble det tilsatt 50 µl proteinase K før tilsatts av 400 µl buffer AL og inkubering ved 56 °C i 30 min. Det ble tilsatt 400 µl etanol (96 %) før dobbel applisering på kolonne (DNase Mini spin column, Qiagen) for å få med mest mulig prøvemateriale. Løsningen ble pipettert over i 2 ml oppsamlingsrør og sentrifugert ved 8000 rpm. i 1 min. Væsken i røret ble fjernet før kolonnen igjen ble plassert i oppsamlingsrøret. 500 µl buffer AW1 ble tilsatt før sentrifugering ved 8000 rpm i ett minutt. Væsken ble igjen fjernet før 500 µl buffer AW2 ble tilsatt og sentrifugert ved 14000 rpm i tre minutter. Kolonnen ble overført til et eppendorfrør før tilsatts av 100 µl buffer AE etterfulgt av inkubering ved romtemperatur i ett minutt og sentrifugering i ett minutt ved 8000 rpm.

Trinnene beskrevet i det foregående avsnittet ble utført av senioringeniør Merete Rusås Jensen ved Nofima, Ås. Metoden ble utført som beskrevet i DNeasy Blood & Tissue handbook 07/2006. I protokollen "Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin Column Protocol)" etter prosedyre 4-7.

3.5.2 PCR

Prosedyre

DNA ble fortynnet <20 ng/μl før PCR, denne ble beregnet ut fra DNA konsentrasjon målt ved nanodrop (NanoDrop Technologies, ND-1000 Spectrophotometer, USA).

Tabell 20 Blandingsforhold i Mastermix

Mastermix	μl
5 Prime HotMasterMix (2,5x)	10
Mangala F 10μM	0,5
Mangala R 10μM	0,5
H ₂ O	13
DNA	1,0
Totalt	25,0

Fortynnet DNA ble overført til 96-brønns PCR-brett (Thermo-Fast®) før tilsats av mastermix. PCR protokollen er vist i tabell 21.

Tabell 21 PCR protokoll

94 °C	4 min	x 30 syklar
94°C	30 s	
60°C	30 s	
72°C	30 min	
72°C	7 min	
4°C	hold	

2 μl ExoSap IT (affimetrix 78201, BioNordica) (fortynnet 1:5) ble sammen med 5 μl PCR-produkt (fortynnet 1:5) tilsatt et optisk 96-brønns reaksjonsplate. Denne ble satt i PCR blokk med følgende betingelser vist i tabell 22.

Tabell 22 Betingelser i PCR blokk

37 °C	30 min
80 °C	15 min

Det foregående trinnet ble gjort for å rense PCR-produktet.

3.5.3 Sekvenserings-PCR

Prosedyre

Etter rensingen av PCR-produktet ble det tillagd mastermix før sekvenserings-PCR med blandingsforhold vist i tabell 23.

Tabell 23 Blandingsforhold mastermix

Mastermix	µl
Big dye Buffer 5x	1,5
Big Dye v 1.1	1,0
U515Fc30 3,2 µM	1,0
H ₂ O	5,5
Renset PCR-produkt	1,0
Totalt	10

Sekvenserings-PCR ble gjort ved betingelser vist i tabell 24.

Tabell 24 PCR-protokoll

96 °C	15 sek	} x25
60 °C	4 min	
4 °C	hold	

Felling av PCR-produkt og sekvensering ble utført som beskrevet i pkt. 3.2.4

3.5.4 Statistisk tilnærming for å bestemme bakteriell konsentrasjonsprofil

Bestemmelsen av bakteriell konsentrasjonsprofil av hovedgruppene bakterier som forelå i prøvene er gjort på bakgrunn av (Zimonja et al., 2008), som tok i bruk metoden Multivariate curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) for å identifisere og kvantifisere ulike mikroorganismer i blandingskulturer. Metoden har også blitt benyttet for å bestemme konsentrasjonsprofil av ulike mikroorganismers tilstedeværelse i feces hos husdyrbesetninger (Rudi et al., 2012).

Følgende dataverktøy ble brukt i behandlingen av blandingspekter:

- MATLAB (MathWorks, Natick, MA)
- Unscrambler version 9.8 (Camo, woodbridge, NJ)

Heller enn å bruke sekvensdata der hver plass i sekvensen denoteres A, T, G eller C brukes et blandingspekter som rådata i analysen. MATLAB ble brukt til forbehandling av blandingspektrene. ALS ble gjort i Unscrambler med den hensikt å generere komponenter som fanger opp mest mulig av variasjonen i datasettet. Antallet komponenter ble ansett som optimalt når inkluderingen av nye komponenter ikke bidro til økt forklart varians i modellen. De prøvene som ble vist å være dominert av en bestemt komponent ble brukt til å representere denne komponentens bakterieslekt. For å estimere hvilken bakterieslekt den bestemte komponenten tilhørte ble det utført et BLAST-søk (pkt. 3.4.5).

3.6 Innledende Biofilmforsøk

I de innledende biofilmforsøkene ble det undersøkt hvordan *L. monocytogenes* vokser i biofilm (på kupong) og i suspensjon ved 12 °C og 20 °C. Begge medier ble benyttet. Det ble også undersøkt hvordan *L. monocytogenes* vekst ble påvirket når den fikk vokse sammen med andre arter innen slekten *Listeria*.

Det ble også undersøkt om de ulike stammene hadde forskjellig evne til festing på stålkupong. Det ble målt veksthastighet i for noen stammer i bioscreen.

3.6.1 Tillagning av bakterieblandinger

Stammene ble enkeltvis hentet ut fra stammesamling ved -20 °C, strøket ut på BHI-skåler og inkubert ved 15 °C i 3 døgn. 3-4 kolonier ble overført til respektive medier og inkubert aerobt ved 15 °C i 2 døgn. Stammene ble blandet sammen til en sluttkonsentrasjon på 10⁷ cfu/ml med bakgrunn i vekstforsøket (pkt. 3.2.4). Det ble gjort uttak av forkulturen slik at det kunne holdes rede på hva som ble tilsatt ved starttidspunktet.

3.6.2 Bestemmelse av veksthastighet ved Bioscreen

For å kontrollere om enkelte stammer hadde høyere veksthastighet i suspensjon ble det utført vekstforsøk i bioscreen.

Prosedyre

40 µl forkultur med bakteriekonsentrasjon på 10⁷ cfu/ml ble sammen med 360 µl respektivt medium tilsatt i hver brønn i bioscreenplater (Honeycomb 2 Plate Bioscreen C MBR). Kultur fra en stamme ble tilsatt i tre brønner. Hver tiende brønn fungerte som kontroll, i disse ble det tilsatt medium uten forkultur. Brettene ble plassert i Bioscreen (LabSystems Co, Helsinki, Finland). Ved 20 °C målinger hvert 20 min over en femdagers periode.

Det ble kun gjort ett gjentak med et utvalg stammer. Dette skyldes at forsøket brått måtte avbrytes grunnet HMS-hensyn.

For å sammenlikne veksthastigheten mellom de ulike stammene ble det tilpasset rette linjer på formen $y = ax+b$ for ved vekst i eksponentiell fase.

3.6.3 Initiell festing til stålkupong

Bakterienes evne til initiell festing til stålkupong ble bestemt etter tre timers inkubering i både BHI og laksmEDIUM.

Prosedyre

Sterile rustfrie stålkuponger (AISI 304, 2x2 cm) ble overført til sterile cellekulturbrett (Multi dish, 6 wells Nunc A/S, Roskilde Danmark) med steril pinsett (figur 3).



Figur 3 Rustfrie stålkuponger i cellekulturbrett.

Stammene ble enkeltvis hentet ut fra stammesamling ved -20°C , strøket ut på BHI-skåler og inkubert ved 15°C i 3 døgn. 3-4 kolonier ble overført til enten laksemEDIUM eller BHI og inkubert aerobt ved 15°C i 2 døgn. Med bakgrunn i vekstforsøket (pkt. 3.2.4), der det ble bestemt cfu/ml, ble det overført et bestemt volum av inokulumet i 12 ml media slik at sluttkonsentrasjonen ble 10^7 cfu/ml. 5 ml av denne blandingen ble overført til hver sin brønn i cellekulturbrettet. Cellekulturbrettene ble inkubert i 3 timer ved 15°C .

Det ble bestemt celletall på kupong som beskrevet i pkt. 3.6.4. Celletallet ble her oppgitt som $\log \text{cfu}/\text{cm}^2$. Det ble brukt enveis ANOVA i excel for å analysere eventuelle sammenhenger.

3.6.4 Bestemmelse av vekst i suspensjon og biofilmdannelse ved døgn 2,5 og 9.

Bestemmelse av vekst i suspensjon

Hver prøve ble fortynnet ved tifold fortynningsrekke i sterile rør med peptonvann. Det ble foretatt manuell uplatning på både BHI- og RLM-skåler. BHI skåler ble inkubert ved 20°C i to døgn. RLM skåler ble inkubert ved 37°C i 1 døgn. Bestemmelse av cfu/ml ble gjort ved hjelp av en automatisk tellemaskin.

Bestemmelse av vekst på kupong

Ved uttaket ble suspensjonen over kupongen fjernet før det ble tilsatt 5 ml dH₂O mot kanten av brønnen. Slik ble celler som ikke var godt festet skylt vekk. Kupongene ble med steril pinsett overført til sterile glassrør med flat bunn tilsatt 6 ml degasset dH₂O. Kupongen ble overført med samme side opp som de var plassert i cellekulturbrettet. For å fjerne løse celler fra kupongene ble rørene senket ned i et ultralydbad (40 kHz, BRANSON 3510, Branson Ultrasonic Corporation, USA) i 10 minutter. Etter sonikeringen ble rørene ristet lett for hånd før det ble tatt ut prøver. Hver prøve ble fortynnet ved tifold fortynningsrekke i sterile rør med peptonvann.

3.6.5 *L. monocytogenes* i miks

Det ble gjort tre forforsøk med *L. monocytogenes* i miks i BHI ved 20 °C, og to forforsøk med samme betingelser i laksemedium. Det ble gjort to forforsøk med *L. monocytogenes* i miks ved 12 °C i BHI og ett forforsøk med i tilsvarende betingelser i laksemedium. Det ble gjort uttak etter 2,5 og 9 døgn der vekst i suspensjon og vekst på kupong ble bestemt som beskrevet over.

3.6.6 *Listeria* miks

Det ble gjort ett forforsøk med *L. monocytogenes* og *L. spp* ved 20 °C i både LB og BHI. I tillegg ble det gjort ett forforsøk der *L. monocytogenes* vokste sammen med MF 3940 ved 20 °C i både laksemedium og BHI. Det ble gjort uttak etter 2,5 og 9 døgn der vekst i suspensjon og vekst på kupong ble bestemt som beskrevet over.

3.7 Biofilm hovedforsøk

For i størst mulig grad å simulere de betingelsene som eksisterer i et lakse- eller kjøttprosesseringsmiljø ble det valgt å gjøre alle hovedforsøk ved 12 °C.

Hensikten med hovedforsøket var blant annet å studere:

- Om det er forskjell mellom ulike *L. monocytogenes* evne til å etablere seg i biofilm.
- Hvordan de valgte isolater av *L. monocytogenes* konkurrer med hverandre i biofilm.
- Hvordan *L. monocytogenes* blir påvirket av *L. spp.*
- Om Gram-negative fra bakgrunnsflora kan hemme vekst av *L. monocytogenes* i biofilm.

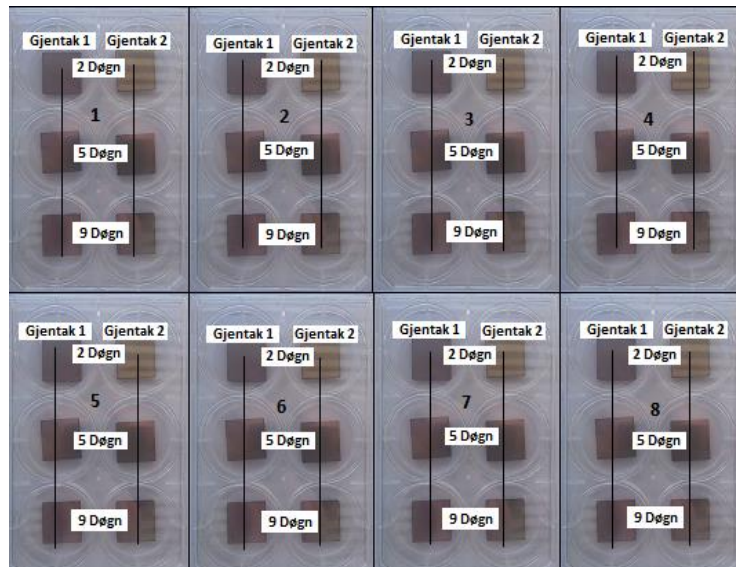
I hovedforsøket ble det arbeidet med fire ulike kulturer:

- *L. monocytogenes* i miks – *L. monocytogenes* (seks stammer i blanding)
- Listeriamiks - *L. monocytogenes* i miks og *L. spp* (fem stammer i blanding)
- G- miks - *L. monocytogenes* i miks og Gram negative (seks stammer i blanding)
- Multikultur – Listeriamiks og G- miks

Tabell 25 Isolater i de ulike kulturene

Stamme (art og MF-nr ¹)	Monokultur	Listeriakultur	<i>L. monocytogenes</i> og Gram negative	Multikultur
<i>L. monocytogenes</i> 3860	x	x	x	x
<i>L. monocytogenes</i> 4077	x	x	x	x
<i>L. monocytogenes</i> 3939	x	x	x	x
<i>L. monocytogenes</i> 4712	x	x	x	x
<i>L. monocytogenes</i> 4627	x	x	x	x
<i>L. monocytogenes</i> 4562	x	x	x	x
<i>L. sp</i> 3940		x		x
<i>L. sp</i> 4401		x		x
<i>L. sp</i> 4385		x		x
<i>L. sp</i> 4608		x		x
<i>L. sp</i> 4052		x		x
<i>Pseudomonas fragi</i> K96.4			x	x
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K96.6			x	x
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K96.7			x	x
<i>Serratia liquefaciens</i> K96.5			x	x
<i>Acinetobacter sp.</i> 4122			x	x
<i>Acinetobacter junii</i> 4124			x	x

Hver av de fire kulturrene ble inkubert i både laksemedium og BHI slik at det i alt ble åtte fulle cellekulturbrett, hovedoppsettet er vist i figur 4.



Figur 4 Hovedoppsett ved biofilmforsøk. 1) *L. monocytogenes* i miks, laksemedium 2) Listeriamiks, laksemedium 3) G-miks, laksemedium 4) Multikultur i laksemedium 5) *L. monocytogenes* i miks, BHI 6) Listeriamiks, BHI 7) G- miks, BHI 8) Multikultur i BHI

3.7.1 *L. monocytogenes* i miks

Det ble valgt ut seks stammer *L. monocytogenes*, disse ble blandet sammen til en sluttkonsentrasjon på 10^7 CFU/ml. Det ble gjort uttak av starttilsats, og etter 2,5 og 9 døgn der vekst i suspensjon og vekst på kupong ble kvantifisert.

Gjennomsnittet av to parallelle uttak er bakgrunnen for hvert prøvepunkt. Hvert forsøk generer således tre prøvepunkt, ett for hvert uttak. Standardavviket er beregnet over tilsvarende prøvepunkt for de tre gjentakene.

3.7.2 Listeriamiks

Det ble valgt ut seks stammer *L. monocytogenes* og fem stammer *L. sp.* Disse ble blandet sammen til en sluttkonsentrasjon på 10^7 CFU/ml slik beskrevet i pkt. 3.2.4. Det ble gjort uttak av starttilsats, og etter 2,5 og 9 døgn der vekst i suspensjon og vekst på kupong ble bestemt som beskrevet i pkt. 3.6.4. For å kunne skille *L. monocytogenes* fra *L. spp* ble det gjort utsæd på RLM-skåler. Standardavviket ble beregnet over tilsvarende prøvepunkt for de tre gjentakene.

3.7.3 G - miks

Respektive stammer stammer *L. monocytogenes* og Gram negative ble blandet sammen til en sluttkonsentrasjon på 10^7 CFU/ml slik beskrevet i pkt. 3.2.4. Det ble gjort uttak av starttilsats, og etter 2,5 og 9 døgn der vekst i suspensjon og vekst på kupong ble kvantifisert. For å kunne bestemme både antall *L. monocytogenes* og totalt antall bakterier ble det benyttet både RLM- og BHI-skåler. Standardavviket ble beregnet over tilsvarende prøvepunkt for de tre gjentakene.

3.7.4 Multikultur

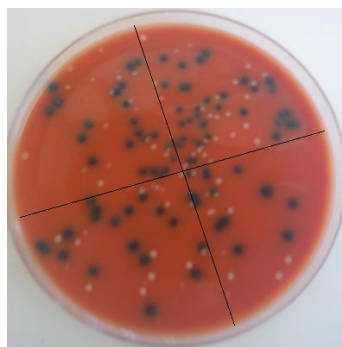
Respektive stammer *L. monocytogenes*, *L. spp* og Gram negative ble blandet sammen til en sluttkonsentrasjon på 10^7 CFU/ml slik beskrevet i pkt. 3.2.4. Det ble gjort uttak av starttilsats, og etter 2,5 og 9 døgn der vekst i suspensjon og vekst på kupong ble kvantifisert. For å kunne bestemme både antall *L. monocytogenes*, *L. spp* og totalt antall bakterier ble det benyttet både RLM- og BHI-skåler. Standardavviket ble beregnet over tilsvarende prøvepunkt for de tre gjentakene.

3.7.5 Identifisering av *L. monocytogenes* ved hjelp av sekvenstyping

For å kunne studere hvordan *L. monocytogenes* utviklet seg over tid i mono- og multikultur ble det tatt ut prøver til sekvenstyping av bakterieblending ved starttilsats, og etter 9 døgn.

Prosedyre

Det ble valgt ut et bestemt sone fra RLM-skål, der alle koloniene innenfor sonen ble plukket. Ved hjelp av en 1 µl podeøse ble hver enkelt koloni strøket ut på en BHI-skål og inkubert ved 37 °C i 1 døgn. Den videre sekvenstypingen er beskrevet i pkt 3.2.



Figur 5 RLM skål fra multikultur. Svarte kolonier er *L. monocytogenes*.

3.7.6 Identifisering av bakteriesammensetning i biofilm ved 16S rDNA sekvensering

For å kunne avgjøre hvilke stammer som dominerte i multikultur etter 9 dager ble det utført 16S rDNA sekvensering av suspensjon og biofilm fra multikulturforsøk.

Prosedyre

Det ble valgt ut et bestemt sone fra BHI-skål, der alle koloniene innenfor sonen ble plukket. Ved hjelp av en 1 µl podeøse ble hver enkelt koloni strøket ut på en BHI-skål og inkubert ved 20 °C i 2 døgn. Den videre analysen er beskrevet i pkt. 3.4.

3.7.7 Direktesekvensering

Det ble kun tatt ut prøver fra det siste gjentak for direktesekvensering. Det ble tatt prøver av suspensjon og sonikeringsvæske fra multikulturforsøket i BHI og laksemedium. Prøvene ble behandlet som i pkt. 3.5

3.7.8 Flourescence Mikroskopering

Det ble gjort parallelle biofilmforsøk for *L. monocytogenes* i miks og multikultur for mikroskopering. Vekst på stålkupong ble utført tilsvarende som biofilmforsøk med mediebytte på daglig basis.

Prosedyre

Stålkuponger med 9 døgns biofilmer fra *L. monocytogenes* i miks og multikultur ble farget og preparert med Filmtracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit (produsent). Kitet består av to komponent A(SYTO® green flourescent nucleic acid stain) og B(Propidium iodid). Det ble tilsatt 9 µl av komponent A og 3 µl komponent B i 1 ml sterilt vann. 200 µl av denne løsningen ble forsiktig påført stålkupong. Kupongene ble plassert mørkt i en plastboks i 20 min, før skylling med vann. Etter fargingen ble kupongene plassert i fuktete bokser for ikke å tørke ut veksten på kupongene. Før mikroskoperingen ble dekkglass påmontert stålkupongene ved hjelp av vakuumfett for å holde dekkglassene på plass og forhindre press på biofilmen. Bildene ble tatt som z-stacks ved bruk av Zeiss Axio Observer Z1 utstyrt med 40x oljeimmersjonsobjektive (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany). Ut av fokus fluorescens fra bakterier over og under fokusplanet for objektivet ble fjernet ved hjelp av dekonvolusjon i Zen Blue software (Zeiss).

4. RESULTATER

4.1 Uttesting av medier

Ved bestemmelse av vekst i suspensjon og biofilm var det nødvendig å kunne telle antall *L. monocytogenes*, *L. spp* og Gram negative på agar. For å danne seg et bilde av hvilke medier og agarer som skulle brukes i det videre arbeidet ble det utført visuelle tester og vekstforsøk.

4.1.1 Vekst i laksemedium

Laksemediets egnethet som vekstmedium ble utprøvd for å forsikre seg om at denne kunne inkluderes i det videre arbeidet. Alle de utvalgte isolatene innen *Listeria* og Gram negative ga synlig vekst i løsningen etter to døgn ved 20 °C.

4.1.2 Visuell differensiering av *Listeria*

Det ble gjort utstryk på RLM-skål for visuelt å kunne skille *L. monocytogenes* *L. spp* fra hverandre. Et slikt utstryk er vist i figur 5.



Figur 6 Utstryk på RLM. 1. *L. m* 1509 2. *L. spp* 3940 3. *L. spp* 4402 4. *L. m* 3860

Det ble observert tilstrekkelig visuell forskjell mellom *L. monocytogenes* og *L. spp* til å kunne skille dem på skål.

4.1.3 Vekstforsøk i laksemedium og BHI

Det ble kvantifisert vekst i cfu/ml etter ett og tre døgn for *Listeria* og Gramnegative ved 20 °C og etter to døgn ved 15 °C i både BHI- og laksemedium. Slik kunne det beregnes hvilke volumer av de ulike isolatene som skulle tilsettes for å oppnå en bestemt konsentrasjon ved tilleggning av forkultur til biofilm. (vedlegg 1)

4.2 Sekvens- og serotyping av *L. monocytogenes*

På bakgrunn av ulik MLVA profil ble det valgt ut en rekke stammer til sekvens- og serotyping av *L. monocytogenes*. I sekvenstypingen var målet å finne nok variasjon i et gen slik at dette kunne brukes til å skille mellom de enkelte isolater i dynamikkstudier. I serotypingen var hensikten å dele *L. monocytogenes* inn i fire serovariantgrupper.

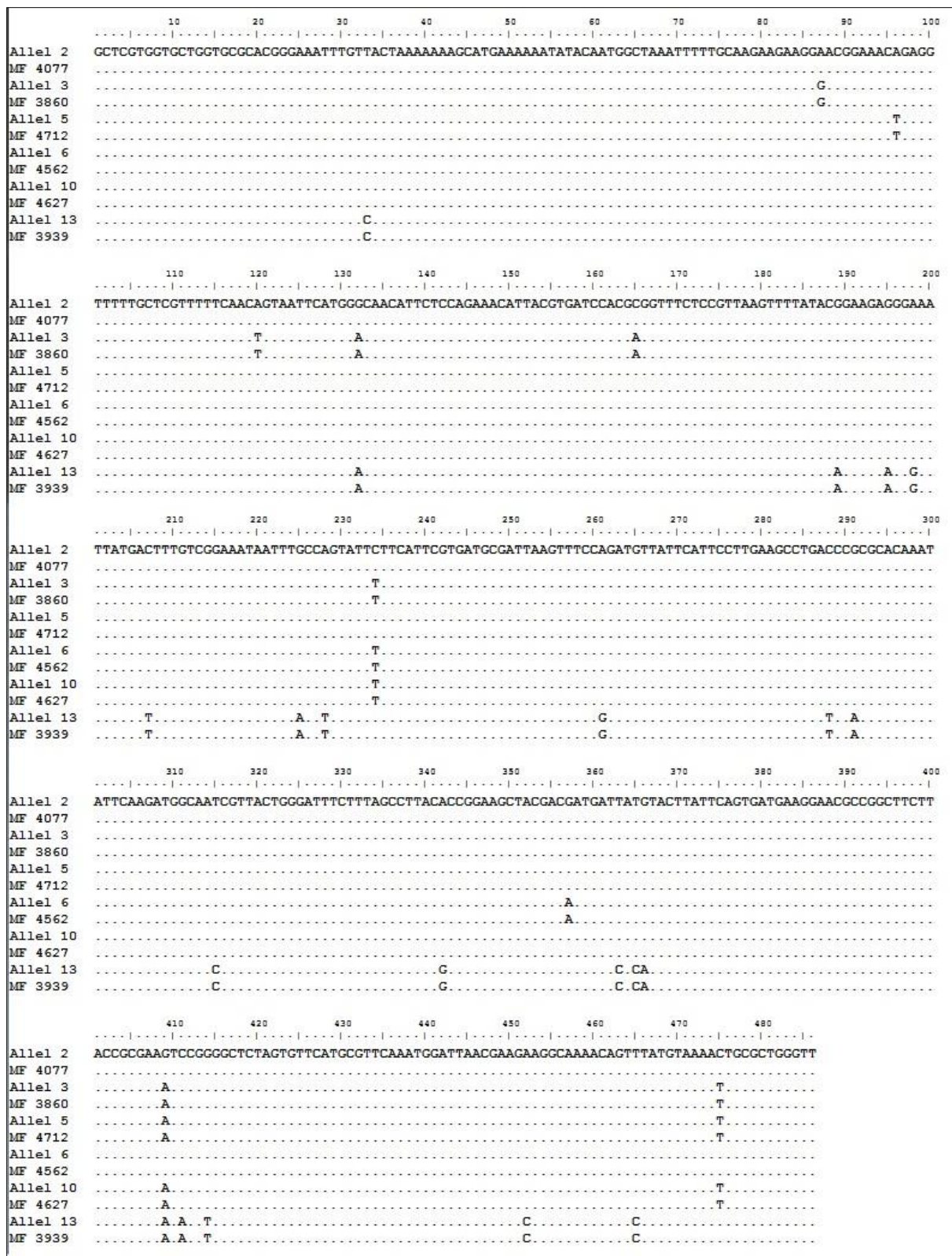
4.2.1 Sekvenstyping

I sekvenstypingen ble de fire husholdningsgenene *abc*, *cato*, *dap*, og *bgl* sekvensert. Hvert gen ble gitt ett allelnummer ved å sammenlikne med kjente allelnummer i databasen (Pasteurinstituttet, 2011a). Slik kunne det gjøres et utvalg av de stammene som lot seg differensiere. Det ble funnet størst variasjon blant stammene i husholdningsgenet *cat*. Det ble valgt ut seks stammer med ulike alleler i *cat* genet. Tre fra kjøttindustri og tre fra lakseindustri.

Tabell 26 Utvalg av seks ulike stammer til dynamikkstudier i biofilm på bakgrunn av variasjon i *cat* genet.

MF-nr	Stamme	Bransje	Cat
3860	<i>L. monocytogenes</i>	Laks	3
4077	<i>L. monocytogenes</i>	Laks	2
3939	<i>L. monocytogenes</i>	Laks	13
4712	<i>L. monocytogenes</i>	Kjøtt	5
4627	<i>L. monocytogenes</i>	Kjøtt	10
4562	<i>L. monocytogenes</i>	Kjøtt	6

Figur 7 viser typiske eksempler på de sekvenser som var utkom av sekvenstypingen. De seks stammene ble sammenliknet med kjente alleler slik at dette kunne bestemmes. Allel 13 skiller seg mest ut fra de øvrige allelene.

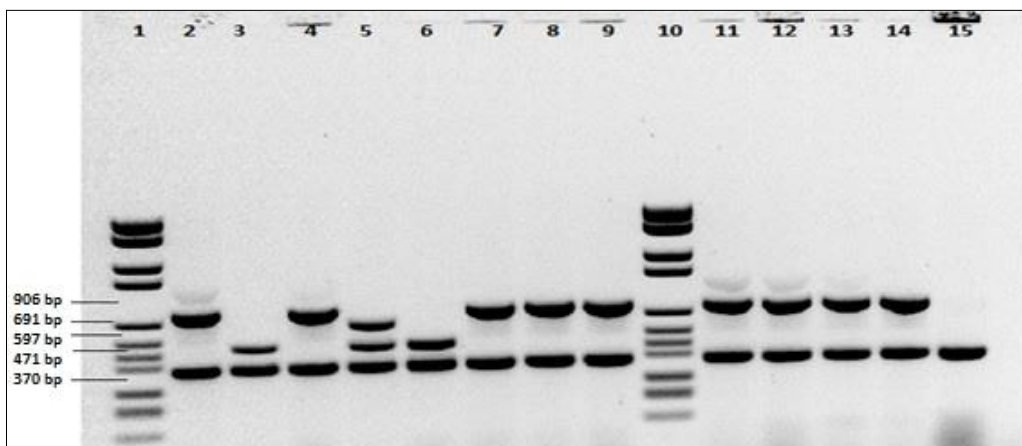


Figur 7 Variasjoner i genen *cat* (486 bp) blant de seks utvalgte *L. monocytogenes*. Alleler brukt som standarder (2,3,5,6,10 og 13) er hentet fra Pasteurinstituttet (Pasteurinstituttet, 2011a).

4.2.2 Serotyping

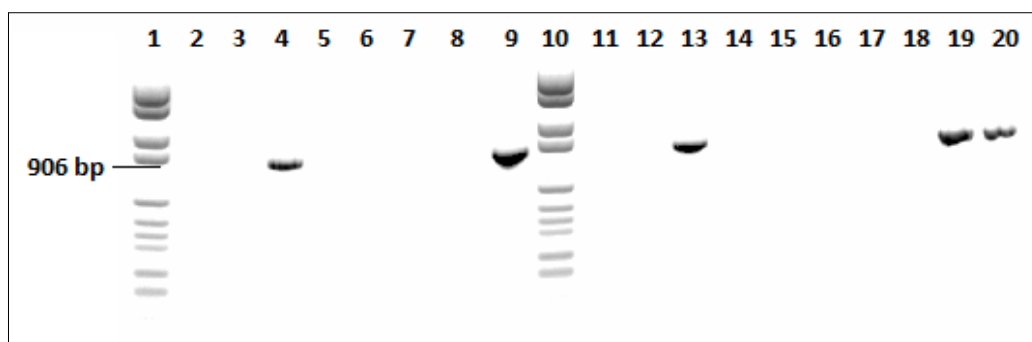
Stammene ble serotypet ved hjelp av multiplex-pcr. Bakgrunnen for å skille 1/2a, 1/2b, 1/2c og 4b i fire distinkte grupper er ulikt uttrykk av de fire genene *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819, og ORF2110. Alle *Listeria* uttrykker det slektsspesifikke fragmentet *prs* (Doumith et al., 2004a).

Figur 8 viser gelelektroforeseproduktene ved amplifisering av de fire genene *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819, ORF2110 og *prs*. Det ble ikke observert tydelige bånd for det største fragmentet *lmo1118* ved 906 bp. Det betød at det ikke var mulig å skille serovariantgruppe 1/2a fra 1/2c, i og med at sistnevnte kjennetegnes ved amplifisering av dette fragmentet.



Figur 8 Gelelektroforese A *lmo1118* ved 906 bp, B *lmo0737* ved 691bp, C ORF2110 ved 597 bp, D ORF2819 ved 471 bp E *prs* ved 370 bp. 1. Std. VI 2. MF 2624 3. MF 3132 4. MF 3134 5. MF 1509 6. MF 2184 7. MF 3638 8. MF 4712 9. MF 4627 10. Std. VI 11. MF 4562 12. MF 4554 13. MF 4545 14 MF 3861 15 MF 3940.

For å kunne skille serovariantgruppen 1/2a fra 1/2c var det nødvendig å studere hvilke isolater som ga PCR-produkt for *lmo1118*. Figur 9 viser gelelektroforeseproduktene ved amplifisering av kun *lmo1118*. Isolatene som uttrykte *lmo1118* ble ansett for å tilhøre serovariantgruppe 1/2c. Figur 8 viser amplifiseringen av PCR produktet ved 906 bp.



Figur 9 1. Std. VI 2. MF 3006 3. MF 3132 4. MF 3134 5. MF 1509 6. MF 3921 7. MF 4254 8. MF 3858 9. MF 2624 10. Std. VI 11. MF 3006 12. MF 3132 13. MF 3134 14 MF 1509 15. MF 2184 16. MF 3638 17. MF 4712 18. MF 4627 19. MF 4562 20. MF 4554

Ved å sammenlikne båndene fra begge PCR reaksjoner ble stammens serovariantgruppe bestemt. Tabell 27 oppsummerer det arbeidet som ble gjort i sekvens- og serotypingen.

Tabell 27 Oppsummering – sekvens og serotyping. De ulike stammens serovariant og allelnummer for genene *abc*, *cat*, *dap* og *bgl*. Ubestemt sekvenstype grunnet ufullstendig amplifisert sekvens U. Nærmeste funn N.

MF-nr	Serovar ¹	Sekvenstype			
		cat	abc	dap	bgl
<i>L. m</i> 1509	4b	11	1	11	38
<i>L. m</i> 2624	1/2a	6	6	20	5
<i>L. m</i> 3853	1/2a	10	7	8	14
<i>L. m</i> 3860	1/2a	3	17	6	S
<i>L. m</i> 4077	1/2a	2	5	9	S
<i>L. m</i> 3939	1/2a	5	8	6	N 6
<i>L. m</i> 3995	1/2a	5	5	7	N 8
<i>L. m</i> 3870	1/2a	10	5	S	14
<i>L. m</i> 3921	1/2a	2	5	9	N 6
<i>L. m</i> 4254	1/2 a	2	S	19	N 6
<i>L. m</i> 3858	1/2 a	8	7	8	S
<i>L. m</i> 2184	1/2b	3	4	N 3	4
<i>L. m</i> 3638	1/2 a	5	5	7	8
<i>L. m</i> 4712	1/2a	4	5	7	8
<i>L. m</i> 4627	1/2a	10	7	21	8
<i>L. m</i> 4545	1/2 c	6	6	4	N 5
<i>L. m</i> 4554	1/2 c	6	6	S	5
<i>L. m</i> 4562	1/2 c	6	6	4	5
<i>L. m</i> 3861	1/2a ³	3	S	S	S
<i>L. m</i> 3940	L.sp	40	26	108	S
<i>L. m</i> 3132	1/2b ²				
<i>L. m</i> 3134	1/2c ²				
<i>L. m</i> 3006	1/2a ²				

¹ Metoden skiller ikke; 1/2a fra 3a, 1/2c fra 3c, 1/2b fra 3b og 7 eller 4b fra 4d og 4e.

² Antatt serovariant 1/2a, selv om dette er *L. spp.*

³ Benyttet som referanse med kjent serovariant

4.3 Forforsøk – biofilm

I de innledende biofilmforsøkene ble det undersøkt hvordan *L. monocytogenes* vokser i biofilm (på kupong) og i suspensjon ved 12 °C og 20 °C. Begge medier ble benyttet. Det ble også undersøkt hvordan *L. monocytogenes* vekst ble påvirket når den fikk vokse sammen med andre arter innen slekten *Listeria*.

Bakgrunn for valg av de seks *L. monocytogenes* isolatene

- Tre stammer isolert i kjøtt- og tre stammer isolert i lakseprosesseringsanlegg.
- Dynamikken til hvert enkelt isolat ble bestemt ved å velge ut stammer med ulike alleler innenfor genet *cat* (pkt. 4.2.1)

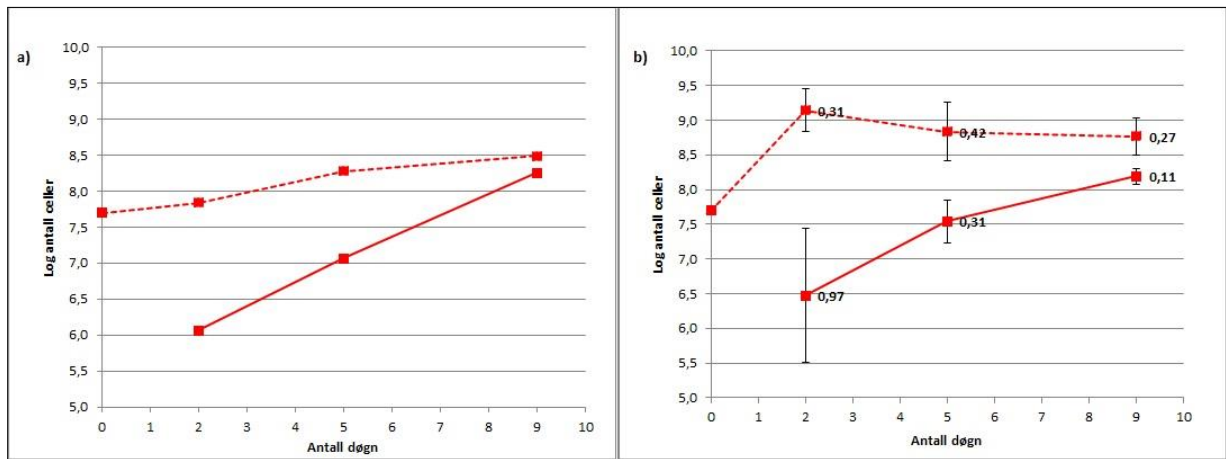
Kulturer i forforsøket:

- *L. monocytogenes* i miks – *L. monocytogenes* seks stammer i blanding
- Listeriamiks - *L. monocytogenes* og *L. spp* fem stammer i blanding
- *L. monocytogenes* miks sammen med stamme *L.sp* (MF 3940).

4.3.1 *L. monocytogenes* i miks

Figur 10a) viser vekst av *L. monocytogenes* i miks i suspensjon og biofilm. Starttilsatsen ble ikke målt ved utplating på skål og er beregnet ut fra antatt celletall i forkulturen (i forforsøk). Antall celler i både biofilm og suspensjon økte fra døgn 2 til døgn 9. Ettersom det kun ble gjort ett gjentak ved 12 °C foreligger ingen standardavvik.

Figur 10b) viser vekst av *L. monocytogenes* i miks i suspensjon og biofilm i BHI. Antall celler i biofilmen ved døgn 2 var ulikt mellom de to gjentakene og resulterte i standardavvik på 0,97 log antall celler for denne målingen.

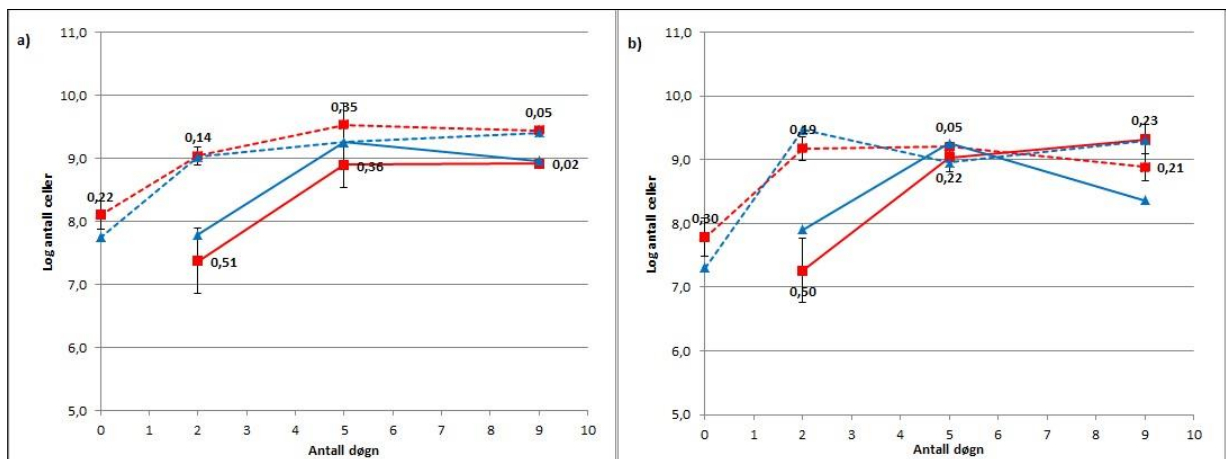


Figur 10 Vekst av *L. monocytogenes* i miks i biofilm og suspensjon ved 12 °C a) laksemedium b) BHI. Veksten er oppgitt som log antall celler er per kupong (for biofilm) og per ml for suspensjon. Første uttaksdag for biofilm var døgn 2. Det ble kun gjort ett gjentak i laksemedium. Forsøket ble gjentatt to ganger i BHI, med standardavviket mellom de to gjentakene indikert på figuren. Starttilsatsen er beregnet fra forkultur og ikke målt ved platespredning.

4.3.2 *L. monocytogenes* i miks og Listeriamiks

Figur 11a) viser vekst av *L. monocytogenes* i miks og listeriamiks i suspensjon og biofilm. Standardavviket mellom to gjentak er indikert i figuren for *L. monocytogenes* i miks. Det ble kun gjort ett gjentak med listeriamiks, og det er derfor ikke beregnet standardavvik. Antall celler *L. monocytogenes* i miks økte mellom døgn 2 og døgn 5, men var stabil mellom døgn 5 og døgn 9 i biofilm. Det ble ikke observert økning i log antall celler mellom døgn 2 og døgn 9 for *L. monocytogenes* i miks i suspensjon.

Figur 11b) viser vekst av *L. monocytogenes* i miks og listeriamiks i suspensjon og biofilm. Standardavviket mellom to gjentak er indikert i figuren for *L. monocytogenes* i monokultur. Det ble kun gjort ett gjentak der listeriamiks ble inkludert, og det er derfor ikke beregnet standardavvik. Antall celler *L. monocytogenes* i miks økte kraftig fra døgn 2 til 5 (7,26-8,95 log antall celler) i biofilm. Antall celler i suspensjon var nærmest konstant fra døgn 2 til døgn 9, dette gjald både for *L. monocytogenes* i miks og listeriamiks.



Figur 11 Vekst i biofilm og suspensjon av *L. monocytogenes* i miks (rødt) og listeriamiks (blått) ved 20 °C. a) i laksemedium b) BHI. Første uttaksdag for biofilm var døgn 2. Veksten er oppgitt som log antall celler per kupong (for biofilm) og per ml for suspensjon. Det ble kun gjort ett gjentak for listeriamiks. Forsøket ble gjentatt to ganger for blandingskultur med standardavviket mellom de to gjentakene indikert på figuren. Startilsatsen er beregnet fra forkultur og ikke målt ved platespredning.

Det ble også gjort et biofilmforsøk der *L. monocytogenes* i miks vokste sammen med *L. spp* 3940 ved 20 °C. MF3940 påvirket ikke *L. monocytogenes* i miks nevneverdig (resultater ikke vist).

4.4 Biofilm hovedforsøk

Hovedtrekk forforsøk:

- Det ble observert tregere akkumulering av biofilm ved 12 °C enn ved 20 °C.
- Antall celler i biofilm etter 9 døgn varierte lite med temperatur.
- Det ble ikke observert nevneverdige forskjeller i biofilmdannelse mellom *L. monocytogenes* i miks og listeriamiks.
- *L. monocytogenes* biofilmdannelse økte mest mellom døgn 2 og døgn 5 uavhengig av vekstmedier ved 20 °C.

For i størst mulig grad å simulere temperaturen i et produksjonsmiljø ble det besluttet å bruke 12 °C i alle hovedforsøkene. Beslutningen hadde også bakgrunn i forforsøket der det ble observert at tidsintervallet med vekst i biofilm økte ved lavere temperatur. Laksemediet ble brukt til å simulere et lakseprosesseringsmiljø, mens BHI simulerte et kjøttprosesseringsmiljø.

Det ble gjort tre gjentak av Hovedforsøkene:

- *L. monocytogenes* i miks – *L. monocytogenes* (seks stammer i blanding)
- Listeriamiks - *L. monocytogenes* i miks og *L. spp* (fem stammer i blanding)
- G- miks - *L. monocytogenes* i miks og Gram negative (seks stammer i blanding)
- Multikultur – Listeriamiks og G- miks

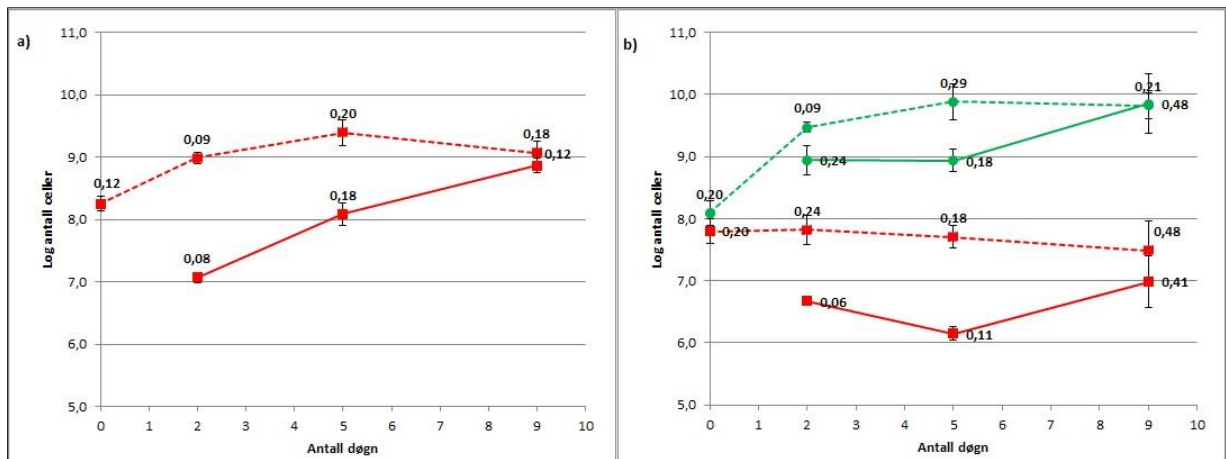
L. monocytogenes ble dyrket i miks og i multikultur. Hensikten med dette var å studere hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg og danner biofilm når den er alene og når den er sammen i en mer kompleks multikultur hvor den opplever større konkurranse. Formålet med å inkludere listeriamiks var å se hvordan andre listeriaarter påvirket vekst og overlevelse av *L. monocytogenes*. Ved å inkludere G- miks var hensikten å se hvordan representanter fra bakgrunnsflora påvirker vekst og overlevelse av *L. monocytogenes*.

I dynamikkstudiene var det ikke bare interessant å se hvordan *L. monocytogenes* konkurrerte i de ulike blandingene i form av celledtall. Det var av særs interesse å kunne bestemme i hvilken andel hvert isolat ble tilsatt – og hvilket som var igjen etter 9 døgn. Hvilke bakterier som dominerte i biofilmen ble også undersøkt.

4.4.1 Vekst av *L. monocytogenes* i miks - og multikultur

Figur 12a) viser *L. monocytogenes* bakterietall i biofilm og i suspensjon (over biofilm). Antall celler i biofilm økte over tid fra døgnet 2 til døgnet 9. Antall celler i suspensjon økte fra døgnet 2 til døgnet 5 og minket fra døgnet 5 til 9. De tre gjentakene hadde lave standardavvik (0,08-0,20 log antall celler).

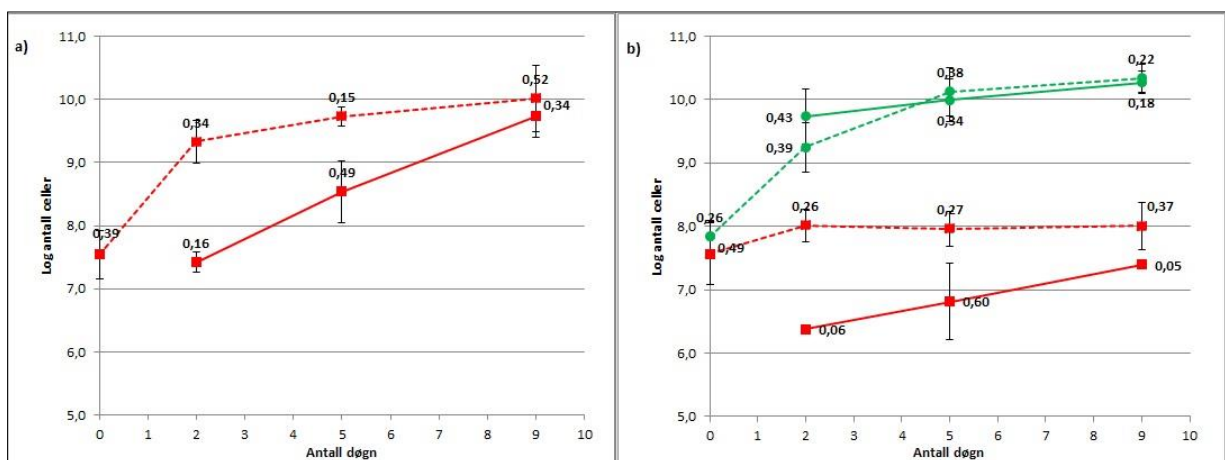
Figur 12b) viser vekst av *L. monocytogenes* miks og totaltall i multikultur. Antall celler *L. monocytogenes* i biofilm minket fra døgnet 2 til 5 og økte fra døgnet 5 til 9. Antall celler *L. monocytogenes* i suspensjon minket gradvis fra 2 til 9 døgnet. Den totale biofilmdannelsen var stabil mellom 2 og 5 døgnet og hadde en økning mellom 5 og 9 døgnet. Den totale veksten i suspensjon var nærmest stabil gjennom 9 døgnet.



Figur 12 Vekst i biofilm og suspensjon ved 12 °C i laksemedium. Veksten er oppgitt som log antall celler er per kupong (for biofilm) og per ml for suspensjon. a) *L. monocytogenes* i miks biofilm (heltrukken) og suspensjon (stiplet). b) Multikultur; *L. monocytogenes* i miks i biofilm (heltrukken rød) og suspensjon (stiplet rød), totaltall i biofilm (heltrukken grønn) og suspensjon (stiplet grønn). Første uttaksdag for biofilm var døgnet 2. Standardavvikene er basert på tre gjentak og indikert med loddrette feilfelt og verdi.

Figur 13a) viser antall celler *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon (over biofilm). *L. monocytogenes* biofilmdannelse økte jevnt fra døgnet 2 til 9. *L. monocytogenes* vekst i suspensjon var stabil mellom døgnet 2 og 9. Standardavvikene varierte fra 0,16 -0,52 log antall celler.

Figur 13b) viser antall celler som en funksjon av tid for *L. monocytogenes* og totaltall i multikultur. *L. monocytogenes* biofilmdannelse og vekst i suspensjon var nærmest stabil fra 2 til 9 døgnet. Totaltall i biofilm var nærmest stabilt mellom 2 og 9 døgnet. Totalt antall bakterier økte mellom døgnet 2 og 5 og var stabilt mellom døgnet 5 og 9. Standardavvikene varierte fra 0,06-0,60 log antall celler.



Figur 13 Vekst i biofilm og suspensjon ved 12 °C i BHI. Veksten er oppgitt som log antall celler er per kupong (for biofilm) og per ml for suspensjon. a) Blandingskultur; *L. monocytogenes* i biofilm (heltrukken) og suspensjon (stiplet). b) Multikultur; *L. monocytogenes* i miks i biofilm (heltrukken rød) og suspensjon (stiplet rød), totaltall i biofilm (heltrukken grønn) og suspensjon (stiplet grønn). Første uttaksdag for biofilm var døgnet 2. Standardavvikene er basert på tre gjentak og indikert med lodrette feilfelt og verdi.

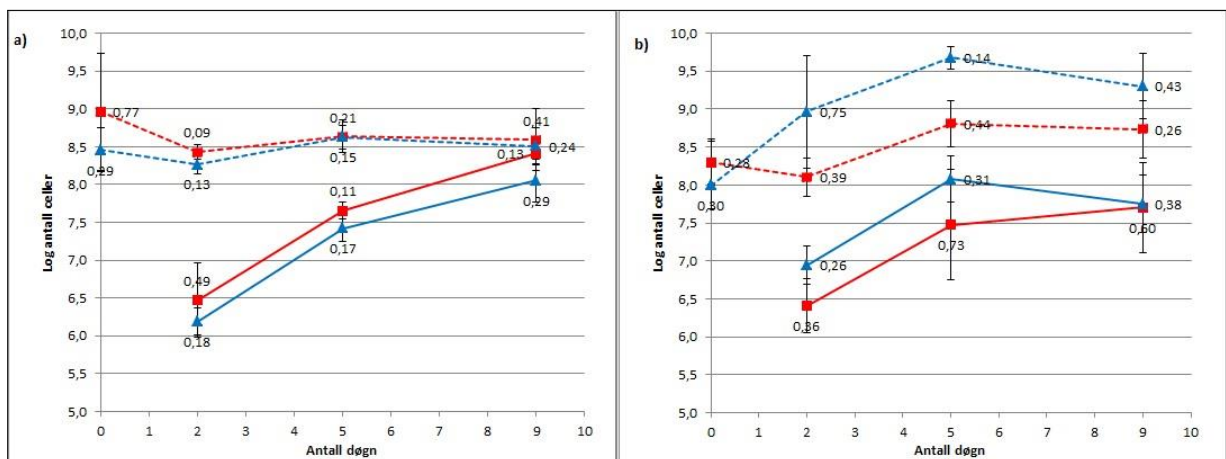
Hovedtrekk – vekst av *L. monocytogenes* i miks og i multikultur.

- *L. monocytogenes* biofilmdannelse økte over tid der den vokste i miks.
- *L. monocytogenes* biofilmdannelse var lavere i multikultur enn i miks.
- *L. monocytogenes* biofilmdannelse i miks så ikke ut å bli påvirket av vekstmedium.
- Uavhengig av vekstmedium var den samlede biofilmdannelsen høyere i multikultur, enn i *L. monocytogenes* i miks.
- De to mediene så ikke ut til å være forskjellige med tanke på å gi grobunn for vekst.

4.4.2 Vekst av *L. monocytogenes* i konkurranse med *L. spp*

Listeriamiksen bestod av i alt elleve stammer innen slekten *Listeria*. Fordi *L. monocytogenes* kunne skilles fra *L. spp* på RLM-skål kunne det bestemmes celledtall i biofilm og suspensjon av *L. monocytogenes* og *L.spp* hver for seg.

Figur 14 Viser vekst av *L. monocytogenes* og *L. spp* i listeriamiks over tid. Etableringen av *L. spp* i biofilm var høyere i BHI enn i laksemedium. Det kunne synes som *L.spp* vokste bedre enn *L. monocytogenes* i BHI. Antall celler i biofilm ved 9 døgn var høyere i laksemedium enn i BHI. Det var ikke mulig å anta forskjeller i vekst verken i biofilm eller suspensjon mellom *L. monocytogenes* og *L. spp* i laksemedium.



Figur 14 Listeriamikser. Vekst i biofilm og suspensjon av *L. monocytogenes* i miks (rødt) og *L. spp* (blått) ved 20 °C a) laksemedium b) BHI. Første uttaksdag for biofilm var døgn 2. Veksten er oppgitt som log antall celler er per kupong (for biofilm) og per ml for suspensjon. Standardavvikene er basert på tre gjentak og indikert med lodrette feilfelt og verdi.

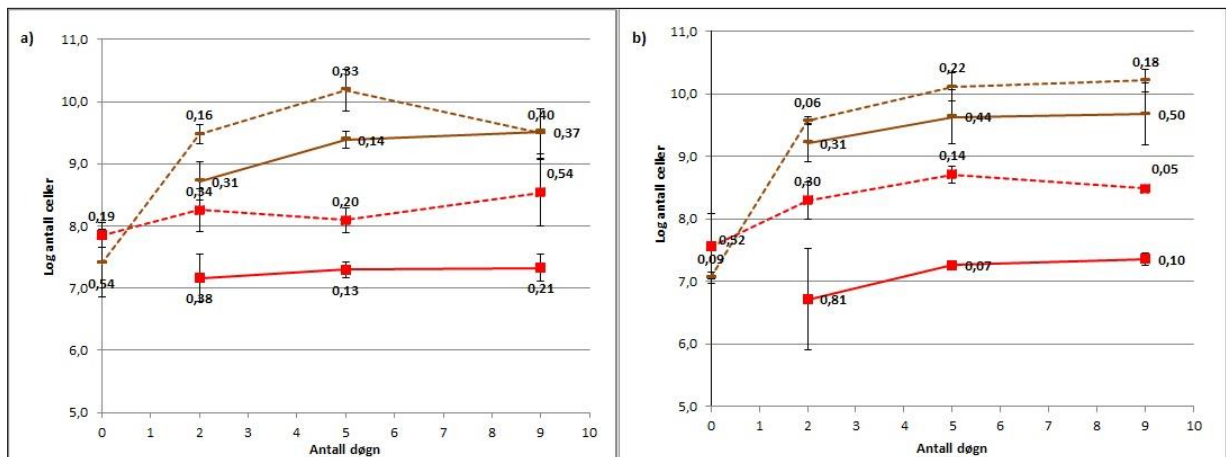
Hovedtrekk Listeriamikser:

- Antydning til høyere biofilmdannelse i laksemedium enn i BHI.
- Det ble observert antydning til bedre biofilmdannelse blant *L.spp* i BHI.
- Ingen vesentlige forskjeller i biofilmdannelse mellom *L. monocytogenes* og *L. spp* ble observert.

4.4.3 Vekst av *L. monocytogenes* i konkurranse med Gram negative

Figur 15a) viser log antall celler som en funksjon av tid for *L. monocytogenes* og Gram negatives biofilmdannelse og vekst i suspensjon i laksemedium. Log antall celler *L. monocytogenes* er jevn fra 2 til 9 døgn. I suspensjonen er log antall celler på samme nivå fra 2 til 9 døgn, grunnet standardavviket ved døgn 2 (0,34 log antall celler) gjør det ikke mulig å anta forskjell i log antall celler mellom 2 og 5 døgn. Log antall celler Gram negative i biofilm økte mellom døgn 2 og døgn 5, og er stabilt mellom døgn 5 og 9. Log antall celler Gram negative i suspensjon økte mellom dag 2 og 5 og minket mellom døgn 5 og 9. Starttilsatsen av *L. monocytogenes* var høyere enn starttilsatsen av Gram negative. Standardavvikene mellom gjentakene varierer mellom 0,13 og 0,54 log antall celler *L.monocytogenes* og 0,14 og 0,40 log antall celler for Gram negative.

Figur 15b) viser log antall celler som en funksjon av tid for *L.monocytogenes* og Gram negatives biofilmdannelse og vekst i suspensjon i BHI. Log antall celler *L. monocytogenes* i biofilm er jevnt lavt fra døgn 2 til 9, det ble observert stor variasjon i log antall celler ved døgn 2 i biofilm. I suspensjonen er log antall *L.monocytogenes* stabilt fra døgn 2 til 5 døgn, med en nedgang fra 2 til 5 døgn. Log antall celler Gram negative i biofilm er stabilt fra 2-9 døgn. Log antall celler gram negative i suspensjon øker fra døgn 2 til 5, og er stabilt mellom døgn 5 og 9.



Figur 15 a) laksemedium b) BHI. Vekst av *L. monocytogenes* i biofilm (rød heltrukket linje), vekst av *L. monocytogenes* i suspensjon (rød stiplet linje), vekst av Gram negative i biofilm (brun heltrukket linje) og Gram negative i suspensjon (brun stiplet linje). Veksten er oppgitt som log antall celler er per kupong (for biofilm) og per ml for suspensjon. Standardavvikene er basert på tre gjentak og indikert med lodrette feilfelt og verdi.

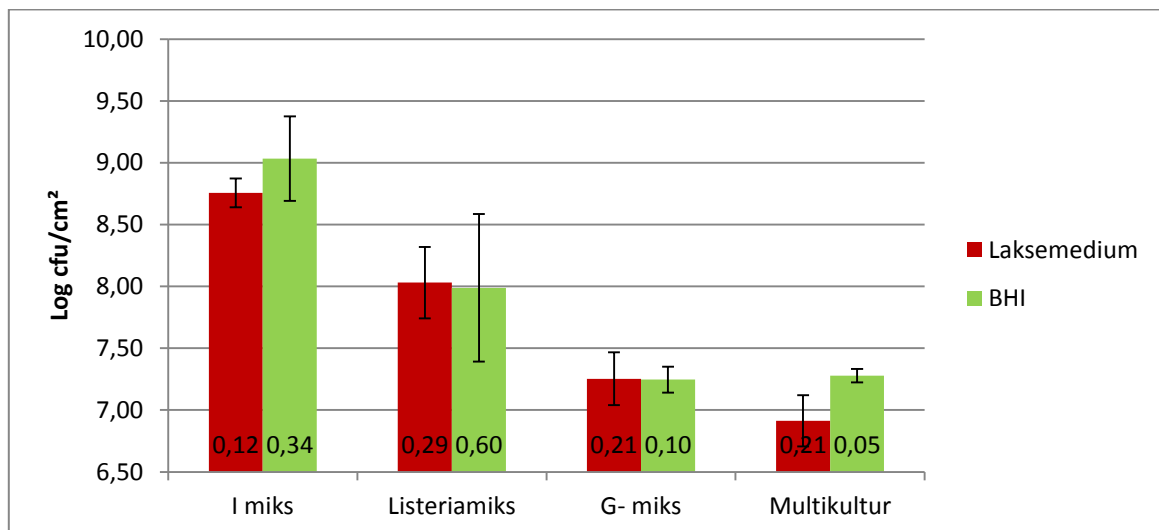
Hovedtrekk – *L. monocytogenes* i konkurranse med Gram negative

- De Gram negative oppnår langt høyere celletall i både biofilm og suspensjon enn *L.monocytogenes*.
- Vekst og biofilmdannelse av både *L. monocytogenes* og de Gram negative så ikke ut til å avhenge av vekstmedium.

4.4.4 Hemming av *L.monocytogenes* i biofilm

L. monocytogenes celletall i biofilm etter 9 dager er høyest der den vokser alene i miks. *L. monocytogenes* celletall ble betraktelig hemmet i listeriamiks, G- miks og i multikultur.

Hemmingen av *L.monocytogenes* i 9 døgns biofilm var høyest i laksemedium multikultur.



Figur 16 Antall *L. monocytogenes* i de fire ulike blandingene uttrykt som Log cfu/cm² (kupong). Standardavvikene er basert på tre gjentak og indikert med loddrette feilfelt og verdi.

4.5 Dynamikk i biofilm og suspensjon

I dynamikkstudiene ble *L. monocytogenes* dynamikk sammenliknet når den vokste i miks, og når den konkurrerte i en mer kompleks multikultur. For å bestemme andelen av hver av de seks *L. monocytogenes* isolatene ble det plukket kolonier fra RLM-skåler med mellom 30 og 300 kolonier. Det ble plukket kolonier innenfor en bestemt sone slik at ingen spesiell kolonitype skulle favoriseres. Dette ble gjort for å sikre at det utvalget som ble gjort var representativt for *L. monocytogenes* i multikultur. Deteksjonsgrensen er direkte avhengig av hvor mange kolonier som ble plukket og sekvensert, og er således et mål på hvilket nivå det er mulig å oppdage isolatene på skålen de ble plukket fra. I laksemedium varierte deteksjonsnivået mellom (0,04 og 0,08) i BHI varierte deteksjonsnivået mellom (0,04 og 0,11).

Figur 17 viser forholdet mellom de seks *L. monocytogenes* isolatene i starttilsats, suspensjon og biofilm i laksemedium. I det første gjentak ble alle de seks isolatene vist å være tilstede i starttilsatsen. I suspensjonen i miks ble det kun påvist fem av isolatene. I biofilmen ble alle seks isolatene påvist. I multikulturen ble fem isolater påvist i suspensjonen, men kun fire i biofilmen. Sett under ett er det ikke vesentlige forskjeller i forholdet mellom isolatene fra starttilsats til 9 døgn i det første gjentak. Unntaket er MF 3860 som kun ble påvist i miks, men ikke i multikultur.

I gjentak 2 ble kun fem isolater påvist i starttilsatsen. 50 % av isolatene i starttilsatsen var MF 4712. I suspensjonen i miks ble de samme fem isolatene påvist som i starttilsatsen, her hadde andelen MF 4712 økt betraktelig fra starttilsatsen (13-38 %). I biofilmen i miks ble det kun påvist fire isolater. MF 4562 og MF 3939 utgjorde hovedandelen av isolatene med henholdsvis 38 % og 31 %. I suspensjonen i multikulturen ble fire isolater påvist. I biofilm multikultur ble kun tre isolater påvist. MF 4077, MF 3939 og MF 4712 utgjorde like andeler av de påviste isolatene.

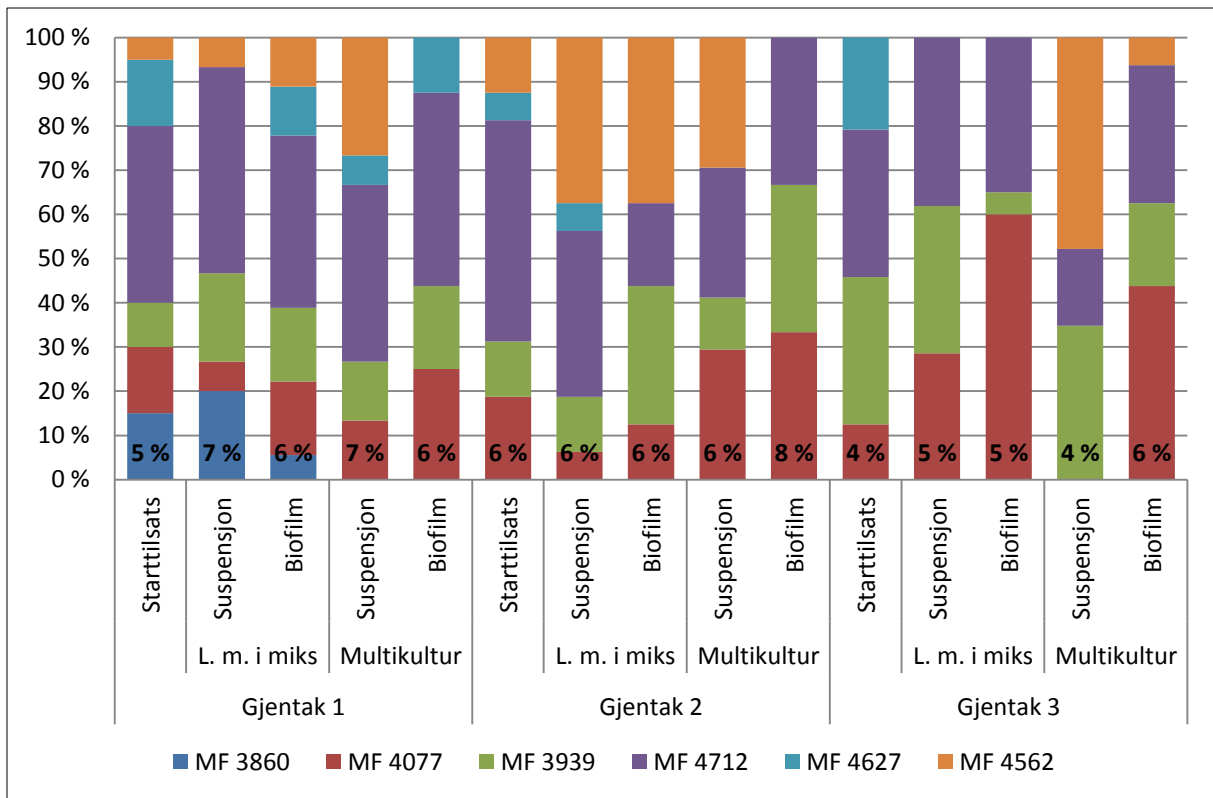
I det tredje gjentak ble kun fire isolater påvist i starttilsatsen. I miksens suspensjon ble det påvist tre isolater. I biofilm ble det påvist tre isolater, hovedandelen ble utgjort av MF 4077 med 60 %. Suspensjon multikultur ble det påvist tre isolater, MF 4562 utgjorde hovedandelen med 48 %. I biofilm multikultur ble det påvist fire isolater.

Figur 18 viser forholdet mellom de seks *L. monocytogenes* isolatene i starttilsats, suspensjon og biofilm i BHI. *L. monocytogenes* dynamikk ble sammenliknet når den vokste i miks, og når den konkurrerte i en mer kompleks multikultur.

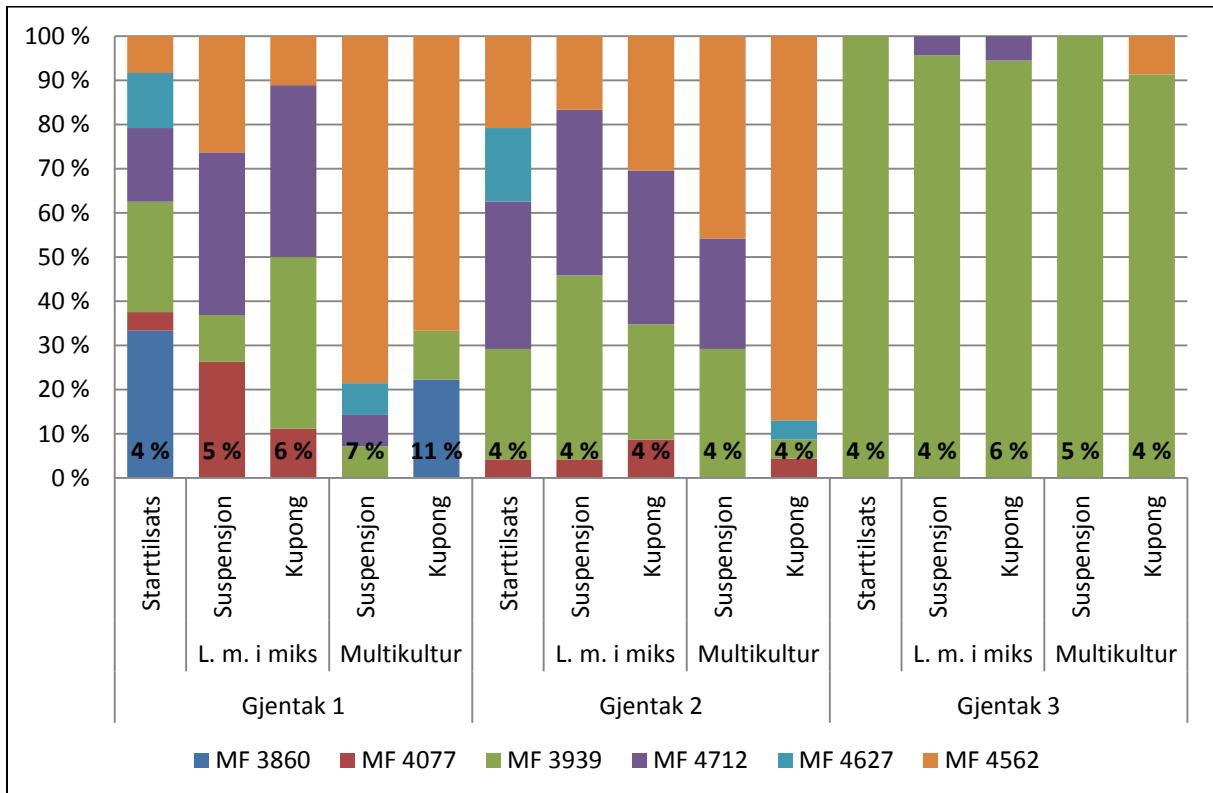
I starttilsatsen i det første gjentak ble alle de seks isolatene påvist. I multikulturen dominerte MF 4562 både i biofilm og suspensjon med henholdsvis 67 % og 79 % av isolatene. I gjentak 2 dominerte MF 4562 i biofilm, særlig i multikultur 87 %. I gjentak 3 ble kun MF 3939 påvist i starttilsats. MF 4562 ble påvist i biofilm i multikultur. MF 4712 ble påvist i miks.

Hovedtrekk dynamikkstudier:

- MF 4077, MF 3939 og MF 4712 dominerte i laksemedium uavhengig om de vokste i miks eller multikultur
- MF 4562 dominerte biofilmen i BHI multikultur, men ble kun påvist ved ett gjentak i biofilm multikultur i laksemedium.



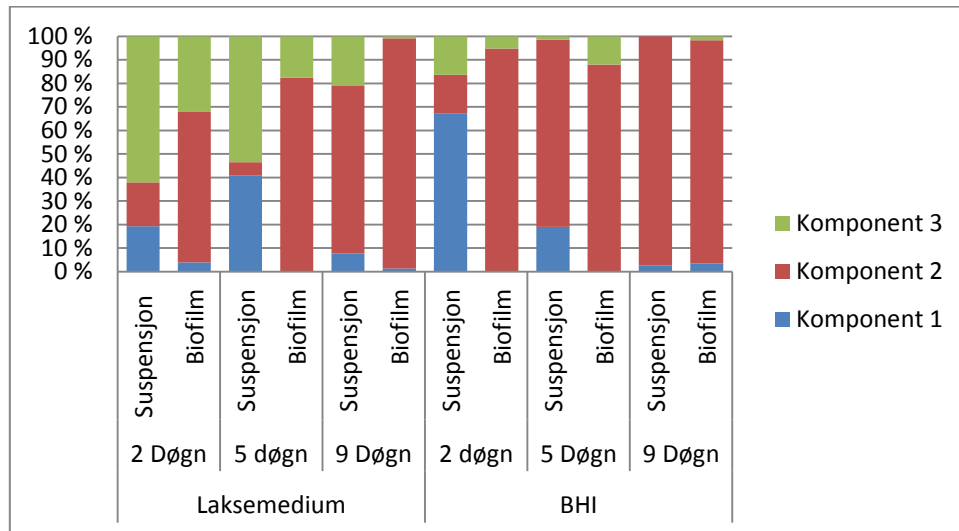
Figur 17 *L. monocytogenes* – Dynamikk i laksemedium. Prosentandel av de seks isolatene der de forelå i miks, og i enn mer divers multikultur. Forholdet mellom de ulike stammene i startilsats og etter 9 døgns vekst i suspensjon og biofilm. Deteksjonsgraden (markert nederst ved hver søyle) gjelder for alle isolatene i søylen.



Figur 18 *L. monocytogenes* – Dynamikk i BHI. Prosentandel av de seks isolatene der de forelå i miks, og i enn mer divers multikultur. Forholdet mellom de ulike stammene i startilsats og etter 9 døgns vekst i suspensjon og biofilm. Deteksjonsgraden (markert nederst ved hver søyle) gjelder for alle isolatene i søylen.

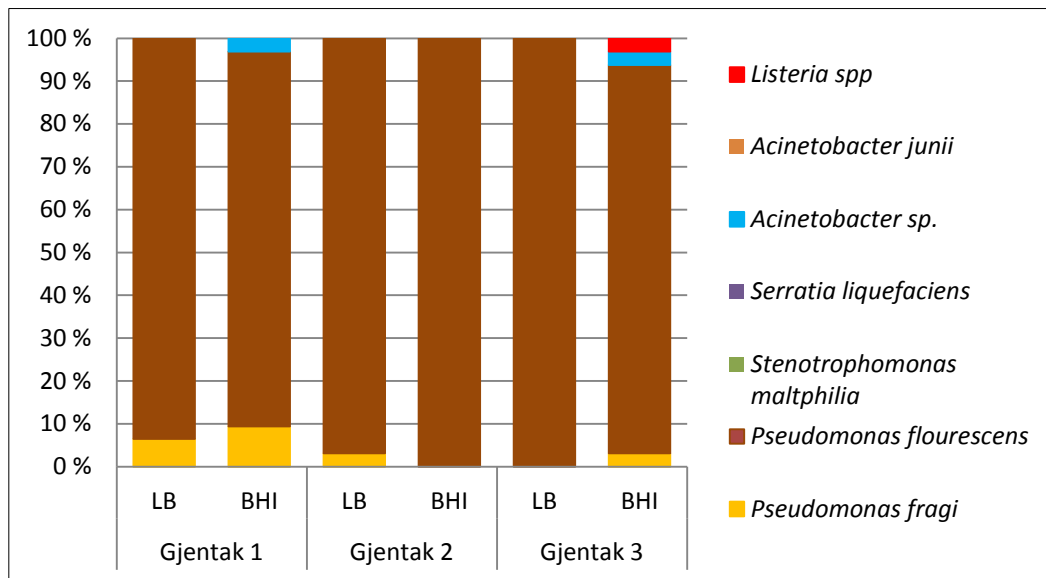
4.5.1 Bakteriesammensetning i multikultur

MCR-ALS analysen identifiserte 3 komponenter som forklarte variasjonen i datamaterialet (Figur 19). Det ble kun valgt ut tre komponenter da inkluderingen av flere komponenter ikke bidro til økt forklart varians i modellen. Representativ slekt for hver komponent ble antatt ved BLAST-søk (pkt. 3.4.5) på det prøvepunktet som viste høyest andel av den bestemte komponenten. Biofilmen i begge medier domineres av komponent 2 over tid. Komponent 3 er mer fremtredende i laksemedium enn i BHI.



Figur 19 Bakteriesammensetning i suspensjon og biofilm (på kupong) forklart ved tre komponenter. Komponent 1 representeres av slekten *Listeria* (BHI-2 døgn suspensjon 77%). Komponent 2 representeres av slekten *Pseudomonas* (Laksemedium-9 døgn biofilm 99%). Komponent 3 representeres av slekten *Serratia* (Laksemedium-5 døgn suspensjon 72%).

Det ble gjort 16S rDNA sekvensering for å undersøke total bakteriesammensetning i multikulturbiofilmene etter 9 dagers inkubering. *Pseudomonas fluorescens* dominerte alle de tre gjentakene. Det ble påvist *pseudomonas fragi*, *Acitenetobacter sp.*, men i svært lave andeler.

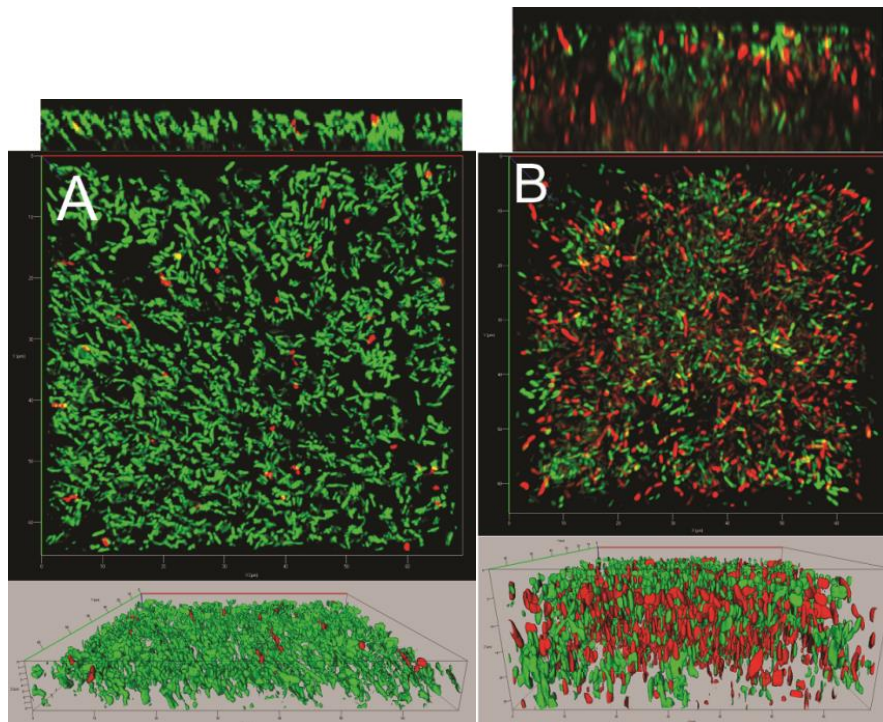


Figur 20 Sammensetningen av bakgrunnsflora etter 9D i multikulturforsøkene. Deteksjonsgrensen var 3 % for alle gjentak.

Hovedtrekk bakteriesammensetning multikultur:

- *Pseudomonas fluorescens* dominerte i 9 døgns biofilmer i multikultur.
- MCR-ALS analysen antydte at komponent 2 representert av *Pseudomonas* økte over tid i biofilmen.

Ved farging med live/dead og påfølgende epi fluorescence mikroskopiing ble det observert tydelige forskjeller i tykkelse mellom *L. monocytogenes* i miks og multikulturbiofilm etter 9 døgn (figur 1). Overflategjengivelsen for multikulturbiofilmen viser en mer kompleks og tykkere tredimensjonal struktur enn biofilmen dannet av *L. monocytogenes* i miks.

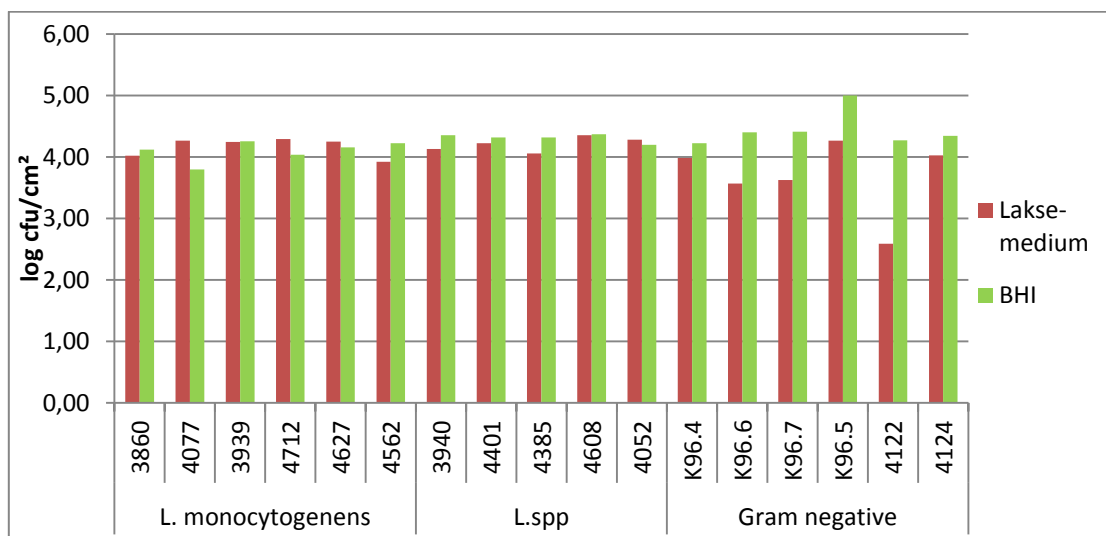


Figur 21 Vekst på stålkupong med BHI. Toppramme – vinkelrett snitt. Midtramme – utvidet snitt. Bunnramme – overflategjengivelse i 3D (3D surface rendering) A) *L. monocytogenes* i miks, filmtykkelse 8 μm B) Multikultur, filmtykkelse 30 μm

4.5.2 Initielt feste til stålkupong og veksthastighet i suspensjon

I dynamikkstudiene av monokultur ble det vist at visse *L. monocytogenes* isolater oftere ble påvist i biofilm etter 9 døgns vekst enn andre. I dynamikkstudiene av multikultur ble det påvist at *Pseudomonas fluorescens* dominerte i biofilm etter 9D. Som følge av disse observasjonene ble det studert om det var forskjeller i det initielle feste på stålkupong blant *L. monocytogenes*, *L. spp* og de Gram negative.

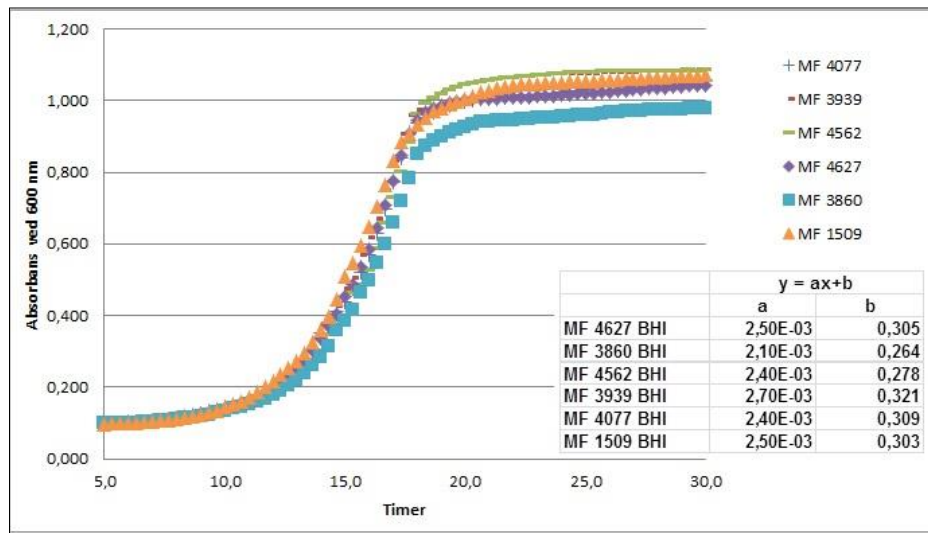
Figur 22 viser de ulike bakterienes evne til initiell festing på stålkupong etter 3 timers inkubering i både BHI og laksemedium. Hensikten med dette var å avgjøre i hvilken grad de ulike isolatene ville bidra i den senere biofilmdannelsen.



Figur 22 Viser *L. monocytogenes*, *L.spp* og Gram negatives evne til initielt feste på stålkupong etter tre timer ved 15 °C.

Det var ikke signifikant forskjell mellom initielt feste for *L. monocytogenes* i laksemedium og BHI. De Gram negative hadde signifikant bedre initielt feste enn *L. monocytogenes* i BHI, men ikke i laksemedium. Det var ikke signifikant forskjell mellom initielt feste for *L.spp* i laksemedium og BHI. Det var signifikant bedre initielt feste for Gram negative i BHI enn i laksemedium ($p=0,017$). Det ble ikke påvist forskjell i feste mellom *L. monocytogenes* og *L.spp* i laksemedium, men signifikant bedre feste av *L.spp* i BHI ($p=0,026$). *Listeria* hadde signifikant bedre evne til initielt feste enn Gram negative i laksemedium ($p=0,014$).

Veksthastigheten av ulike stammer ble bestemt i ved hjelp av bioscreen. Det ble konstruert rette linjer for å sammenlikne veksthastighet. Ingen av de testede stammene skilte seg betraktelig med tanke på veksthastighet i BHI.



Figur 23 Veksthastighet av seks stammer *L. monocytogenes* i BHI ved 20 °C. Målinger ble foretatt hvert 20 minutt, hvert målepunkt i figuren er gjennomsnittet av tre målinger. BHI uten bakterietilsats ble kjørt som kontroll mellom hver tredje prøve (ikke indikert i figuren).

5. DISKUSJON

Listeria har evne til å etablere seg og vokse i matproduksjonsmiljøer og danne husstammer. Slike husstammer kan overleve i årevis i matproduksjonsmiljøer, der biofilmdannelse er en mulig overlevelsesstrategi. Kunnskap om hvorfor *Listeria* har evne til å overleve i matproduksjonsmiljø er mangelfull. Ny kunnskap er derfor nødvendig for å forstå hvordan *Listeria* overlever matproduksjonsmiljøer, og hvordan vekst og overlevelse påvirkes av andre bakterier.

I denne oppgaven ble det valgt ut isolater av *L. monocytogenes* fra laks- og fra kjøttindustri. De fleste isolert etter vask og desinfeksjon. Det ble valgt ut andre *Listeria* fra de samme prosessanleggene, disse lot seg skille ved dyrkningsbaserte teknikker. Det ble også inkludert bakteriestammer for å representere bakgrunnsflora alle isolert etter vask og desinfeksjon i ulike lakseprosesseringsanlegg.

For å undersøke hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg og vokser på overflater sammen med andre *Listeria*, med stammer fra bakgrunnsfloraen eller i en mer kompleks multikultur, ble fire ulike bakteriekulturer bestående av blandinger av definerte bakterier i to ulike vekstmedier inkludert i studier av biofilm. Mediene var ment å simulere næringsbetingelser i henholdsvis laks- og kjøttindustri.

I dynamikkstudiene ble det undersøkt hvordan ulike stammer av *L. monocytogenes* konkurrerte med hverandre over tid. Denne konkurransen ble undersøkt der *L. monocytogenes* forelå i miks, og der de konkurrerte i en mer divers multikultur. Sekvenstyping ble brukt for å skille isolatene. Bakteriesammensetningen i multikulturbiofilmer ved forsøksstart og etter 9 dagers biofilmdannelse ble bestemt ved 16S rDNA sekvensanalyser.

5.1 Typing av *L. monocytogenes*

Dyrkningsbaserte teknikker viste seg effektive med tanke på å skille *L. monocytogenes* fra andre arter innen slekten *Listeria*. Men for å kunne gjøre studier av ulike isolaters dynamikk i biofilm var det nødvendig med en mer sensitiv teknikk. Ved å benytte seg av genotypiske metoder som påviser forskjeller i gensekvenser, vil metodens oppløselighet øke betraktelig i forhold til metoder som baserer seg på fenotypiske uttrykk.

I denne oppgaven ble det serotypet ved bruk av et multiplex PCR assay utviklet av Doumith et al. 2004. Av de 13 serovarianter innen arten *L. monocytogenes* er det kun fire serovarianter som i hovedsak isoleres fra mat og matproduksjonsmiljø (Gianfranceschi et al., 2009) og bidrar til hovedandelen humane listeriosetilfeller (Doumith et al., 2004b, Jacquet et al., 2002). Ettersom serovariantene 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d, og 7 sjeldent blir isolert fra mat og sjeldent er årsak til listeriose, er det dermed mer hensiktsmessig å dele 1/2a, 1/2b, 1/2c og 4b i fire distinkte grupper enn å kunne skille 1/2a fra 3a, 1/2c fra 3c, 1/2b fra 3b og 7, og 4b fra 4d og 4e. Det var imidlertid ikke mulig å amplifisere alle de fem fragmentene ved hjelp av én PCR reaksjon slik som beskrevet i metoden (Doumith et al., 2004a). For å skille serovariant 1/2a og 1/2c ble det gjort PCR med det formål å amplifisere det største fragmentet. Ved sammenligning av PCR produktene fra full og delvis amplifisering kunne stammene deles inn i fire distinkte grupper. Metoden er svært enkel i den forstand at PCR-produktene ble skilt ved gelelektroforese uten at videre analyser var nødvendige.

De fleste stammene ble vist å tilhøre serovariant 1/2a, dette er den vanlig isolert serovariant fra matproduksjonsmiljø. De få isolatene som ble vist å være serovariant 1/2c var alle fra isolert fra et produksjonsanlegg for kjøtt. Sammenheng mellom kjøttprosesseringsmiljø og serovariant 1/2c har blitt påpekt av flere (Gianfranceschi et al., 2009, Parisi et al., 2010).

En rekke metoder for seksvenstyping av *L. monocytogenes* er utviklet slik som multi-locus virulent sekvenstyping MLVST (Zhang et al., 2004), multi-locus sekvenstyping MLST (Salcedo et al., 2002) og multippel-locus variable-number tandem-repeats analyse MLVA (Lindstedt et al., 2008). Typing kan være et nyttig verktøy for å følge kontamineringsveier i matproduksjonsmiljø. Sekvenstypingen som ble gjort i denne oppgaven tok i bruk fire av de sju genene som vanligvis inkluderes i en full MLST. I denne metoden gir hvert av de syv genenes allelnummer en bestemt sekvenstype (ST) (Salcedo et al., 2002). Fordi det kun ble funnet allelnummeret til fire gener, ble det heller ikke antatt sekvenstype. Målet var da heller ikke å bestemme sekvenstyper, men å ha en rask metode å skille mellom ulike isolater. De

ulike isolatene viste seg å ha størst variasjon innen genet *cat*. Det viste seg derfor mest hensiktsmessig å velge isolater med ulike allelnummer i *cat* for dynamikkstudiene. Slik at de enkelte *L. monocytogenes* isolater kunne differensieres når de forelå i miks.

Alle de seks isolatene i *L. monocytogenes* monokultur tilhørte linje II (5 hadde serovariant 1/2a og 1 1/2c). Sammenhengen mellom fylogenetisk inndeling og biofilmdannelse er undersøkt av flere. Djordevic et al. (2002) observerte høyere biofilmdannelse blant linje I stammer, men sammenhengen er også vist motsatt vei der linje II stammer hadde høyest biofilmdannelse (Borucki et al., 2003). At de seks isolatene hadde evne til å vokse og overleve på overflater var allerede kjent ettersom de alle ble isolert fra næringsmiddelindustri etter vask og desinfeksjon.

5.2 Forforsøk biofilm

I de innledende biofilmforsøkene ble det undersøkt hvordan *L. monocytogenes* vokser i biofilm (på kupong) og i suspensjon ved 12 °C og 20 °C. Begge medier ble benyttet. Det ble også undersøkt om *L. monocytogenes* vekst ble påvirket når den vokste sammen med andre arter innen slekten *Listeria*.

Der *L. monocytogenes* vokste i blandingskultur var økningen av celler i biofilm jevn over tid. Denne tendensen ble vist å gjelde i begge medier (figur 10a og 10b). Celletall i suspensjon og celletall i biofilm nærmet seg gradvis slik at det forelå tilsvarende antall celler i biofilm og suspensjon etter 9 døgn. Det er naturlig å anta at det etter 9 døgn ved 12 °C forelå en likevekt mellom celler i suspensjon og de som er festet til biofilmen. Ved 20 °C skjedde brorparten av biofilmdannelsen mellom døgn 2 og døgn 5, mellom døgn 5 og døgn 9 var antall celler *L. monocytogenes* nærmest uforandret (figur 11). Dette indikerte at likevekten mellom celler i suspensjon og biofilm innstilte seg raskere ved høyere temperatur. Denne temperatureffekten så ikke ut til å avhenge av vekstmedium. Ved å velge 12 °C som standardtemperatur i de videre studiene av biofilmdannelse, ble det antatt at intervallet med jevn vekst i biofilm ble utvidet. Dermed ville det være større mulighet for å observere konkurranse mellom ulike bakterier.

Det ble undersøkt hvordan *L. monocytogenes* vekst ble påvirket av *L. spp* ved 20 °C i laksemedium og BHI (figur 11). Det ble ikke bemerket store forskjeller i vekst i suspensjon mellom *L. monocytogenes* i miks og *L. monocytogenes* sammen med *L.spp*. Etter to døgn var det høyre antall *L. monocytogenes* i biofilm der *L. spp* var introdusert i begge medier. Dette funnet indikerte at *L. spp* påvirket *L. monocytogenes* positivt i etableringen av biofilm, men ettersom det kun ble gjort ett gjentak i hvert medium kunne sammenhengen være tilfeldig. Det ble besluttet å se nærmere på hvordan *L. spp* påvirket *L. monocytogenes* i hovedforsøket.

5.3 Biofilm hovedforsøk

5.3.1 Vekst av *L. monocytogenes* i miks- og multikultur

L. monocytogenes ble dyrket i miks og i multikultur. Hensikten med dette var å studere hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg og danner biofilm når den er alene og når den er sammen i en mer kompleks multikultur hvor den opplever større konkurranse.

L. monocytogenes i miks dannet biofilm med høye celletall (10^6 - 10^7 cfu/cm²) allerede etter 2 døgn i begge vekstmedier (figur 12a og 13a). Biofilmdannelsen økte fra dag 2 til dag 9 i begge medier. Hastigheten på biofilmdannelsen var høyest der *L. monocytogenes* vokste i miks. *L. monocytogenes* celletall i biofilm ved døgn 9 var betraktelig høyere der den vokste i miks enn da den vokste i de andre kulturene.

Det er tidligere gjort forsøk med biofilmdannelse i medier tilsvarende laksemediet benyttet i denne oppgaven, Gram et al. (2007) senket stålkuponger ned i to ulike medier basert på kjøttløse og kaldrøkt laks. Mediene ble inokulert med 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes*. Etter 2 døgn ved 20 °C var det 10^5 - 10^6 cfu/cm² *L. monocytogenes* på kupongene (Gram et al., 2007). I denne oppgaven ble det funnet høyere celletall på kupong ved 2 døgn ved lavere temperatur og høyere konsentrasjon i starttilsats 10^7 cfu/ml.

I multikultur konkurrerte *L. monocytogenes* med en kompleks flora bestående av andre *Listeria*-arter og Gram negative (figur 12b og 13b). Det er flere mulige scenarier for hvordan *L. monocytogenes* påvirkes i nærvær av andre arter; ingen påvirkning, stimulans eller undertrykking. I denne oppgaven ble det først og fremst sett eksempler på undertrykking. Det ble observert lavere nivåer av *L. monocytogenes* i multikulturbiofilm enn da den vokste i miks. Det ble i begge medier observert at andre bakterier i multikulturen hemmet *L. monocytogenes* evne til å danne biofilm med høye celletall. Ettersom antall *L. monocytogenes* i biofilm var stabil eller sakte økende over tid, var det snakk om hemming snarere enn drap. I laksemedium ble det observert en nedgang i celler i biofilm fra døgn 2 og døgn 5. Dette var det eneste eksempelet på nedgang i celletall for antall *L. monocytogenes* i biofilm. I det store og hele var antall *L. monocytogenes* i multikulturbiofilm stabile over tid.

I den biofilmen som ble dannet i multikultur utgjorde *L. monocytogenes* 0,15 % av den totale biofilmpopulasjonen i laksemedium (figur 12b) og 0,13 % i BHI etter 9 døgn (figur 13b). Hemming av *L. monocytogenes* i multikultur ved 21 °C er vist tidligere der totalpopulasjonen har vært 1,8 %, i konkurranse med *Pseudomonas fragi* og *Staphylococcus xylois* (Norwood & Gilmour, 2001). Populasjonsnivåer mellom 10^4 og 10^6 cfu/cm² ble observert der *L. monocytogenes* ble dyrket i ulike multikulturer med arter som *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* og *Micrococcus* (Jeong & Frank, 1994). Slike studier ikke uten videre er sammenliknbare, hverken med hverandre eller denne oppgaven på grunn av ulike isolater, temperaturer og medier, men disse bakterienes evne til å hemme *L. monocytogenes* er tydelig.

I disse forsøkene ble *L. monocytogenes* tilsatt i svært høye (10^7 cfu/ml) konsentrasjoner sammenliknet med hva som vil være naturlig i matproduksjonsmiljø. Derfor er populasjonsnivåene av *L. monocytogenes* i 9 døgns biofilm ikke overførbare til hva som kan forventes i et matproduksjonsmiljø. Men selv om bakterier i bakgrunnsflora kan redusere *L. monocytogenes* evne til å etablere seg og vokse, elimineres ikke bakterien. Ettersom lave nivåer av bakterien er tilstrekkelig til å utgjøre fare for matvaretryggheten og regelverket krever fravær av bakterien i 25 g produkt, representerer ikke bakterier i bakgrunnsfloraen løsningen på listeriaproblematikken.

Mens biofilmdannelsen i miks økte gradvis fra døgn 2 til 9, var celletallet i suspensjonen nærmest stabil over tid (figur 12a og 13a). Fordi det ble byttet vekstmedium hvert døgn (unntatt døgn 3 og 4) skyldes den veksten som ble observert i suspensjon celler som beveget seg fra biofilm og ut i suspensjon i løpet av ett døgn. Slik løsriving av celler i biofilm er et velkjent fenomen som gjerne kjennetegner en moden biofilm (Srey et al., 2013). Ved døgn 9 var antall celler i biofilm og suspensjon like, dette ble sett både for *L. monocytogenes* i miks og for totaltall multikultur i begge vekstmedier. Dette indikerer at økt akkumulering av biofilm ikke førte til økt bevegelse av celler fra biofilm over i suspensjon. Ettersom redusert næringstilgang i biofilm kan få bakterier til å bytte til planktonisk vekst (Hunt et al., 2004), hadde det vært mulig å observere større variasjon av celler i suspensjon dersom vekstmedium hadde vært byttet sjeldnere.

Tettheten av celler som fester seg og vokser vil være avhengig av en rekke faktorer slik som vekstmedium, stamme og temperatur (Carpentier & Cerf, 2011). *Listeria monocytogenes* er vist feste seg til en rekke matkontaktmaterialer, dette feste er totrinns; reversibelt, så irreversibelt (Beresford et al., 2001). Ved hvert prøveuttak ble kupongene skylt i sterilt vann før sonikering. Ved en slik mild skylling vil også noen de celler som var reversibelt festet til overflate eller allerede eksisterende biofilm bli inkludert i kvantifiseringen. Det er derfor en fare for at antall celler i biofilm ble overestimert. Ved å ha utført en mer hardhendt skylling, kunne fragmenter av biofilmen ha løsnet og blitt med skyllevannet. Antall celler i biofilm hadde da blitt underestimert. Underestimering kunne også skje dersom sonikeringen ikke løsnet alle bakteriene fra stålkupong.

5.3.2 Vekst av *L. monocytogenes* i konkurranse med *L.spp*

Fra prøvepunkter der *L. monocytogenes* isoleres finnes gjerne andre arter innen slekten *Listeria* (Holah et al., 2004). De fem isolatene som ble inkludert i denne oppgaven ble ikke artsbestemt, men var alle tidligere isolert fra prøvepunkt med *L. monocytogenes*. Med bakgrunn i forforsøket ble det videre undersøkt om andre *Listeria* kunne påvirke *L. monocytogenes* vekst og overlevelse.

Ettersom antall *L. monocytogenes* i biofilm økte over tid i begge medier er det ikke mulig å fastslå at andre *Listeria* undertrykte vekst av *L. monocytogenes* i biofilm. Veksten av *L. monocytogenes* og *L. spp* var imidlertid noe ulik i de to mediene (figur 14).

De høye standardavvikene observert i BHI gjør det ikke mulig å anta forskjell i vekst mellom *L.monocytogenes* og *L.spp*. Antall celler i biofilm etter 9 døgn syntes å være lavere i BHI-enn i laksemedium. Mens antall *L. monocytogenes* i suspensjon var høyere i BHI enn i laksemedium. Slike funn kan gjenspeile forskjeller i næringstilgjengelighet mellom vekstmediene.

5.3.3 Vekst av *L. monocytogenes* i konkurranse med Gram negative

Bakteriene valgt ut fra bakgrunnsfloraen var alle isolert fra transportbånd i to ulike prosesseringsanlegg for laks etter vask og desinfeksjon. De seks utvalgte isolatene tilhørte slektene *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* og *Serratia*. *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* og *Stenotrophomonas .liquefaciens* ble isolert ved samme prøvepunkt som *Listeria*. *Acinetobacter sp.* og *Acinetobacter junii* dominerte etter renhold i lakseanlegg 2. Seleksjonskriteriene var ment å sikre at de utvalgte isolatene fra bakgrunnsfloraen var representative for den flora *Listeria* møter i industrien.

Antall *L. monocytogenes* etter 2 døgn i biofilm der Gram negative ble introdusert var tilsvarende det antallet som ble sett ved 2 døgn i *L. monocytogenes* i miks. Dette indikerer at de Gram negative ikke hemmet *L. monocytogenes* i tidlig i biofilmdannelsen. De Gram negative hemmet *L. monocytogenes* vekst i biofilm over tid i begge medier. Fordi antall celler *L. monocytogenes* i biofilm var stabilt over tid, fant det sted en undertrykking snarere drap.

Al-Zeyera et al. (2010) peker på at dersom et lavt antall initiale *L. monocytogenes* skal nå høye celletall i en blandingskultur må mediet hindre eller forsinke vekst av konkurrerende bakterier. I laksemedium økte Gram negative i biofilm noe over tid, mens antallet *L. monocytogenes* var konstant. I BHI var antallet celler Gram negative og antall *L. monocytogenes* konstant over tid. Økt biofilmdannelse blant Gram negative over tid i laksemedium kan indikere at dette var et bedre egnet vekstmedie enn BHI. Dette støttes av at det bestemte utvalget Gram negative var gjort fra lakseindustri.

5.3.4 Dynamikkstudier av *L. monocytogenes* i miks

I dynamikkstudiene av *L. monocytogenes* i miks ble andelen av hver av de seks *L. monocytogenes* isolatene bestemt i starttilsats og etter 9 døgns vekst i biofilm. For å skille de ulike isolatene ble det utført sekvenstyping. Hensikten var å finne ut hvordan de ulike stammene påvirket hverandres vekst og overlevelse på stålkupong.

Det ble ansett som viktig å undersøke to faktorer som kunne bidra til å forklare isolatenes evne til å etablere seg og eventuelt dominere i biofilmen; veksthastighet i suspensjon og initielt feste til stålkupong. Dersom enkelte isolater hadde vesentlig bedre evne til å feste seg til stålkupongen enn andre ville disse i kunne bli påvist oftere, uten nødvendigvis å være bedre til å vokse i biofilmen. Det er tidligere vist forskjeller i feste til overflater blant ulike stammer (Chae & Schraft, 2000). Dersom enkelte stammer hadde konkurransefortrinn i den omsluttende suspensjonen ville disse hatt større mulighet til å bidra i den voksende biofilmen.

De ulike isolatenes evne til å feste seg til stålkupong ble bestemt i begge medier, det ble ikke funnet vesentlige forskjeller mellom initielt feste blant de seks isolatene (figur 22). Deres evne til initielt feste til stålkupong i laksemedium og BHI var ikke signifikant forskjellig. Stammenes evne til initielt feste ble imidlertid testet enkeltvis, slik at eventuell påvirkning mellom de ulike isolatene ved festingen ikke er kjent.

Veksthastigheten for de ulike isolatene ble bestemt i suspensjon (figur 23). Forsøket ble kun gjort med ett gjentak i BHI ettersom forsøksopplegget måtte avbrytes. Det ble ikke observert særlige forskjeller mellom stammenes vekst i suspensjon ved 20 °C. Dette kan indikere at enkelte isolatenes evne til å dominere i BHI ikke skyldes ulik veksthastighet i suspensjon, men forsøket skulle optimalt ha vært utført ved 12 °C før dette eventuelt kunne avgjøres.

Selv om de enkelte stammer ble forsøkt tilsatt i like deler (10^7 cfu/ml) varierte andelen mellom isolater de ulike starttilsatsene noe, én tilsats var dominert av MF 3939 (figur 18). Volumtilsatsen av hver enkelt stamme ble beregnet ut fra vekstforsøk ved 15 °C. Dermed kan slike avvik mellom starttilsatsene kan skyldes at de ulike stammene ikke vokste nøyaktig like fort i løpet av 2 døgns inkubasjon i respektivt medium mellom gjentakene.

Deteksjonsgraden avhang av hvor mange kolonier som ble plukket, og gjennom sekvenstypingen resulterte i brukbare sekvenser for sammenlikning med kjente *cat* alleler. Det ble tilstrebet en deteksjonsgrad på 5 % (20 sekvenser). Deteksjonsgraden varierte mellom

4 % og 11 % (24 og 9 sekvenser)(figur 17 og 18). En slik deteksjonsgrad ble vist tilstrekkelig for å finne de dominerende stammer for hvert uttak.

Der *L. monocytogenes* vokste i miks foregikk kun konkurranse mellom seks isolater. Andelen mellom de seks stammene var ikke vesensforskjellig mellom biofilm og suspensjon. MF 3939 og MF 4712 konkurrerte godt i begge vekstmedier. MF 4077 deltok i biofilm i laksemedium, men ble sjeldent påvist i BHI. Funnene peker i retning av at stammen har mer optimalisert vekst i laksemedium enn i BHI. Stammen er isolert fra lakseanlegg 2 etter vask og desinfeksjon. Med bakgrunn i isolasjonsted kan MF4077 dominans i laksemedium understøttes med at denne er isolert i produksjonsanlegg for laks. MF 4562 konkurrerte spesielt godt i BHI, men var mindre tilstedeværende i laksemedium. MF 4562 er isolert fra produksjonsutstyr i kjøttanlegg 1 under produksjon.

5.3.5 Dynamikkstudier av *L. monocytogenes* i multikultur

I dynamikkstudiene av multikultur ble det undersøkt hvordan ulike stammer av *L. monocytogenes* konkurrerte med hverandre over tid. Denne konkurransen ble undersøkt der de konkurrerte i en divers multikultur. Sekvenstyping ble brukt for å skille isolatene. Bakteriesammensetningen i multikulturbiofilmer ved forsøksstart og etter 9 dagers biofilmdannelse ble bestemt ved 16S rDNA sekvensanalyser.

Matprosesseringsmiljø kan inneha en rekke ulike typer bakterier. *Pseudomonas* spp. og *Staphylococcus* er vanlig isolerte mikroorganismer (Bagge-Ravn et al., 2003). En biofilm i næringsmiddelindustri kan være et komplekst økosystem der en rekke ulike arter er deltakere. Mikroskoperingen viste tydelige forskjeller mellom *L. monocytogenes* i miks og multikultur med tanke på tredimensjonal strukturdannelse på stålkupong i BHI (figur 21). Multikulturen dannet en 30 µm tykk film, mens *L. monocytogenes* i miks dannet en 8 µm tykk film etter 9 døgn. Det er velkjent at *L. monocytogenes* overlever og vokser i slike biofilmer der flere arter deltar (Chae & Schraft, 2001, Møretrø & Langsrud, 2004). Den bestemte husfloraen er tett bundet sammen med sannsynligheten for å finne *L. monocytogenes* på overflater (Carpentier & Chassaing, 2004). Multikulturen bestod av *Listeria* (*L. monocytogenes* og *L. spp*) og Gram negative. Alle isolatene hadde sin opprinnelse i næringsmiddelindustri multikulturen var således et forsøk på å simulere vekst på overflater i slike.

I laksemedium var MF 4077, MF 3939 og MF 4712 de dominerende *L. monocytogenes*. Disse tre stammene dominerte både i miks og i multikultur. Dette funnet peker på at de tre stammene MF 4077, MF 3939 og MF 4712 ikke bare konkurrer godt innbyrdes i miks, men at de også hadde egenskaper som tillot dem å delta i en mer kompleks biofilm.

Innbyrdes andel mellom de ulike *L. monocytogenes* isolatene var svært ulik i miks- og multikultur med BHI som vekstmedium (figur 18). MF4562 som ble isolert fra produksjonsanlegg for kjøtt konkurrerte ut både laks- og kjøttisolater i 9 dagers biofilm. Denne ble kun påvist ved et tilfelle i laksemedium multikultur. Blant de ulike isolatene inkludert i forsøket var MF 4562 mest interessant, denne ble isolert på utstyr i kjøttanlegg 1 under produksjon. Ved å ha evne til å utkonkurrere andre *L. monocytogenes* i miks og i multikultur BHI, samtidig som den hadde dårlig evne til å vokse i laksemedium. Det er mulig at bakteriene har evne til å tilpasse seg eller optimalisere vekst i ulike miljøer og at funnene gjenspeiler dette.

For å bestemme bakteriesammensetningen i multikulturen ved døgn 9 ble det utført en 16S rDNA sekvensering. Deteksjonsgrensen avhang av hvor mange kolonier som ble plukket og ga brukbare sekvenser. Deteksjonsgrensen var 3 % for alle gjentak. Analysene gjort med 16S rDNA viste at *Pseudomonas fluorescens* dominerte i begge vekstmedier gjennom tre gjentak (figur 20). I laksemedium ble det også påvist *Pseudomonas fragi*. I BHI ble det også påvist *Pseudomonas fragi*, *Acinetobacter junii* og *Listeria*. Ettersom hver av de tre bakterietypene initielt ble tilsatt i like deler (10^7 cfu/ml) i multikulturen ved starttidspunktet har *Pseudomonas fluorescens* hatt bedre evne til å vokse i biofilm enn *Listeria* og de resterende Gram negative.

MCR-ALS analysen identifiserte tre komponenter som forklarte variasjonen i datamaterialet. De tre komponentene 1,2 og 3 ble henholdsvis representert av slektene *Listeria*, *Pseudomonas* og *Serratia*. Den generelle trenden i begge medier var at komponent 2 kunne forklare nærmest hele variasjonen i datamaterialet ved døgn 9 (figur 19). Analysen indikerer dermed at *Pseudomonas* gradvis har tatt over biofilmen.

Det ble vist at de Gram negative hadde initielt bedre feste til stålkupong etter tre timer enn *L. monocytogenes* i BHI, men ikke i laksemedium. Blant de Gram negative skilte ikke *pseudomonas fluorescens* seg ut med tanke på feste til stålkupong (figur 22). Sammen med resultatene fra direktesekvenseringen støtter dette antakelsen om at *Pseudomonas fluorescens* dominans etter 9 døgn skyldes gradvis overtakelse av biofilm og ikke bedre evne til feste.

7. KONKLUSJON

Bakteriene inkludert for å representere bakgrunnsflora hemmet vekst av *L. monocytogenes* på stålkupong. Hemmingen bestod i å holde antall *L. monocytogenes* nede, og således undertrykke biofilmdannelse over tid. Hemmingen var ikke avhengig av vekstmedium. Andre *Listeria*-arter hadde ingen tydelig påvirkning på *L. monocytogenes* vekst i biofilm. Det ble ikke funnet eksempler på bakterier som fremmet vekst av *L. monocytogenes* i biofilm.

Slekten *Pseudomonas* dominerte bakteriesammensetningen i biofilm ved 9 døgn i alle gjentakene. At de tre gjentakene med den diverse multikulturen over tid resulterte i tilsvarende bakteriesammensetning i biofilm, indikerer at *Pseudomonas* hadde evne til å utkonkurrere *Listeria*, *Serratia*, *Acinetobacter* og *Stenotrophomonas* der disse forelå i multikultur.

Enkelte isolater *L. monocytogenes* hadde bedre evne til å delta i biofilm enn andre. Det ble observert at enkelte *L. monocytogenes* isolater dominerte laksemedium, men ikke i BHI og visa versa. Dette indikerte at bestemte *L. monocytogenes* isolater har optimalisert vekst i visse miljøer.

8. VIDERE ARBEID

- Utforske hvordan andre arter innen *Listeria* påvirker *L. monocytogenes* vekst og overlevelse på overflater med et bredere utvalg isolater.
- Utforske hvordan et bredere utvalg av bakgrunnsflora påvirker *L. monocytogenes* vekst og overlevelse på overflater.
- Utforske videre sammenheng mellom tilpasning i bestemte miljø og persistens med et bredere utvalg isolater.
- Utforske hvilken rolle andre bakterieslekter har i *L. monocytogenes* initielle feste til stålkupong.
- Teste hvordan *L. monocytogenes* dynamikk blir påvirket av vask og desinfeksjon.
- Inkludere flere stammer *L. monocytogenes* i dynamikkstudier for å utforske om *L. monocytogenes* evne til tilpasning i bestemte miljøer kan forklares ved inndeling i bestemte serovarianter.
- Dersom evne til persistens blant *L. monocytogenes* også skyldes isolaters evne til tilpasning i ulike miljøer, bør faktorer som bidrar til å forklare denne tilpasningen undersøkes nærmere.

9. REFERANSER

- ABDOU, A. M. 2003. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86, 127-32.
- ADAMS, R. M. M., M. O. 2008. *Food Microbiology*, RSC Publishing.
- AFTENPOSTEN 2013. Listeriafunn i sjokomelk gir milliontap for Q-meieriene Tilgjengelig fra: <http://www.aftenposten.no/okonomi/Listeriafunn-i-sjokomelk-gir-milliontap-for-Q-meieriene-7166058.html> (lest 25.04).
- BAGGE-RAVN, D., NG, Y., HJELM, M., CHRISTIANSEN, J. N., JOHANSEN, C. & GRAM, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 239-50.
- BEN-GIGIREY, B., VIEITES, J. M., KIM, S. H., AN, H. J., VILLA, T. G. & BARROS-VELAZQUEZ, J. 2002. Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control*, 13, 293-299.
- BERESFORD, M. R., ANDREW, P. W. & SHAMA, G. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1000-1005.
- BORUCKI, M. K., PEPPIN, J. D., WHITE, D., LOGE, F. & CALL, D. R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7336-7342.
- CARPENTIER, B. & CERF, O. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1-8.
- CARPENTIER, B. & CHASSAING, D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 111-122.
- CHAE, M. S. & SCHRAFT, H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 103-111.
- CHAE, M. S. & SCHRAFT, H. 2001. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiol*, 18, 103-112.
- COENYE, T., VANLAERE, E., LIPUMA, J. J. & VANDAMME, P. 2004. Identification of genomic groups in the genus *Stenotrophomonas* using *gyrB* RFLP analysis. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 40, 181-185.
- DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M. & MCLANDBOROUGH, L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 68, 2950-8.
- DOIJAD, S., BARBUDDHE, S. B., GARG, S., KALEKAR, S., RODRIGUES, J., D'COSTA, D., BHOSLE, S. & CHAKRABORTY, T. 2011. Incidence and genetic variability of *Listeria* species from three milk processing plants. *Food Control*, 22, 1900-1904.
- DONLAN, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8, 881-90.
- DOUMITH, M., BUCHRIESER, C., GLASER, P., JACQUET, C. & MARTIN, P. 2004a. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42, 3819-22.
- DOUMITH, M., CAZALET, C., SIMOES, N., FRANGEUL, L., JACQUET, C., KUNST, F., MARTIN, P., COSSART, P., GLASER, P. & BUCHRIESER, C. 2004b. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun*, 72, 1072-83.
- ERICSSON, H., EKLOW, A., DANIELSSONTHAM, M. L., LONCAREVIC, S., MENTZING, L. O., PERSSON, I., UNNERSTAD, H. & THAM, W. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J Clin Microbiol*, 35, 2904-2907.
- FARBER, J. M., COATES, F. & DALEY, E. 1992. Minimum Water Activity Requirements for the Growth of *Listeria-Monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 103-105.

- FOLKEHELSEINSTITUTTET 2012a. Smittevern boka Tilgjengelig fra:
http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content_6493&Main_6157=6287:0:25,5499&MainContent_6287=6493:0:25,6833&Content_6493=6441:82811::0:6446:73::0:0 (lest 02.04).
- FOLKEHELSEINSTITUTTET 2012b. Årsrapport; Næringsmiddelbårne infeksjoner og utbrudd i 2011. Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) og Vevbasert system for utbruddsvarsling (Vesuv) Lange, H. Tafjord, B. H. Nygård, K. Vold, L. Wester, A. L. Kapperud, G. Nasjonalt folkehelseinstitutt.
- GANDHI, M. & CHIKINDAS, M. L. 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1-15.
- GIANFRANCESCHI, M. V., D'OTTAVIO, M. C., GATTUSO, A., BELLA, A. & AURELI, P. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). *Food Microbiol*, 26, 520-526.
- GRAM, L., BAGGE-RAVN, D., NG, Y. Y., GYMOESE, P. & VOGEL, B. F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1165-1171.
- GRANUM, P. E. 2011. *Matforgiftning*, Kristiansand, Norge, Høyskoleforlaget.
- GRAVES, L. M., HELSEL, L. O., STEIGERWALT, A. G., MOREY, R. E., DANESHVAR, M. I., ROOF, S. E., ORSI, R. H., FORTES, E. D., MILILLO, S. R., DEN BAKKER, H. C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B. & SAUDERS, B. D. 2010. *Listeria marthii* sp nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1280-1288.
- HAUSNER, M. & WUERTZ, S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3710-3.
- HOLAH, J. T., BIRD, J. & HALL, K. E. 2004. The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 68-77.
- HUNT, S. M., WERNER, E. M., HUANG, B. C., HAMILTON, M. A. & STEWART, P. S. 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7418-7425.
- HWANG, C. A. & SHEEN, S. 2011. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes* as affected by a native microflora in cooked ham under refrigerated and temperature abuse conditions. *Food Microbiol*, 28, 350-355.
- INTVELD, J. H. J. H. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 1-18.
- JACQUET, C., GOUIN, E., JEANNEL, D., COSSART, P. & ROCOURT, J. 2002. Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl Environ Microbiol*, 68, 616-22.
- JADHAV, S., BHAVE, M. & PALOMBO, E. A. 2012. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods*, 88, 327-41.
- JEONG, D. K. & FRANK, J. F. 1994. Growth of *Listeria-Monocytogenes* at 21-Degrees-C in Biofilms with Microorganisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 27, 415-424.
- KALMOKOFF, M. L., AUSTIN, J. W., WAN, X. D., SANDERS, G., BANERJEE, S. & FARBER, J. M. 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 725-734.
- KASTBJERG, V. G. & GRAM, L. 2009. Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1667-1681.
- KATHARIOU, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot*, 65, 1811-29.

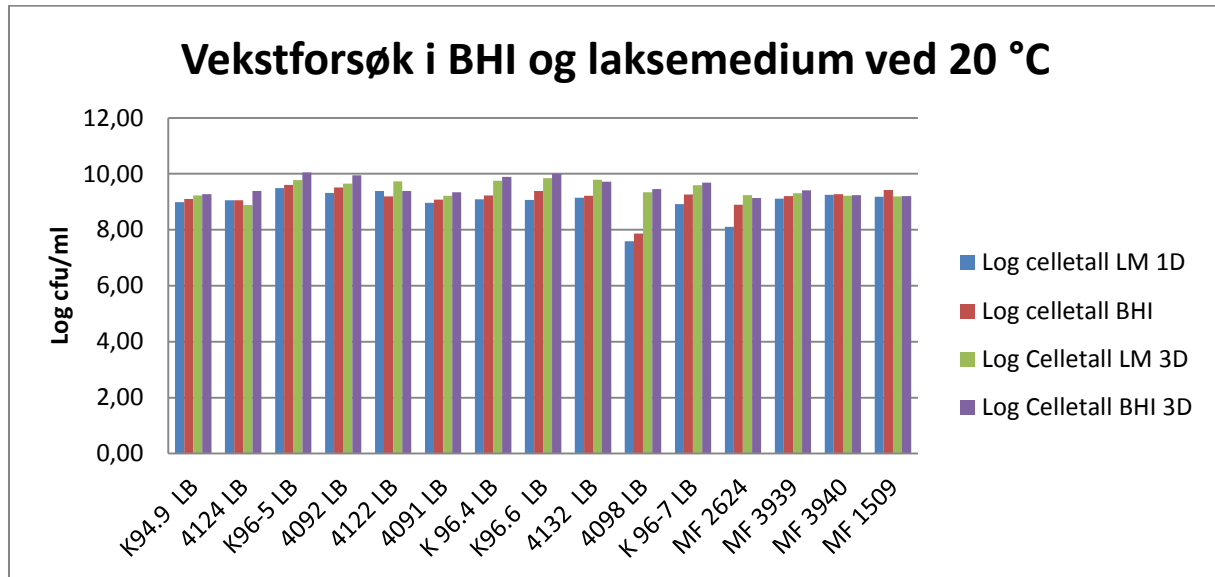
- KATLA, T., MORETRO, T., SVEEN, I., AASEN, I. M., AXELSSON, L., RORVIK, L. M. & NATERSTAD, K. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 191-6.
- KO, R., SMITH, L. T. & SMITH, G. M. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 176, 426-31.
- KUMAR, C. G. & ANAND, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27.
- LANGSRUD, S., SIDHU, M. S., HEIR, E. & HOLCK, A. L. 2003. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 283-290.
- LAUER, W. F., FACON, J. P. & PATEL, A. 2005. Evaluation of a chromogenic medium for identification and differentiation of *Listeria monocytogenes* in selected foods. *J AOAC Int*, 88, 511-7.
- LECLERCQ, A., CLERMONT, D., BIZET, C., GRIMONT, P. A. D., LE FLECHE-MATEOS, A., ROCHE, S. M., BUCHRIESER, C., CADET-DANIEL, V., LE MONNIER, A., LECUIT, M. & ALLERBERGER, F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2210-2214.
- LEMON, K. P., HIGGINS, D. E. & KOLTER, R. 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol*, 189, 4418-4424.
- LINDSTEDT, B. A., THAM, W., DANIELSSON-THAM, M. L., VARDUND, T., HELMERSSON, S. & KAPPERUD, G. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Microbiol Methods*, 72, 141-8.
- LONCAREVIC, S., DANIELSSON-THAM, M. L., GERNER-SMIDT, P., SAHLSTROM, L. & THAM, W. 1998. Potential sources of human listeriosis in Sweden. *Food Microbiol*, 15, 65-69.
- LUBER, P., CRERAR, S., DUFOUR, C., FARBER, J., DATTA, A. & TODD, E. C. D. 2011. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization - Recommendations for improved prevention and control. *Food Control*, 22, 1535-1549.
- LUNGU, B., RICKE, S. C. & JOHNSON, M. G. 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*, 15, 7-17.
- LYAUTEY, E., LAPEN, D. R., WILKES, G., MCCLEARY, K., PAGOTTO, F., TYLER, K., HARTMANN, A., PIVETEAU, P., RIEU, A., ROBERTSON, W. J., MEDEIROS, D. T., EDGE, T. A., GANNON, V. & TOPP, E. 2007. Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5401-5410.
- MADIGAN, M. T., MADIGAN, M. T. & BROCK, T. D. 2009. *Brock biology of microorganisms*, San Francisco, CA, Pearson/Benjamin Cummings.
- MARTI, S., RODRIGUEZ-BANO, J., CATEL-FERREIRA, M., JOUENNE, T., VILA, J., SEIFERT, H. & DE, E. 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes*, 4, 5.
- MASTRONICOLIS, S. K., BOURA, A., KARALIOTA, A., MAGIATIS, P., ARVANITIS, N., LITOS, C., TSAKIRAKIS, A., PARASKEVAS, P., MOUSTAKA, H. & HEROPOULOS, G. 2006. Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: focus on neutral lipids. *Food Microbiol*, 23, 184-94.
- MATTILSYNET 2010. FOR 2008-12-22 nr 1623: Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften) Tilgjengelig på nett: <http://www.lovddata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20081222-1623.html> (lest 23.4).
- MATTILSYNET. 2013. *RE: Personlig korrespondanse ved Ulvolden, I. K.*
- MEYLHEUC, T., METHIVIER, C., RENAULT, M., HERRY, J. M., PRADIER, C. M. & BELLON-FONTAINE, M. N. 2006. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative

- and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 52, 128-137.
- MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A. & SWANN, M. B. R. 1926. A disease of rabbit characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hithertoundescribed bacillus: *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 407-439.
- MØRETRØ, T. & LANGSRUD, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food processing environments. *Biofilms*, 1, 15.
- NORWOOD, D. E. & GILMOUR, A. 2001. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 320-324.
- NRK 2013. Fant listeriabakterier i Rema-kylling. Fenstad, A. Wolden, O Tilgjengelig fra: <http://www.nrk.no/trondelag/1.10912960> (lest 1.05).
- NYCHAS, G. J., SKANDAMIS, P. N., TASSOU, C. C. & KOUTSOUMANIS, K. P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, 78, 77-89.
- ORSI, R. H., DEN BAKKER, H. C. & WIEDMANN, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*, 301, 79-96.
- PALMER, J., FLINT, S. & BROOKS, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 577-88.
- PAMER, E. G. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol*, 4, 812-23.
- PARISI, A., LATORRE, L., NORMANNO, G., MICCOLUPO, A., FRACCALVIERI, R., LORUSSO, V. & SANTAGADA, G. 2010. Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiol*, 27, 101-108.
- PASTEURINSTITUTTET 2011a. *Listeria monocytogenes* MLST Database Institut Pasteur 25-28, Rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 FRANCE Tilgjengelig fra: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>
- PASTEURINSTITUTTET 2011b. Primers used for MLST of *Listeria monocytogenes* Genotyping of Pathogens and Public Health Platform Institut Pasteur 25-28, Rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 FRANCE Tilgjengelig fra: http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Lmono.html.
- PIN, C., DE FERNANDO, G. D. G. & ORDONEZ, J. A. 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4441-4447.
- ROCOURT, J., JACQUET, C. & REILLY, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 197-209.
- RODRIGUES, L. & MCLANDBOROUGH, L. 2009. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and transfer to foods. In: FRATAMICO, P. M., BASSAM, A. A. & NEREUS, W. (eds.) *Biofilms in the food and beverage industries*. CRC.
- RORVIK, L. M., CAUGANT, D. A. & YNDESTAD, M. 1995. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 19-27.
- RUDI, K., MOEN, B., SEKELJA, M., FRISLI, T. & LEE, M. R. F. 2012. An eight-year investigation of bovine livestock fecal microbiota. *Veterinary Microbiology*, 160, 369-377.
- RUTHERFORD, T. J., MARSHALL, D. L., ANDREWS, L. S., COGGINS, P. C., SCHILLING, M. W. & GERARD, P. 2007. Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiol*, 24, 703-710.
- RØRVIK, L. M. & YNDESTAD, M. 1991. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 97-104.
- SALCEDO, C., ARREAZA, L., ALCALÁ, B., DE LA FUENTE, L. & VÁZQUEZ 2002. Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones. *J Clin Microbiol*, 757-762.

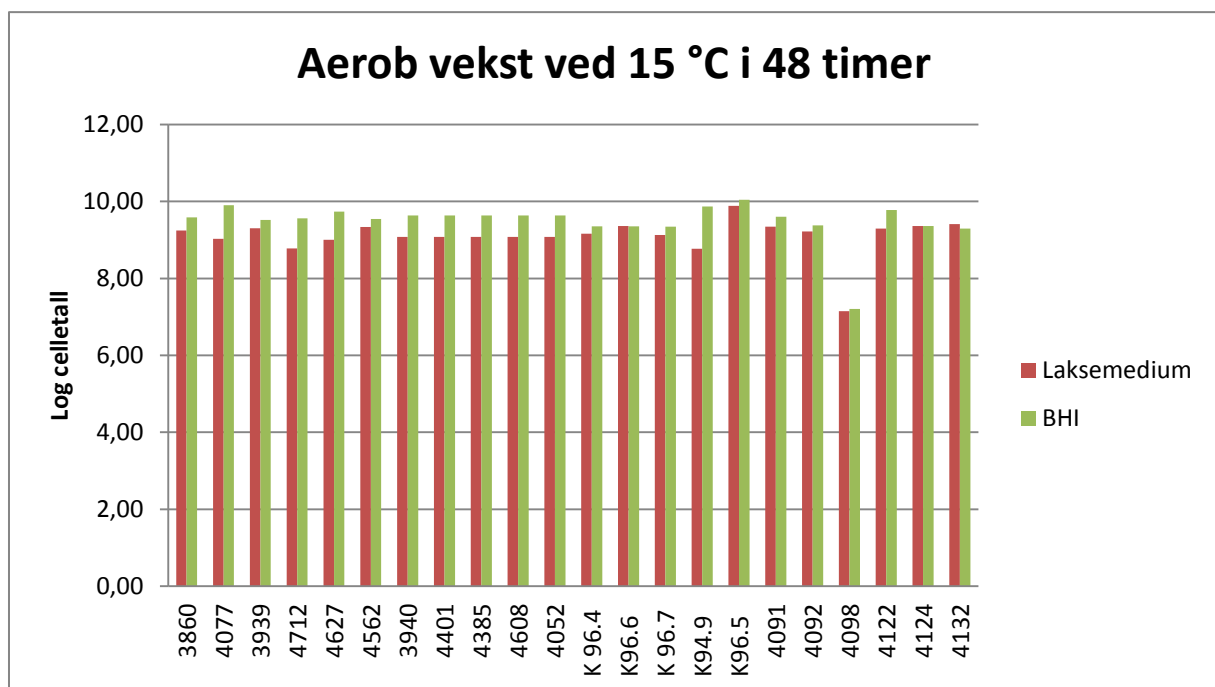
- SHI, X. M. & ZHU, X. N. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 407-413.
- SILVER, H. M. 1998. Listeriosis during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*, 53, 737-40.
- SINDE, E. & CARBALLO, J. 2000. Attachment of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol*, 17, 439-447.
- SINGH, B. R., SINGH, Y. & TIWARI, A. K. 1997. Characterisation of virulence factors of Serratia strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 259-66.
- SREY, S., JAHID, I. K. & HA, S. D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- SUIHKO, M. L., SALO, S., NICLASEN, O., GUDBJORNSDOTTIR, B., TORKELSSON, G., BREDHOLT, S., SJOBERG, A. M. & GUSTAVSSON, P. 2002. Characterization of Listeria monocytogenes isolates from the meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 137-146.
- SWAMINATHAN, B. & GERNER-SMIDT, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 9, 1236-43.
- TOMPKIN, R. B. 2002. Control of Listeria monocytogenes in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65, 709-725.
- VOGEL, B. F., HUSS, H. H., OJENIYI, B., AHRENS, P. & GRAM, L. 2001. Elucidation of Listeria monocytogenes contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2586-2595.
- WATSON, J. D., BAKER, T. A., BELL, P. S., GANN, A., LEVINE, M. & LOSICK, R. 2007. *Molecular Biology of the Gene*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ZHANG, W., JAYARAO, B. M. & KNABEL, S. J. 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of Listeria monocytogenes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 913-920.
- ZIMONJA, M., RUDI, K., TROSVIK, P. & NAES, T. 2008. Multivariate curve resolution of mixed bacterial DNA sequence spectra: identification and quantification of bacteria in undefined mixture samples. *Journal of Chemometrics*, 22, 309-322.

10. VEDLEGG

Vedlegg 1 - Vekst i suspensjon, laksemedium og BHI



Figur 24 Vekstforsøk- Log cfu/ml etter ett og tre døgn for de ulike stammer i laksemedium og BHI



Figur 25 Aerob vekst ved 15 °C i 48 timer for Listeria og Gram-negative.

Vedlegg 2 - Medier og løsninger

BHI (Brain Heart Infusion):

37.6 g. ble løst i 800 ml Milli-Q vann, og sterilisert 15 minutter ved 121 °C. Etter avkjøling i vannbad til ca. 50 °C ble løsningen fordelt i petriskåler.

29.6 g. BHI ble løst i 800 ml Milli-Q vann. Dette ble overført til glassflasker og sterilisert i en certoklav ved 121 °C i 15 minutter. Lagret ved romtemperatur før bruk.

Tabell 28

Ingrediens	g/l
Calf Brain infusion solids	12.5
Beef heart infusion solids	5.0
Proteose peptone	10.0
Glucose	2.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5
Agar	0.0*/10

*BHI buljong har ikke agar

Glyserol

Glyserol 85 %, autoklavert i 15 min, deretter lagret ved romtemperatur før bruk.

Molekylvekstandard VI

Tabell 29 **Blandingsforhold molekylvekstandard VI**

Standard Marker VI	60 µl
loading, orange mix	100 µl
dH2O	140 µl
Total	200 µl

Peptonvann

Tabell 30 Tillagning av peptonvann

Bacto™ peptone (Difco)	10 g
NaCl	5 g
Destillert vann	1 liter

Rapid L.mono (RLM)

Skålene kom ferdigstøpte fra Bio-Rad. De ble oppbevart kjølig 4 °C etter mottak.

Tabell 31

Ingrediens	g/l
Peptone	30
Kjøtttekstrakt	5
Gjærekstrakt	1
Litium klorid	9
Selectiv løsning	20
Fonolrød	0.12
Xylose	10
Kromogen løsning	1
Agar	13
Destillert vann	1000