



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2018 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap  
Helge Holo

## **Bakteriofager mot *Lactococcus lactis* og effekten av eksopolysakkarider på bakteriofagfølsomhet**

Bacteriophages against *Lactococcus lactis* and the effect of exopolysaccharides on bacteriophage sensitivity

**Malene Jonsrud Nord**

Matvitenskap – matvaretrygghet, kvalitet og hygiene  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Forord**

Denne masteroppgaven ble skrevet som en avsluttende del av mastergraden i matvitenskap med retning matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet ble utført på Laboratorium for Mikrobiell Genteknologi (LMG) våren 2018, og det ble finansiert av midler fra TINE SA. Jeg ønsker å gi en stor takk til min hovedveileder professor Helge Holo for muligheten til å skrive en oppgave innenfor et spennende tema. I tillegg vil jeg takke for all hjelp til gjennomføringen av det praktiske arbeidet og for gode innspill og tilbakemeldinger underveis. Jeg vil også takke Cyril Frantzen for at jeg fikk låne bakteriestammer og bakteriofager til arbeidet, og for god veiledning, tips og triks til både det praktiske og teoretiske arbeidet. Til slutt ønsker jeg å takke resten av gjengen på LMG for det trivelige miljøet, og for all hjelpen jeg fikk underveis. Dette semesteret har vært en veldig lærerik, spennende og morsom avslutning på mastergraden. Tusen takk til dere alle sammen.

Ås, mai 2018

---

Malene Jonsrud Nord

## Sammendrag

Eksopolysakkarider produseres av mange bakterier, blant annet av *Lactococcus lactis*. Det har tidligere blitt diskutert om eksopolysakkarider kan beskytte bakterier mot bakteriofagangrep. Hovedmålet med denne studien var å undersøke om tap av eksopolysakkarider påvirker bakteriofagfølsomheten hos ulike stammer av *Lactococcus lactis*. I tillegg ble tilstedeværelsen av bakteriofager som angriper *epsD*-negative stammer undersøkt i kommersielle syrekulturer, ettersom en sjelden finner *epsD*-negative stammer i syrekulturer. *EpsD* er et gen som er involvert i syntesen av eksopolysakkarider, og *epsD* sekvensen varierer svært mye mellom ulike stammer av *Lactococcus lactis*. Det er også kjent at eksopolysakkarid-genene kan tapes ved gjentatte kultiveringer.

16 stammer av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ble valgt ut basert på deres forskjell i *epsD* sekvens. Disse stammene har tidligere blitt isolert fra en syrekultur som meierier ofte bruker under produksjon av ost. Stammene ble kultivert jevnlig for å undersøke om de kunne miste *epsD* spontant. Syv *epsD*-positive stammer mistet *epsD* ved gjentatte kultiveringer. Det ble brukt 144 isolerte bakteriofager/meieriprøver for å undersøke stammenes sensitivitet for bakteriofager ved hjelp av plaque assay. Bakteriofagene har tidligere blitt isolert fra prøver fra brukssyren hos ulike TINE meierier. Ved plaque assay ble det påvist forskjeller i sensitiviteten mellom ulike stammer, men også forskjeller i sensitiviteten mellom *epsD*-negative stammer og *epsD*-positive morstammer. For noen stammer viste *epsD*-negativ stamme mer sensitivitet til bakteriofager enn *epsD*-positiv morstamme. For andre stammer viste *epsD*-negativ stamme mindre sensitivitet til bakteriofager enn *epsD*-positiv morstamme. En stamme utviklet full resistens mot de undersøkte bakteriofagene ved tap av eksopolysakkarider.

For undersøkelse av bakteriofager i kommersielle syrekulturer som angriper *epsD*-negative stammer ble syrekulturen anrikt på *epsD*-negative stammer av *Lactococcus lactis*. Det ble isolert bakteriofager fra syrekulturen, og de ble identifisert til å tilhøre gruppe 936 ved hjelp av PCR. PCR-produktene ble sekvensert, og sekvensene var identiske med en tidligere sekvensert bakteriofag. Dette var en  $\phi$ 844 bakteriofag som tidligere har blitt isolert fra brukssyren fra TINEs meierier under produksjon av ost. Denne brukssyren ble produsert fra den samme syrekulturen som ble brukt i denne studien til å undersøke forekomsten av bakteriofager i kommersielle syrekulturer. Dette viser at den kommersielle syrekulturen i seg selv kan være en viktig bidragsyter til bakteriofagproblemer i meieriene.

Resultatene fra denne studien tyder på at eksopolysakkarider spiller en rolle når det gjelder bakteriofagfølsomhet. Eksopolysakkarider ser ut til å ha en funksjon i å beskytte bakterier mot bakteriofager, men det ser også ut til at tilstedeværelse av eksopolysakkarider gir økt sensitivitet til bakteriofager. Bakteriofager tilhørende gruppe 936 ble påvist i kommersielle syrekulturer, selv om det tidligere er antatt at de ikke er til stede. Dette kan ha stor betydning for meieriindustrien da det er problematisk at bakteriofager er til stede allerede i syrekulturene.

## Abstract

Exopolysaccharides are produced by many bacteria, including *Lactococcus lactis*. It has been discussed whether exopolysaccharides can protect bacteria against bacteriophage attacks. The main objective of the following study was to investigate whether loss of exopolysaccharides affects the bacteriophage sensitivity of different strains of *Lactococcus lactis*. In addition, the presence of bacteriophages attacking *epsD*-negative strains was investigated in commercial starter cultures. *EpsD* is a gene involved in the synthesis of exopolysaccharides, and *epsD* shows a high degree of sequence variation between different strains of *Lactococcus lactis*. It is also known that the exopolysaccharide genes can be lost by serial transfers.

16 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* were chosen based on their difference in the *epsD* sequence. These strains have previously been isolated from a starter culture that dairies often use during cheese production. The strains were cultivated regularly to investigate whether they could lose *epsD* spontaneously. Seven *epsD*-positive strains lost their *epsD* by serial transfers. 144 samples of isolated bacteriophages/bulk starter culture/whey were used to investigate the strains sensitivity for bacteriophages. This was done by using plaque assay. These bacteriophages have been isolated from samples from the bulk starter culture at different TINE dairies. The use of plaque assay showed a difference in sensitivity between different strains, but also showed a difference in sensitivity between *epsD*-negative strains and their *epsD*-positive mother strains. For some strains, the *epsD*-negative strain appears to be more sensitive to bacteriophages than their *epsD*-positive mother strain. Whereas for other strains it appears that the *epsD*-negative strain is less sensitive to bacteriophages than the *epsD*-positive mother strain. One strain developed resistance against bacteriophages with the loss of exopolysaccharides.

To investigate the presence of bacteriophages in commercial starter cultures that attack *epsD*-negative strains, the starter culture was enriched on the *epsD*-negative strains of *Lactococcus lactis*. By using PCR, the isolated bacteriophages from the starter culture were identified as belonging to group 936. The PCR products were sequenced and the sequences were identical to one previously sequenced bacteriophage. This was a  $\phi$ 844 bacteriophage which previously had been isolated from the bulk starter culture from TINE dairies during the production of cheese. The bulk starter culture was produced from the same starter culture that was used in this study to investigate the occurrence of bacteriophages in starter cultures. This shows that

the commercial starter culture itself can be an important contributor to bacteriophage problems in dairies.

The results from this study indicate that exopolysaccharides play a role in bacteriophage sensitivity. Exopolysaccharides appear to have a function in protecting bacteria against bacteriophages, but they also appear to increase the sensitivity for bacteriophages. Bacteriophages belonging to the group 936 were detected in commercial starter cultures, although it was previously assumed that they were not present. This can be of great importance to the dairy industry as it is problematic that bacteriophages are present already in the starter cultures.

# Innholdsfortegnelse

1. Innledning .....	1
1.1. Fremstilling av ost .....	1
1.1.1. Syrekulturer .....	1
1.1.2. Mesofile syrekulturer .....	2
1.2. Bakteriofager .....	2
1.2.1. Livssyklus .....	2
1.2.2. Lactococcus lactis spesifikke bakteriofager .....	3
1.3. Lactococcus lactis og EPS .....	4
1.4. Hensikt med studien .....	5
2. Materialer og metoder .....	6
2.1. Bakteriestammer .....	6
2.2. Kultivering av epsD-positive stammer .....	7
2.3. Undersøkelse av fagsensitivitet ved hjelp av plaque assay .....	8
2.3.1. Sensitivitet for fag .....	8
2.3.2. Sammenligning av titer mellom epsD-positiv og epsD-negativ .....	8
2.4. Fager i syrekulturer .....	9
2.4.1. Effekt av filtrat fra syrekultur på vekst .....	10
2.4.2. Plakking med filtrat fra syrekultur .....	10
2.5. Plasmidprofilering .....	11
2.6. Polymerase kjedereaksjon og gel-elektroforese .....	11
2.7. DNA sekvensering .....	13
3. Resultater .....	14
3.1. Kultivering av epsD-positive stammer .....	14
3.2. Undersøkelse av fagsensitivitet ved hjelp av plaque assay .....	20
3.2.1. Sensitivitet for fager .....	20
3.2.2. Sammenlikning av titer mellom epsD-positiv og epsD-negativ .....	23
3.4. Fager i syrekulturer .....	25
3.4.1. Effekt av filtrat fra syrekultur på veksthastighet .....	25
3.4.2. Påvisning med plaque assay .....	28
3.4.3. PCR av fager fra syrekultur .....	29
3.5. Plasmider i epsD-positive og epsD-negative stammer .....	31
3.6. DNA Sekvensering .....	33
4. Diskusjon .....	36
4.1. Kultivering av epsD-positive stammer .....	36
4.2. Undersøkelse av fagsensitivitet ved hjelp av plaque assay .....	38

4.3.Fager i syrekultur .....	40
5. Referanser .....	43
6.Vedlegg .....	47



# 1. Innledning

## 1.1. Fremstilling av ost

Ost er et melkeprodukt som i utgangspunktet er laget av melk, løpe og mikroorganismer hvor melkefettet har blitt innesluttet av koagulert kasein og mysen har blitt skilt ut fra ostemassen (1-3). Mikroorganismer har en svært viktig rolle for syring av melken og for modning av osten (1). Ved fermentering av laktose til melkesyre så vil dette gi en redusert pH i melken som vil bidra til økt holdbarhet og trygghet, i tillegg til en frisk smak i osten (2). En redusert pH i ystemassen vil øke effekten til en av enzymene i løpe, chymosin, som destabiliserer k-kasein slik at kaseinmicellene koagulerer og en får en riktig fasthet på ostekegelet (3).

### 1.1.1. Syrekulturer

Mikroorganismene som er involvert i selve ystingen og modningen kan deles inn i to hovedgrupper (4). I den første gruppen inngår utvalgte mikroorganismer som blir tilsatt ystemelken, og den andre gruppen består av non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) som er melkesyrebakterier som er naturlig til stede i melken eller som kommer fra produksjonsomgivelsene. Den første gruppen kan videre bli delt inn i primær syrekultur og sekundær syrekultur. Den primære syrekulturen sørger hovedsakelig for syring av melken under ystingen. I tillegg er den primære syrekulturen også involvert i degraderingen av fett og proteiner under modningen. Et eksempel på en art som ofte blir brukt i en primær syrekultur er *Lactococcus lactis* (*L.lactis*) (1). Den sekundære syrekulturen er kulturer som i tillegg til den primære syrekulturen blir tilsatt til enkelte ostetyper for å gi de en karakteristisk smak, tekstur eller utseende (1, 4). Det finnes mange forskjellige sammensetninger av syrekulturer, og en skiller vanligvis mellom syrekulturer som inneholder mesofile bakterier og kulturer som inneholder termofile bakterier (1). I industriell osteproduksjon brukes som regel syrekulturer fra frysestock i stedet for tradisjonell «back slopping» som vil si at prøver fra tidligere osteproduksjoner blir brukt som syrekulturer (5). Årsaken til dette er at syrekulturer fra frysestock vil sørge for kontroll over kvaliteten i produktet og produktstabilitet med tanke på tekstur og smak. Syrekulturene som brukes under fremstillingen av ost kan brukes til å produsere en brukssyrekultur som senere kan bli brukt til å inokulere ystekarene, eller den kan tilsettes direkte til karene som en «direct vat set» (DVS) kultur (1, 6). En DVS kultur reduserer risikoen for problemer med bakteriofager (fager) ettersom de får mindre tid til å formere seg (7). Likevel så foretrekkes som regel en brukssyrekultur som følge av sensoriske årsaker og raskere fermentering.

### **1.1.2. Mesofile syrekulturer**

Mesofile syrekulturer brukes ved produksjon av mange typer oster, blant annet Gouda (8). Disse syrekulturene består hovedsakelig av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* som begge er homofermentative (1, 8). Homofermentative MSB vil si at de stort sett produserer melkesyre som eneste produkt fra fermentering av laktose (2). De mesofile syrekulturene kan i tillegg til *L.lactis* subsp. *lactis* og *L.lactis* subsp *cremoris*, som nevnt ovenfor, også inneholde andre bakterier (sekundær syrekultur) avhengig av hva slags ost en ønsker å produsere (1, 8). En DL kultur inneholder i tillegg til de overnevnte stammene også *L.lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* og *Leuconostoc* spp (3). Disse stammene bidrar til tekstur og aroma i produktet. Videre så kan de mesofile syrekulturene deles inn i to typer (1, 8). Den ene typen er udefinerte blandingskulturer med ukjente stammer, og den andre typen er definerte kulturer med kjente stammer. Den førstnevnte typen brukes ofte i Europa ved produksjon av gulost. Syrekulturer med definerte stammer har ofte blitt brukt i land med produksjon av cheddar og liknende type oster, og disse syrekulturene er ofte en blanding av to eller flere definerte stammer. Udefinerte blandingskulturer er mer motstandsdyktige mot fagangrep fordi de inneholder mange stammer med ulik følsomhet for bakteriofager, i motsetning til definerte kulturer (9).

## **1.2. Bakteriofager**

Fager ble oppdaget på begynnelsen av det 20. århundre og er de mest forekommende og mangfoldige biologiske enhetene som finnes i jordas biosfære (10, 11). Fager er virus som er avhengige av bakterier som vert for å kunne formere seg (1). De består av et hode og en hale, og de fleste fag inneholder dsDNA, men det finnes også små grupper fager med ssDNA, ssRNA eller dsRNA (10, 12). Genomet befinner seg i hodestrukturen omgitt av en proteinkappe, mens halen sørger for å binde faget til yttersiden av cellen til vertsbakterien (12). Dette gjør at genomet til faget kan injiseres inn i cellen, og hvert fag binder seg til et spesifikt molekyl på overflaten av cellen som vanligvis er et protein. Kun celler som har denne «reseptoren» kan altså bli angrepet av et gitt fag.

### **1.2.1. Livssyklus**

Fager kan deles inn i to typer avhengig av hva slags livssyklus de har (1). Dette er fager som følger en lytisk syklus, eller fager som følger en lysogen syklus. Fager som kun kan reproducere seg ved hjelp av den lytiske syklusen kalles for virulente fager, mens fager som kan reproducere seg ved hjelp av begge syklusene kalles for temperate fager. Et lytisk fag angriper en baktericelle, og DNAet vil replikeres innad i cellen for å produsere kopier av sitt eget genom (12). I tillegg vil det uttrykkes gener som koder for nye proteiner som kan fungere som en

proteinkappe. Deretter blir vertscellen lysert for å frigjøre de nye viruspartiklene som igjen kan angripe nye bakterieceller. Temperate fager kan også replikere seg som på samme måte som nevnt ovenfor, men de kan også gå en annen vei som kalles for den lysogene syklusen. Her vil faggenomet i stedet bli integrert inn i kromosomet til bakterien (12, 13). Når faget går inn i den lysogene syklusen og blir en del av kromosomet til bakterien så kalles dette for en profag. Her befinner profagen seg i et «latent» stadie hvor den ikke fremmer celledød eller produksjon av nye fagpartikler (13). Under celledelingen til vertsbakteriene så vil profagen bli replikert «passivt» sammen med kromosomet til vertsbakterien (12, 13). De kan forbli som en profag lenge, men de kan også gå over i en lytisk syklus (12). Dette initieres når miljømessige påkjenninger fører til skade på DNAet, som igjen induserer at profag DNAet går ut av bakteriekromosomet, etterfulgt av DNA replikasjon og lysis av bakteriecellene (13).

### **1.2.2. *Lactococcus lactis* spesifikke bakteriofager**

Fager som angriper *L.lactis* er hovedårsaken til fermenteringsfeil hos meieriene da *L.lactis* som nevnt tidligere er svært viktig for syrningen av melken ved bruk av mesofile syrekulturer (1, 14). Når fager angriper bakterier under fermenteringen ved fremstilling av ost, så vil syrningen gå ned og eventuelt stoppe (2). Dette fører til økonomiske tap for produsenten i tillegg til at det gir en økt risiko for at patogene mikroorganismer kan vokse i produktene og dårlig kvalitet.

Alle fager som angriper MSB hører til orden *Caudovirales*, og de fleste av de tilhører familien *Siphoviridae* (15). Fager fra familiene *Podoviridae* og *Myoviridae* har også blitt beskrevet for noen MSB. Felles for de er at de alle har dsDNA, men fager som tilhører familien *Siphoviridae* har en lang, ikke-kontraktil hale, mens fager som tilhører familien *Podoviridae* har en kort, ikke-kontraktil hale og fager som tilhører familien *Myoviridae* har en lang kontraktil hale (10, 15). De mest undersøkte MSB-fagene er de som angriper *L.lactis* og *Streptococcus thermophilus* som brukes i meieriindustrien (15). Fager som angriper *L.lactis* har blitt klassifisert i ti grupper, og gruppe 936, P335 og c2 ser ut til å forekomme hyppigst i meieriene (11, 16). Av disse har fager som tilhører 936-gruppen vist seg å være den mest forekommende og problematiske gruppen som angriper *L.lactis* i meieriene (11). Fager som tilhører gruppen P335 kan være virulente eller temperate, mens fager som tilhører gruppene c2 og 936 er kun virulente (6). Det er ikke kjent hvorfor disse tre gruppene av fager som angriper *L.lactis* dominerer i meieriene, men den fortsatte bruken av utvalgte stammer av *L.lactis* i starterkulturene som brukes i meieriene kan påvirke hvilke fager som kan formere seg (6, 16). Det første trinnet i angrepsprosessen for fager i gruppene 936 og P335 involverer gjenkjenning og binding til enheter av cellevegg polysakkarider (CWPS) på overflaten til bakteriecellene

(17). I motsetning til dette så antas det at c2 fager først binder seg reversibelt til et karbohydrat, etterfulgt av en irreversibel binding til enten et membran-assosiert faginfeksjonsprotein (Pip) eller en analog av dette proteinet kalt YjaE.

Det er flere kilder som kan føre til kontaminering av fager, blant annet råmelken (6). Fager kan også overleve pasteuriseringen. Andre kilder er også miljøet i meieriene som overflater og utstyr. Det har også vært spekulert i om syrekulturen som brukes under ystingen kan være en viktig kilde til kontaminering av fager da organismene i kulturene kan ha temperate fagpartikler i kromosomet, som senere kan gå over i en virulent form (2). Mange MSB stammer bærer profag, og det har ofte blitt funnet mer en ett profag i ett genom (18). Likevel så viste Kleppen et al. at DNA fra P335 ble oppdaget i kommersielle starterkulturer, men ved analyse av brukssyren og myseprøver fra Norge ble det ikke funnet tegn til at temperate P335 hadde blitt induisert og dermed ført til problemer under fermenteringen (7). DNA fra c2 fager og 936 fager ble ikke detektert i kommersielle syrekulturer. Videre ble det vist at fager fra omgivelsene innad i meieriet sannsynligvis er ansvarlig for forekomsten av fager i brukssyren, og ikke råmelken.

### **1.3. *Lactococcus lactis* og EPS**

Polysakkarider på overflaten til bakterieceller produseres av mange bakterier (19). Disse kan danne en kapsel rundt cellen som et kapsulært polysakkarid (CPSs), eller de kan bli festet til cellemembranen som O-antigenet til lipopolysakkarider (LPSs). Polysakkaridene kan også skilles ut som eksopolysakkarider (EPSs). De fleste *L.lactis* stammer produserer EPS, og disse er heteropolysakkarider som består av repeterende sukkerenheter, blant annet rhamnose, galaktose og sukrose (5, 20, 21). *Eps* operoner kan befinne seg på et plasmid eller på kromosomet (20, 22, 23). Ved produksjon av fermenterte melkeprodukter så er EPS nyttig for å øke viskositeten og dermed forbedre teksturen på produktene (20).

EPS kan blant annet beskytte cellen fra å tørke ut eller andre miljømessige påkjenninger, og de kan være involvert i patogenese, eller de kan fasilitere adhesjon av bakterier til overflaten (19, 24). Det har også vært diskutert om EPS kan beskytte mot fagangrep ved å forstyrre adsorpsjonen av fager til reseptorer på overflaten til bakteriecellene (14, 23, 25).

#### 1.4. Hensikt med studien

Fager er et problem hos meieriene i Norge (7). Frantzen et al. viste at variasjonen av fager i norske meierier er stor, og at følsomheten for fager varierer mye blant ulike stammer av *L.lactis* (9). Frantzen et al. viste også at genet *epsD* er til stede hos nesten alle stammer av *L.lactis* i kommersielle syrekulturer, og at det er en svært stor sekvensvariasjon i *epsD* mellom stammer av *L.lactis* (5). Dette tillater at ulike *L.lactis* stammer kan skilles fra hverandre ved hjelp av *epsD*. *EpsD* genet, sammen med *epsE* og *epsF* koder for glycosyltransferase som hos noen *L.lactis* stammer katalyserer de første trinnene i biosyntesen av EPS (22, 26). Dette gjør at *epsD* er essensielt for produksjon av EPS (20). Deveau et al. viste at plasmidet som inneholder *eps* operonet kan tapes ved gjentatte kultiveringer (25). Hovedmålet med denne studien var å undersøke om tilstedeværelse av EPS påvirker fagfølsomhet. I tillegg ble det undersøkt om kommersielle syrekulturer som meierier ofte bruker under produksjon av ost inneholder fager som angriper *epsD*-negative stammer av *L.lactis*.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1. Bakteriestammer

Det ble til sammen brukt 16 stammer av *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. 14 av disse hadde tidligere blitt isolert av Cyril Frantzen fra en syrekultur som meierier ofte bruker under osteproduksjon (5, 9). I tillegg ble også stammene IL1403 og UC509,9 brukt (27, 28). Disse stammene ble valgt ut basert på ulikheter i *epsD* sekvensen. Fra opprinnelig frysestock ble disse stammene podet i M17 buljong og det ble tilsatt 0,5 % glukose eller laktose avhengig av om stammene er laktose-positive eller laktose-negative. Etter inkubering over natt (ON), så ble det av disse overnattekkulturene (ONK) laget egne frysestocker med 15 % glycerol. Det ble brukt M17 buljong av typen Oxoid CM0817 og M17 agar av typen Oxoid CM0785. For LM17 buljong/agar ble det tilsatt 0,5 % laktose, og for GM17 buljong/agar ble det tilsatt 0,5 % glukose. GM17 ble kun brukt for IL1403. All inkubering ble gjort ved 30°C i varmeskap med mindre annet er oppgitt og sterilfiltrering ble gjort med et filter med en porestørrelse på 0,2 µm. De ulike stammene, samt om de er laktose-positive eller laktose-negative, og om de er *epsD*-positive eller *epsD*-negative, er vist i tabell 1 og 2.

**Tabell 1.** Stammer av *L.lactis* subsp. *lactis*, samt om de er laktose +/- og *epsD* +/- (5, 27).

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
Stamme	Laktose +/-	<i>epsD</i> +/-
IL1403	-	-
CF109	+	+
CF102	+	+
CF120	+	+
CF116	+	+

**Tabell 2.** Stammer av *L.lactis* subsp. *cremoris*, samt om de er laktose +/- og *epsD* +/- (5, 9, 28).

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
Stamme	Laktose +/-	<i>epsD</i> +/-
CF219	+	+
CF218	+	+
CF127	+	+
CF101	+	+
CF132	+	+
CF103	+	+
CF121	+	+
CF108	+	+
CF228	+	-
UC509,9	+	-
GA-39	+	+

## 2.2. Kultivering av *epsD*-positive stammer

Alle stammene ble kultivert i en periode for å undersøke om de kunne miste *epsD* spontant ved jevnlig kultivering, med unntak av IL1403, CF228 og UC509,9 da disse er *epsD*-negative i utgangspunktet. Dette ble gjort for å eventuelt kunne isolere *epsD*-negative stammer. Før dette ble startet ble det gjort en polymerase kjedereaksjon (PCR) med primere for *epsD* for å se at ONK av de 13 stammene var *epsD*-positive (for PCR, se nedenfor). For stammene som var *epsD*-positive ble LM17 buljong podet med 1 % kultur (fra dagen før) jevnlig frem til de eventuelt mistet *epsD*, og det ble gjort PCR regelmessig for å undersøke dette. Kulturene ble inkubert ved romtemperatur ON. Om PCR av kulturene ikke viste bånd for *epsD* ble de renstrøket på LM17 skåler, og inkubert ON. Dagen etter ble det plukket kolonier fra stammene med en steril tannpirker, og med disse koloniene ble det gjort en PCR med primere for *epsD* for å undersøke om de enkelte koloniene var *epsD*-negative. Om *epsD* ikke var til stede ble det laget en kultur av den *epsD*-negative kolonien ved å pøse LM17 buljong med den gitte kolonien ved hjelp av en steril tannpirker. Etter inkubering ON ble det dagen etter laget en frysestock av den *epsD*-negative stammen.

### **2.3. Undersøkelse av fagsensitivitet ved hjelp av plaque assay**

Plaque assay ble brukt for å undersøke fagsensitivitet på de ulike stammene. GM17 eller LM17 buljong ble podet med 2 % ONK. Ved OD 0,2-0,4 ble 3 ml softagar med en temperatur på 45°C tilsatt 10 % kultur, og slått over GM17/LM17 petriskåler. Softagaren ble laget ved å tilsette 33 % ferdiglaget LM17/GM17 buljong til LM17/GM17 ferdiglaget agar samt 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Etter at softagaren på skålene hadde stivnet, ble selve plakkings utført. Alle plakkinger ble utført i paralleller og gjentatt minst en gang.

#### **2.3.1. Sensitivitet for fag**

138 isolerte fager ble valgt ut for å undersøke om de 16 stammene samt de isolerte *epsD*-negative stammene var sensitive/ikke sensitive for disse fagene. Disse fagprøvene var fager isolert fra prøver fra brukssyren hos ulike TINE meierier ved produksjon av ost. Dette har blitt gjort av Cyril Frantzen (9). Fagene har tidligere blitt anrikt på vertsstamme i LM17 buljong og 5 mM CaCl<sub>2</sub> og sterilfiltrert. I tillegg så ble det brukt fem prøver fra brukssyretanken fra meieranlegget på Voss og på Nærbø, samt en myseprøve fra Voss for å undersøke tilstedeværelse av fager og stammenes sensitivitet for disse. Brukssyreprøver og myseprøven ble sentrifugert, og supernatanten ble sterilfiltrert før bruk. To av brukssyreprøvene kom fra Voss hvor den ene prøven ble tatt kl 06.30, mens den andre prøven ble tatt fra anlegget kl 15.00 samme dag. Oversikt over de 144 fagene og brukssyre/myseprøvene som ble undersøkt på de ulike stammene, er vist i vedlegg 1. Skålene ble plakket med maks 48 ulike fager/prøver (ufortynnet) av gangen fra en mikrotiterplate med en 48-pinner replikator. Denne ble brent av i 96 % etanol og avkjølt i dH<sub>2</sub>O mellom hver stemping. Sensitivitet ble registrert når klare plakk ble observert.

#### **2.3.2. Sammenligning av titer mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ**

Det ble undersøkt for forskjell i titer mellom *epsD*-positive og *epsD*-negative varianter. Fagene ble fortynnet fra 10<sup>-1</sup> til 10<sup>-6</sup> i en mikrotiterplate hvor det var tilsatt LM17 buljong med 5mM CaCl<sub>2</sub>. 20 µl av hver fagfortynning ble stemplet på skåler med sine vertsstammer, både *epsD*-positiv og *epsD*-negativ av samme stamme for å sammenlikne forskjell i sensitivitet. Skålene ble inkubert ON. Alle fagprøver ble sterilfiltrert på nytt før bruk.



## 2.4. Fager i syrekulturer

To like DL syrekulturer (blandet, udefinerte) med ulikt produksjonsnummer som ofte brukes under osteproduksjon ble undersøkt for tilstedeværelse av fager som er virksomme mot *epsD*-negative stammer. Disse syrekulturene er de samme som syrekulturen de 14 stammene er isolert fra (5). Følgende *epsD*-negative stammer ble brukt: GA-39, CF102, CF103, CF120, CF108, CF109 og CF132. LM17 buljong ble podet med 2 % ONK fra hver av stammene. Syrekulturene ble tint, og det ble tatt ut 1 ml fra hver av syrekulturene som ble tilsatt i et Falkon-rør. Det ble tilsatt LM17 buljong til 10 ml ble oppnådd, samt 50 µl 1M CaCl<sub>2</sub>. Dette ble sentrifugert og sterilfiltrert. Det ble tilsatt 1 ml av filtratet over i kulturrørene med de ulike stammene. I disse kulturrørene ble det også tilsatt 50 µl 1M CaCl<sub>2</sub>. Det ble laget kontroller for hver av stammene, altså rør med kultur men ikke med filtrat. Dette ble inkubert ON.

Dagen etter ble 1 ml kultur fra hver stamme tilsatt filtrat dagen før overført til et eppendorfrør. Dette ble sentrifugert og sterilfiltrert. LM17 buljong tilsatt 5mM CaCl<sub>2</sub> ble podet med 2% kultur fra kontrollene for hver stamme. Ved OD 0,2 i så ble disse tilsatt 2 % av det nye filtratet fra sin respektive stamme. «Ny» kultur med GA-39 ble altså tilsatt filtrat fra «gammel» kultur med GA-39. Dette ble inkubert ON.

Fra kulturene tilsatt filtrat så ble 1 ml sterilfiltrert over i nye eppendorfrør neste dag. Filtratene ble senere brukt til vekstmåling og plakking for å undersøke tilstedeværelse av fager. For oversikt over de ulike stammene og filtratene, se tabell 3.

**Tabell 3.** *EpsD*-negative stammer og deres tilhørende filtrat fra syrekultur. Filtratet stammer fra syrekulturer som har blitt anrikt på de ulike stammene.

<b><i>EpsD</i>-negativ stamme</b>	<b>Filtrat</b>
GA-39	Filtrat A
CF102	Filtrat B
CF103	Filtrat C
CF120	Filtrat D
CF108	Filtrat E
CF109	Filtrat F
CF132	Filtrat G

#### **2.4.1. Effekt av filtrat fra syrekultur på vekst**

For GA-39, CF102, CF103, CF120, CF108, CF109 og CF132 ble det gjort en vekstmåling med filtratene fra syrekulturene (tabell 3) for å se om det var fager i disse filtratene som hadde effekt på veksten til stammene. Dette ble først gjort på de *epsD*-negative stammene, og så på de *epsD*-positive morstammene. LM17 buljong med 5 mM CaCl<sub>2</sub> ble podet med 1 % ONK av de syv forskjellige stammene 190 µl av hver kultur ble tilsatt i hver sin rad i en mikrotiterplate (alle brønnene). Dette ble satt inn i et spektrofotometer (SpectroStarNano, BMG Labtech) i ca 2 timer ved 25°C. Det ble laget en ny mikrotiterplate med fortytninger fra 10<sup>-1</sup> til 10<sup>-10</sup> av filtrat A-G i LM17 buljong med 5 mM CaCl<sub>2</sub>. 10 µl av alle fortytningene ble overført til sine respektive vertsstammer. Altså ble filtratfortyning 10<sup>-1</sup> fra GA-39 (filtrat A) overført til brønn 1 i raden med kultur av GA-39 osv. OD i alle brønnene ble målt hvert 10 minutt i 16 timer i et spektrofotometer. Det samme ble gjort med alle filtratene på alle de *epsD*-negative stammene. Her ble det ikke tilsatt fortynt filtrat, men det ble tilsatt 10 µl ufortynnet filtrat av alle filtratene (A-G) til de syv *epsD*-negative stammene slik at alle filtratene ble testet mot alle stammene.

#### **2.4.2. Plakking med filtrat fra syrekultur**

Basert på resultatene fra vekstmålingene med filtratene, så ble filtrat A-G (tabell 3) brukt til å plakke på skåler med *epsD*-negative stammer og *epsD*-positive morstammer for å undersøke om fagene i filtratene ga plakk. Det ble laget en 10<sup>-1</sup> og 10<sup>-2</sup> fortytning av alle filtratene i LM17 buljong med 5 mM CaCl<sub>2</sub> i en mikrotiterplate. Ved hjelp av en 48-pinner replikator ble alle filtratene og fortytningene undersøkt på de syv stammene, både på de *epsD* negative stammene og de *epsD*-positive morstammene. Skålene ble inkubert ON ved romtemperatur. Se ovenfor for generell metode for plaque assay.

Det ble gjort en PCR (se nedenfor) og gel-elektroforese av filtratene med primere for fag 936, c2 og P335 basert på resultatene fra vekstmålingene og plakkingen for å undersøke tilstedeværelsen av disse fagene i filtratene.

## 2.5. Plasmidprofilering

Det ble gjort en plasmidisolering av *epsD*-negative stammer og deres *epsD*-positive morstammer. For prosedyre og utstyr henvises det til E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol (29). Følgende ble gjort annerledes enn protokollen: Det ble laget 5 ml ONK av stammene som ble sentrifugert i 5 minutter ved 5000 rpm, og i stedet for å tilsette 250 µl RNase A så ble det tilsatt 230 µl RNase A og 20 µl lysozym (40 mg/ml) for å lysere cellene. Dette ble satt ved 37°C i 10 minutter før neste trinn.

Plasmidisolatene ble undersøkt ved hjelp av gel-elektroforese, se nedenfor.

## 2.6. Polymerase kjedereaksjon og gel-elektroforese

PCR er en teknikk som brukes for å amplifisere DNA, og for PCR ble protokollen «PCR Protocol for OneTaq DNA Polymerase (M0480)» fra New England BioLabs brukt (30). Som DNA-templat ble 1 µl bakteriekultur/filtrat/koloni brukt. Dette ble tilsatt i PCR rør og varmet på 800 W i mikroovn i 2 minutter for å lysere cellene. Prøvene ble satt på is, og det ble tilsatt en PCR-miks bestående av:

1X 5X One *Taq* Standard Reaction Buffer

200 µM 10 mM dNTPs

0,2 µM Forward Primer

0,2 µM Reverse Primer

DNA (her ble det alltid brukt 1 µl eller en koloni)

1,25 enheter/50 µl PCR av One *Taq* DNA Polymerase

Nukleasefritt vann: til den totale mengden i PCR-rørene var 25 µl.

PCR-amplifisering (i S1000 Thermal cycler) ble gjort etter følgende forhold: Denaturering ved 94°C i 2 minutter etterfulgt av 30 sykluser med 94° i 30 sekunder, 55-68°C i 30 sekunder (temperatur var avhengig av primere som ble brukt), og 68°C i 1 minutt for elongering. Til slutt ble prøvene varmet til 68°C i 2 minutter for slutt-elongering.

PCR ble utført med forskjellige primere avhengig av hva slags gensekvenser det ble undersøkt for. For type primer og dens primersekvenser, samt annealingstemperatur (°C) som ble brukt ved PCR og forventet produktlengde (basepar) på PCR-produktene, se tabell 4.

**Tabell 4.** Primere (F=forward, R= reverse) og deres sekvenser, samt annealingstemperatur (°C) som ble brukt med de forskjellige primerne og forventet produktlengde på PCR-produktene (bp) (5, 31-33).

Primer	Sekvens (5`-3`)	Annealings-temperatur (°C)	PCR produktlengde (bp)	Referanse primere
<i>epsD</i> -138F	KCTTATYGC GGCTGCATT	60°C	466	(5)
<i>epsD</i> -604R	GATARTARAGTTCTAAATCTGCTCGT			
<i>purR</i> -324F	YACTCCATCAAATCTTCGTA AAAAT	55°C	487	(5)
<i>purR</i> -811R	TGTCATTA AATATATATTTCCCAATTGAACA			
<i>cwps con</i> -F	GTACACTATGTTTATAACAATCATCCAG	60°C	891	(32)
<i>cwps con</i> -R	GCAAACCAGATTCAAAGTCAGTATG			
936-Type F	GGACGGTTCTAAGTCGTTCCA	58°C	468	(33)
936-Type R	TCCTCAATTTCTTTCAAAGCGTT			
C2_lys_F	TGCACCTATGGTTGACGCTT	58°C	172	(33)
C2_lys_R	TTGACCGCCTGCATTACGAT			
335F	GAAGCTAGGCGAATCAGTAA	58°C	682	(31)
335R	GATTGCCATTTGCGCTCTGA			

\*R = A eller G, Y = C eller T, K = G eller T

PCR-prøvene og plasmidisolatene ble kjørt på 1 % agarosegel laget med 1X Tris-acetate-EDTA buffer (TAE-buffer) ved hjelp av gel-elektroforese for å separere PCR-produktene og plasmidisolatene (34). Det ble tilsatt 2 µl peq-green til 50 ml gel. Før oppstart av gel-elektroforesen ble det tilsatt «gel loading dye (6X)» til PCR-prøvene. Det ble brukt størrelsesmarkører fra New England BioLabs. PCR-produktene ble kjørt ved ca 30 min ved 85V. Plasmidisolater ble kjørt ved ca 3,5 timer ved 50V. Bildetaking av gel ble gjort med GelDoc XR+.

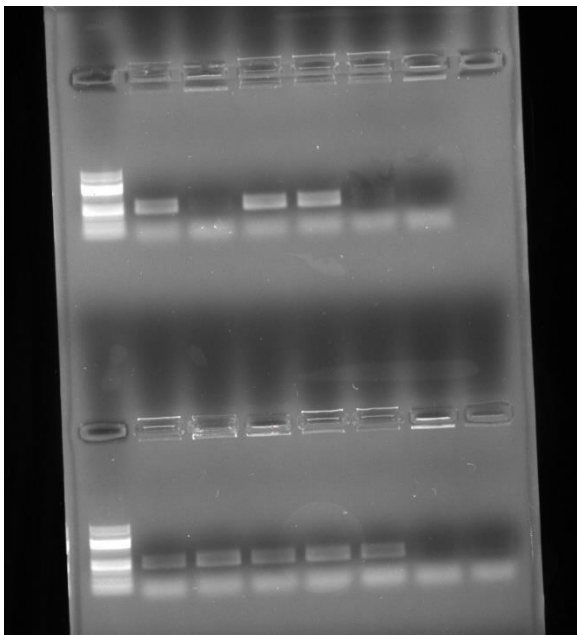
## **2.7. DNA sekvensering**

Det ble gjort en PCR av CF102 *epsD*-negativ med primere for *purR*, og av filtrat C, E, F og G (tabell 3) med primere for 936. PCR-produktene ble rensset ved hjelp av kit og protokoll for «NucleoSpin Gel and PCR Clean-up» (35). 5 µl av rensset DNA ble tilsatt i eppendorfrør med 5 µl 5 µM primer. For alle 5 prøvene som skulle undersøkes, så ble det laget en prøve med Forward primer og en prøve med Reverse primer. Prøvene ble sendt til GATC Biotech for sanger sekvensering (36).

### 3. Resultater

#### 3.1. Kultivering av *epsD*-positive stammer

Før kultiveringen av stammene startet ble det undersøkt om ONK av alle stammene var *epsD*-positive ved hjelp av PCR og gel-elektroforese. IL1403, CF228 og UC509,9 ble brukt som negative kontroller. Alle stammene fikk bånd for *epsD* (466 bp), og de ble kultivert jevnlig for å undersøke om de kunne miste *epsD* spontant. Kultiveringen av stammene ble startet på ulikt tidspunkt fordi tilstedeværelse av *epsD* for de ulike stammene ikke ble bekreftet samtidig. Etter syv dager og 6 overføringer for CF103, 127, CF102, CF132, CF109, 5 overføringer for CF219, CF101, CF116, CF218, CF121, GA-39 CF120, og 3 overføringer for CF108 så ble det gjort PCR av kulturene og gel-elektroforese av PCR-produktene for å se om de hadde mistet *epsD*. Resultatet er vist i figur 1.

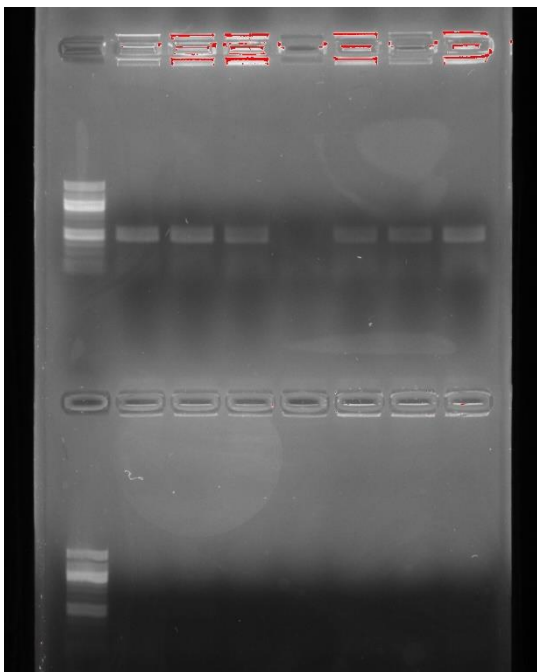


**Figur 1.** Tilstedeværelse/fravær av *epsD* (466 bp) i kulturer fra følgende stammer: Øvre rad: 1) 100 bp ladder, 2) CF103, 3) CF132, 4) CF127, 5) CF102, 6) CF109, CF120. Nedre rad: 1) 100 bp ladder, 2) CF219, 3) CF10, 4) CF116, 5) CF218, 6) CF121, 7) GA-39, 8) CF108.

PCR viste ingen bånd for *epsD* fra kulturene til CF132, CF109, CF120, GA-39 og CF108. Disse ble renstrøket på LM17 skåler, og dagen etter ble det gjort en PCR med samme primer på kolonier fra stammene og gel-elektroforese for å være sikker på at det ble laget frysestocker av *epsD*-negative celler. PCR viste ingen bånd for *epsD* i koloniene fra de fem stammene, så av disse koloniene ble det laget frysestocker.

Etter 10 dager og 9 overføringer for CF103, CF127, CF102, 8 overføringer for CF219, CF101, CF116, CF218 og CF121 ble tilstedeværelse av *epsD* igjen undersøkt hos de ulike stammene. PCR viste ingen bånd for *epsD* i noen av kulturene. Disse ble renstrøket på LM17 skåler. Koloniene til alle stammene var *epsD*-positive med unntak av en koloni fra CF103. Under kultivering av *epsD* positive stammer for å se om de kunne miste *epsD* spontant så ble det ofte registrert at kulturene ikke hadde bånd for *epsD*, men kolonier fra renstrykingen fikk bånd for *epsD*. Det ble det laget en frysestock av CF103 mens de andre stammene ble kultivert videre.

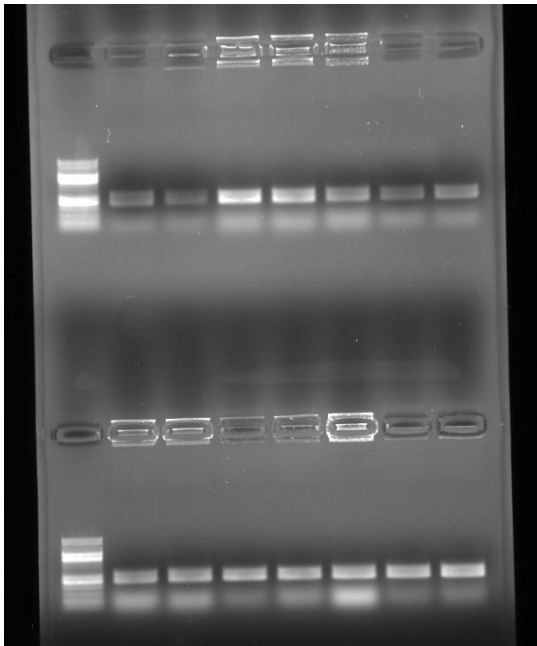
De gjenværende syv stammene ble igjen undersøkt for tilstedeværelse av *epsD* etter 16 dager og 12 overføringer for CF127 og CF102, 11 overføringer for CF219, CF101, CF116, CF218 og CF121. Ingen av kulturene viste bånd for *epsD* ved hjelp av PCR. Kulturene ble renstrøket på LM17 skåler, og dagen etter ble det gjort PCR og gel-elektroforese av kolonier til stammene for å undersøke om de enkelte koloniene var *epsD*-negative. Resultatet for CF102 er vist i figur 2. For CF116, CF218, CF219, CF127, CF101 og CF121 så hadde alle koloniene bånd for *epsD*.



**Figur 2.** Tilstedeværelse/fravær av *epsD* (466 bp) i kolonier fra kultur av CF102 uten bånd for *epsD*. 1) 100 bp ladder, 2-8) CF102.

Kolonien fra skålen med CF102 som ble brukt i brønn nr 5 viste ikke bånd for *epsD* ved hjelp av PCR. Det ble laget en frysestock av denne kolonien. Resten av kulturene som ikke hadde fått *epsD*-negative kolonier ble kultivert videre, men kultiveringen ble stoppet etter hvert da *epsD*-negative kolonier ikke hadde blitt isolert fra disse stammene etter 17 kultiveringer.

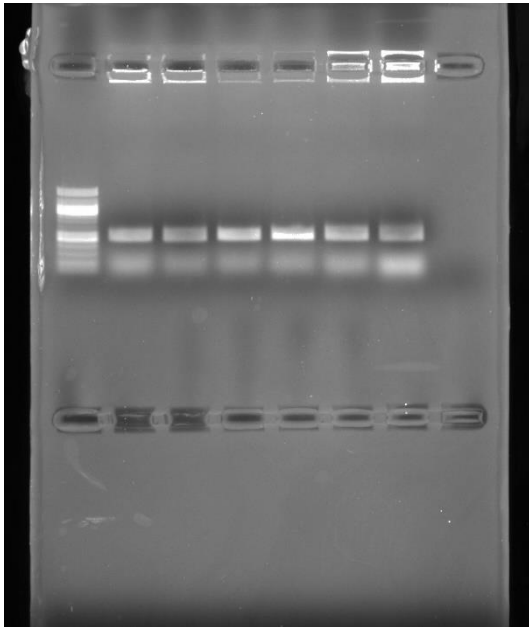
De *epsD*-positive kulturene ble senere renstrøket og det ble gjort en PCR og gel-elektroforese av kolonier fra kulturene for å undersøke at de var *epsD*-positive. Dette ble gjort for alle de *epsD*-positive kulturene med unntak av tre stammer (CF101, CF109 og CF132) da disse viste stor sensitivitet for *Lactococcus* fag. Resultatene er vist i figur 3 og 4.



**Figur 3.** Tilstedeværelse/fravær av *epsD* (466 bp) i kolonier fra *epsD*-positive kulturer av følgende stammer: Øvre rad: 1) 100 bp ladder, 2-3) CF103, 4-5) CF102, 6) CF219, 7-8) GA-39. Nedre rad: 1) 100 bp ladder, 2-3) CF108, 4-6) CF121, 7-8) CF218.

*EpsD* var til stede i alle koloniene til CF103, CF102, CF219, GA-39, CF108, CF121 og CF218. For de resterende stammene, se figur 4.

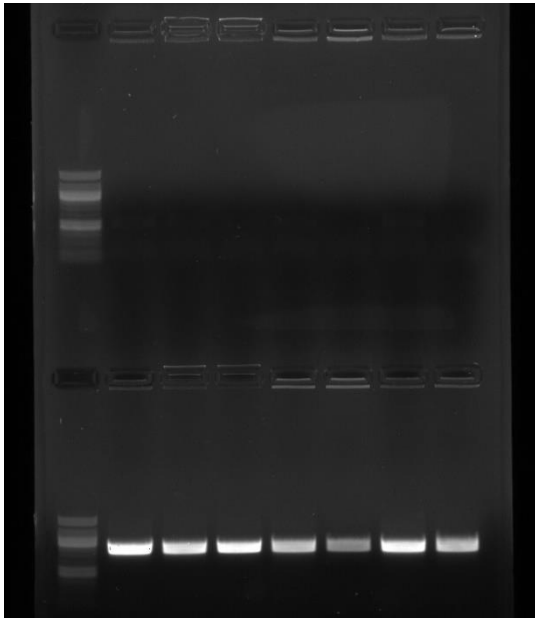




**Figur 4.** Tilstedeværelse/fravær av *epsD* (466 bp) i kolonier fra *epsD*-positive kulturer av følgende stammer: 1) 100 bp ladder, 2-3) CF120, 4-5 CF127, 6-7) CF116.

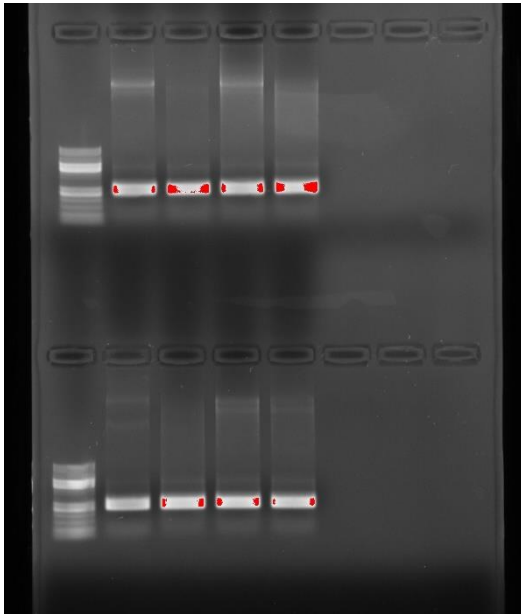
Som vist i figur 4 så var alle koloniene til CF120, CF127 og CF116 også *epsD*-positive. Det ble laget en ny *epsD*-positiv frysestock av alle de ti stammene som nå erstattet de «gamle» *epsD*-positive frysestockene. Fra disse «nye» *epsD*-positive stammene så ble også disse kultivert hver dag for å se om de kunne miste *epsD*. Dette ble gjort for at de *epsD*-negative stammene og de *epsD*-positive stammene skulle komme fra samme kultur. Etter 18 dager og 16 kultiveringer hadde ingen av kulturene (kolonier) blitt *epsD*-negative, og kultiveringen ble avsluttet.

Etttersom kultiveringen av de nye *epsD*-positive stammene for å gjøre de *epsD*-negative ikke var vellykket, ble de syv *epsD*-negative stammene (fra «gammel» *epsD*-positiv frysestock) undersøkt med PCR og gel-elektroforese hvor det ble brukt primere for *purR* og *cwps* (*rmlB* gen (32)). Dette ble gjort for å være sikker på at de *epsD*-negative stammene bestod av *Lactococcus*. Resultatet er vist i figur 5.



**Figur 5.** Tilstedeværelse/fravær av *purR* (487 bp) og *cwps* (891 bp) i *epsD*-negative kulturer av følgende stammer: Øvre rad m/ *purR*: 1) 100 bp ladder, 2) CF132, 3) CF109, 4) CF108, 5) GA-39, 6) CF102, 7) CF103, 8) CF120. Nedre rad m/*cwps*: 1) 100 bp ladder, 2) CF132, 3) CF109, 4) CF108, 5) GA-39, 6) CF102 7) CF103, 8) CF120.

Ingen av de syv *epsD*-negative stammene fikk bånd for *purR*, men alle fikk bånd med størrelse for *cwps* (487 bp). Her ble det brukt 60°C som annealingstemperatur for begge primerne. 60°C var feil for *purR*, da denne temperaturen er for høy. Annealingstemperaturen for *purR* ble undersøkt en gang til, og justert ned til 55°C og det ble gjort en ny PCR og gel-elektroforese med primere for *purR* for CF102, GA-39, CF103 og CF109. Her ble det brukt både *epsD*-negative stammer og *epsD*-positive «morstammer», og disse stammene ble valgt ut fordi de viste en forskjell i sensitivitet (ikke CF103) for fag mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ (se nedenfor). Resultatet er vist i figur 6.



**Figur 6.** Tilstedeværelse/fravær av *purR* (487 bp) i *epsD*-positive og *epsD*-negative kulturer av følgende stammer: Øvre rad: 1) 100 bp ladder, 2) CF102(+), 3) CF102(-), 4) GA-39(+), 5) GA-39(-). Nedre rad: 1) 100 bp ladder, 2) CF103(+), 3) CF103(-), 4) CF109(+), 5) CF109(-).

Som vist i figur 6 så hadde alle stammene bånd for *purR*.

## 3.2. Undersøkelse av fagsensitivitet ved hjelp av plaque assay

### 3.2.1. Sensitivitet for fager

Alle stammene, både de *epsD*-positive og *epsD*-negative ble undersøkt for sensitivitet til 144 fag/brukssyre/myseprøver (sensitiv/ikke sensitiv). Fagprøvene som ble brukt her var isolerte fager fra prøver fra brukssyretanken hos ulike TINE meierier og brukssyre/myseprøver som også stammet fra ulike TINE meierier (9). Resultatet er vist i tabell 5.

**Tabell 5.** Undersøkelse av fagsensitivitet (sensitiv (+)/ikke sensitiv (-)) for de *epsD*-positive og *epsD*-negative stammene av GA-39, CF102, CF103, CF108, CF109 og CF132, samt IL1403 (*epsD*-negativ), CF228 (*epsD*-negativ) og CF101 (*epsD*-positiv). I tabellen er det kun presentert resultater for *epsD*-negativ variant og *epsD*-positiv morstamme i tillegg til andre stammer som også viste sensitivitet for fag. Stammer som ikke var sensitive for noen fag/brukssyre/myseprøver ble utelatt, og fager som ikke hadde noen vert ble fjernet fra tabellen. Se vedlegg 1 og 2 for fullstendige tabeller.

Fagprøve	Stamme															
	GA-39		CF102		CF103		CF108		CF109		CF132		IL1403	CF228	CF101	
	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> -	<i>EpsD</i> +	
φ-8-25	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ342/D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
φ43-8 Voss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ803/A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
φ803-J	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
φ805/A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
φ805-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
φ805-N	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ806/A6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
φ807-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ807-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ812/J350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
φ812- Voss	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
φ812- U2/N	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
φ813/B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
φ814/137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
φ815/B3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
φ815-J	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
φ816/B4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
φ816-J	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+

	GA-49		CF102		CF103		CF108		CF109		CF132		IL1403	CF228	CF101
	<i>EpsD+</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD+</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD+</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD+</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD+</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD+</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD-</i>	<i>EpsD+</i>
φ820/B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ824/B12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
φ827/C3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ831/C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φ833/C9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
φ835/C11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
φ840/D4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
φ841/D5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φ844/D8	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
φ863/F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ868/F8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
φ870/F10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
φ873/G1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
φ889/H5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ845/D9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
φ851/E3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ854/N	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
φ858/E10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
φ863/J	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
φ863/N	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
φ863/V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ864/F4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
φ867/F7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ871/F11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ874/G2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
φ876/64	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ877/G5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
φ884/G12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
φ885/H1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ886/H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φ888	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
φ890/H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φGA-15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-21	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
φGA-24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-50-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
φGA-54	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-70	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
φGA-3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

	GA-49		CF102		CF103		CF108		CF109		CF132		IL1403	CF228	CF101
	EpsD+	EpsD-	EpsD+	EpsD-	EpsD+	EpsD-	EpsD+	EpsD-	EpsD+	EpsD-	EpsD+	EpsD-	EpsD-	EpsD-	EpsD+
φGA-10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
φGA-13-N	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-13-V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
φGA-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φGA-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φGA-40-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
φGA-40-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
φGA-42-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-42-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-43	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
φGA-44	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-51	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
φGA-60-V	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ801A1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
φ811	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
φ830/C6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
φ832/C8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
φ839-J	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
φ847/D11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ880/G8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
φ895/H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B.syre 19/7 Nærbø	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
B.syre 2/1/14 Nærbø	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
B.syre 7/8 Voss	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Voss 06.30	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Voss 15.00	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Antall positive	5	0	36	0	7	7	1	1	28	24	14	14	31	10	42
Forskjell	5		36		0		0		4		0				

GA-39 *epsD*-positiv var sensitiv for 5 brukssyreprøver, og *epsD*-negativ var resistent mot alle prøver. Det samme gjaldt for CF102, hvor *epsD*-positiv var sensitiv for 36 fager, og *epsD*-negativ var resistent mot alle fager. CF103 *epsD*-positiv og *epsD*-negativ var begge sensitive for 7 fager. CF108, både *epsD*-positiv og *epsD*-negativ var sensitiv for 1 fag. CF109 *epsD* positiv var sensitiv for 28 fager, mens *epsD*-negativ var sensitiv for 24 fager. *EpsD*-positiv var sensitiv for  $\phi$ 505-N,  $\phi$ 833/C9,  $\phi$ 877/G5 og  $\phi$ 830/C6, men det var ikke CF109 *epsD*-negativ. CF132 *epsD*-positiv og *epsD*-negativ var sensitive for de samme 14 fagene. IL1403 viste sensitivitet for mange fager, og det gjorde også CF101 *epsD* positiv. CF228 hadde noe sensitivitet.

### 3.2.2. Sammenlikning av titer mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ

Det ble også undersøkt for forskjell i sensitivitet for samme fag mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ for stammene GA-39, CF102, C103, CF108, CF109 og CF132. Dette ble gjort ved å fortynne noen utvalgte bakteriofager fra  $10^{-1}$  til  $10^{-6}$  som de ulike stammene var sensitive for/viste forskjell i sensitivitet mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ. Resultatet er vist i tabell 6.

**Tabell 6.** Forskjell i sensitivitet for samme fag mellom *epsD* negativ variant og *epsD* positiv morstamme. Ikke sensitiv = (-). Antall plakk er oppgitt i PFU/ml.

Stamme og fag ( $\phi$ )	PFU/ml	
	<i>EpsD</i> +	<i>EpsD</i> -
<b>CF102</b>		
$\phi$ 870/F10	$1,5 \times 10^6$	-
$\phi$ GA-40-1	$7 \times 10^7$	-
$\phi$ 815/B3	-	-
$\phi$ 888	$2 \times 10^8$	-
$\phi$ 851/E3	$5 \times 10^7$	-
<b>CF103</b>		
$\phi$ GA-60-V	$1,5 \times 10^5$	$>5 \times 10^5$
$\phi$ 864/F4	$2,5 \times 10^6$	$>5 \times 10^5$
$\phi$ GA-21	$2 \times 10^4$	$3 \times 10^3$
$\phi$ 840/D4	$2 \times 10^5$	$>5 \times 10^5$
$\phi$ 863-N	$2,5 \times 10^5$	$>5 \times 10^4$

<b>CF109</b>		
Φ877/G5	$4 \times 10^3$	$4 \times 10^3$
Φ833/C9	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$
Φ805-N	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
Φ830/C6	-	-
Φ824/B12	$2,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
Φ858/E10	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
<b>GA-39</b>		
B.syre 19/7 Nærbø	-	-
B.syre 2/1/14 Nærbø	-	-
B.syre Voss 7/8	-	-
Voss 06.30	-	-
Voss 15.00	-	-
<b>CF108</b>		
Φ844/D8	$>5 \times 10^6$	$5 \times 10^7$
<b>CF132</b>		
Φ831/C7	$2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$
Φ805/A5	$4,5 \times 10^4$	$3 \times 10^5$
ΦGA-20	-	-
Φ890/H6	$4 \times 10^6$	$7 \times 10^6$
ΦGA-40-2	-	$4 \times 10^3$

CF102 *epsD*-negativ var helt resistent til de samme fagene som CF102 *epsD*-positiv var svært sensitiv for. Ingen av stammene var sensitive mot fag φ815/B3. CF103 *epsD*-negativ var mindre sensitiv enn *epsD*-positiv for de samme fagene, med 1 log i forskjell for alle fagene med unntak av φGA-60-V og φ840/D4 . For *epsD*-negativ var det vanskelig å se de enkelte plakkene. CF109 *epsD*-positiv og *epsD*-negativ viste omtrent helt lik sensitivitet for de samme fagene. Ingen av de var sensitiv for φ830/C6. GA-39 viste ingen sensitivitet for noen av brukssyreprøvene, hverken *epsD*-positiv eller *epsD*-negativ. CF108 *epsD*-negativ var mer sensitiv for φ844/D8 enn *epsD*-positiv, med ca 1 log i forskjell. For *epsD*-positiv var det vanskelig å se de enkelte plakkene. CF132 *epsD*-positiv var mindre sensitiv for alle fagene enn *epsD*-negativ av samme stamme. For φGA-40-2 var *epsD*-positiv helt resistent, mens *epsD*-negativ viste sensitivitet for fagen. Hverken *epsD*-positiv eller *epsD*-negativ viste sensitivitet for φGA-20.

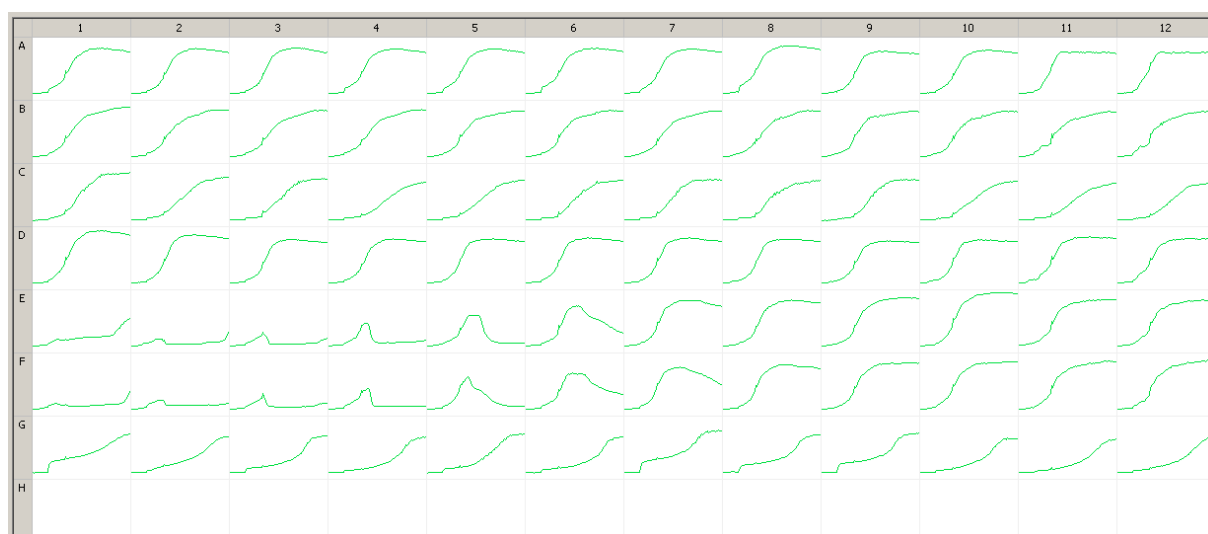


### 3.4. Fager i syrekulturer

En DL syrekultur (blandet, udefinerte) som ofte brukes under osteoproduksjon ble undersøkt for tilstedeværelse av fager som er virksomme mot *eps*-D negative stammer.

#### 3.4.1. Effekt av filtrat fra syrekultur på veksthastighet

For GA-39, CF102, CF103, CF120, CF108, CF109 og CF132 så ble det gjort en vekstmåling av de *eps*D-positive og *eps*D-negative kulturene tilsatt filtrat fra syrekulturene (filtrat A-G, se tabell 3) for å se om det var fag i disse filtratene som hadde effekt på veksten til stammene. Filtratene ble fortynnet fra  $10^{-1}$  til  $10^{-10}$ . Filtrat A fra GA-39 ble tilsatt til GA-39 osv. OD i alle brønnene ble målt hvert 10 minutt i 16 timer i et spektrofotometer (OD 600nm). Resultater for de *eps*D-negative stammene er vist i figur 7.

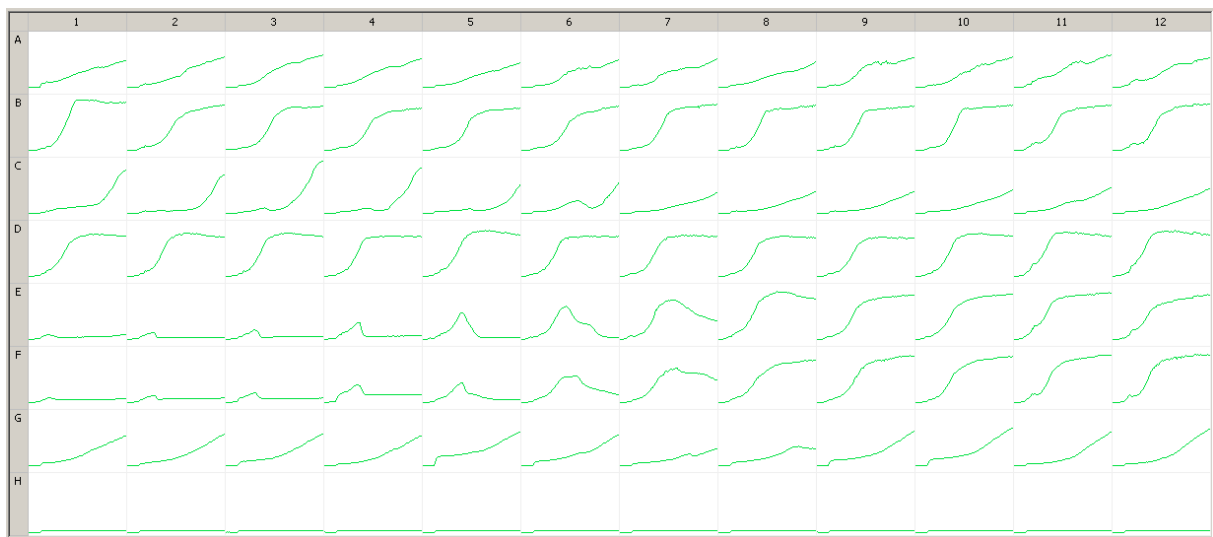


**Figur 7.** Vekst av de ulike *eps*D-negative stammene ved tilsetning av filtrat fra syrekultur etter anrikning. Hver stamme ble tilsatt fortynninger av filtrat anriket på seg selv. Rad A) GA-39, B) CF102, C) CF103, D) CF120, E) CF108, F) CF109 og G) CF132. 1-10 viser fortynning av filtrat, 11 og 12 er kontroll uten tilsatt filtrat.

Som en kan se i figur 7 så var ikke GA-39, CF102, CF103, CF120 og CF132 sensitiv for eventuelle fag i henholdsvis filtrat A, B, C, D og G. Veksten til CF108 ble påvirket av fager i filtrat E. En kan se at ved fortynning  $10^{-1}$  og  $10^{-2}$  var det svært lite vekst, men OD økte noe på slutten. Ved fortynning  $10^{-3}$  og  $10^{-4}$  vokste stammene til en liten topp, før OD gikk ned igjen (cellene lyserte). OD økte litt på slutten. Ved fortynning  $10^{-5}$  skjedde det samme, bare at her kunne en se en større topp, men etter hvert falt OD. Ved fortynning  $10^{-6}$  kunne det sees en større topp før OD gikk rett ned igjen og den ble ikke tatt opp. Ved fortynning  $10^{-7}$  var det god vekst,

men det så ut til at OD gikk noe ned til slutt. For fortytning  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  og  $10^{-10}$  så det ikke ut til at veksten hadde blitt påvirket av fager da vekstkurvene så like ut som kontrollene i brønn 11 og 12 uten tilsatt filtrat. Det samme gjaldt for CF109. Her så det ut til at veksten ble påvirket av fager i filtrat F, og veksten ved de ulike fortytningene hadde samme mønster som for CF108.

Det samme ble også gjort med de *epsD*-positive stammene, hvor filtrat A-G anriket på de *epsD*-negative stammene ble tilsatt til de *epsD*-positive stammene for å se om effekten var den samme. Resultatene er vist i figur 8.



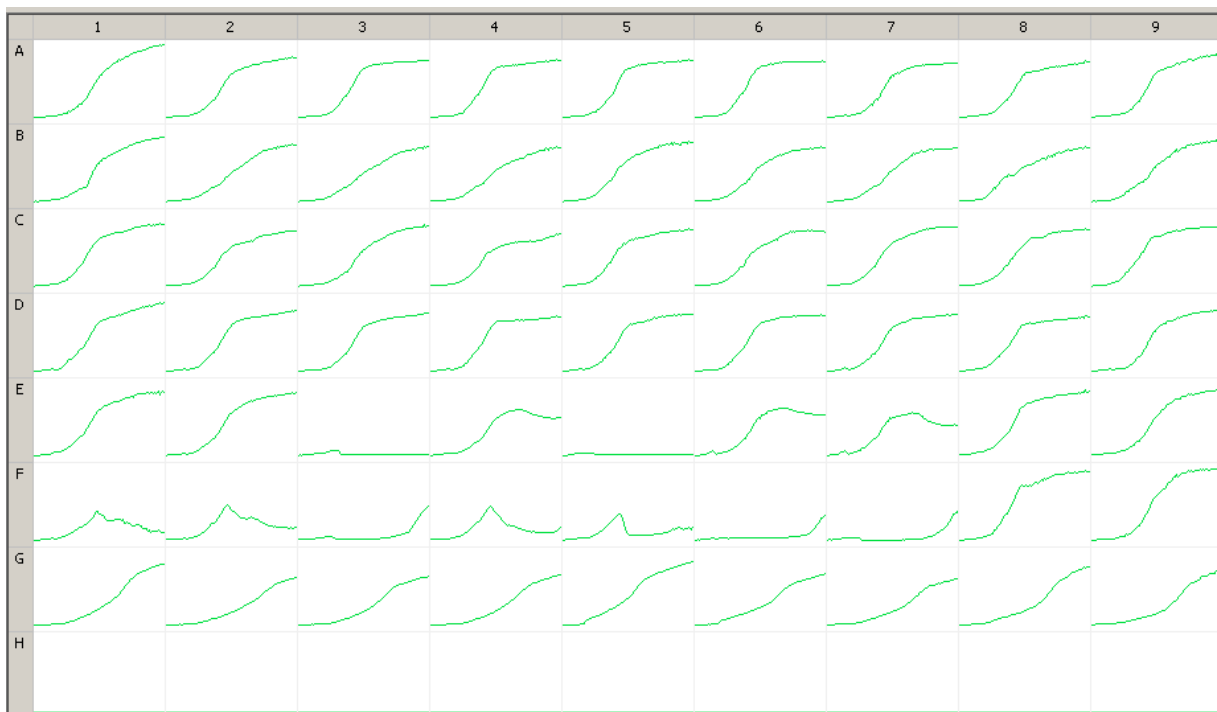
**Figur 8.** Vekst hos de ulike *epsD*-positive stammene ved tilsetning av filtrat fra syrekultur etter anriking. Hver stamme ble tilsatt fortytninger av filtrat anriket på *epsD*-negativ stamme. Rad A) GA-39, B) CF102, C) CF103, D) CF120, E) CF108, F) CF109 og G) CF132. Brønn 1-10 viser fortytning av filtratene, 11 og 12 er kontroller uten tilsatt filtrat.

Som en kan se i figur 8 så var ikke GA-39, CF102, CF120 og CF132 sensitiv for fager i henholdsvis filtrat A, B, D og G. Det kan se ut som at veksten til CF103 ble påvirket av fager i filtrat C da kurvene fra fortytning  $10^{-1}$  til  $10^{-6}$  hadde en lang lagfase før veksten økte kraftig bortsett fra ved fortytning  $10^{-6}$  da det ser ut til at det var lysis av cellene. I brønn med  $10^{-7}$  til  $10^{-10}$  samt kontrollene i brønn 11 og 12 var veksten slak og stabil hele veien. Veksten til CF108 ser ut til å ha blitt påvirket av fager i filtrat E. I fortytning  $10^{-1}$  til  $10^{-3}$  var det nesten ikke er noe vekst i det hele tatt, og i de andre fortytningene ( $10^{-4}$  til  $10^{-7}$ ) så kunne det sees en litt større topp, før OD gikk ned igjen. Veksten i brønnene ble likevel større for hver fortytning, og for alle fortytningene så det ut til at OD gikk ned igjen og flatet helt ut/ble ikke tatt opp igjen. Fortytning  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  og  $10^{-10}$  så ikke ut til å ha effekt på veksten til CF108, da kurvene var like som kontrollene i brønn 11 og 12. Veksten til CF109 så ut til å påvirkes av fager i filtrat F, og

vekstkurvene ved de ulike fortynningene var svært like vekstkurvene for CF108. Det ser også ut til at det var noe lysis av celler i brønnen med fortynning  $10^{-8}$  for CF132, men ikke i noen av de andre brønnene med andre fortynninger.

Ut i fra målingene i figur 7 og 8 kan en også se at *epsD*-positiv stamme generelt vokser saktere enn *epsD*-negativ stamme. Dette gjelder spesielt for GA-39 og CF103.

Ufortynnet filtrat (A-G) ble også tilsatt til alle de *epsD*-negative stammene slik at alle filtratene ble testet mot alle stammene. Resultatet er vist i figur 9.



**Figur 9.** Vekst hos de ulike *epsD*-negative stammene ved tilsetning av filtrat fra syrekultur etter anrikning. Hver stamme ble tilsatt alle filtratene A-G. Rad med stammer: A) GA-39, B) CF102, C) CF103, D) CF120, E) CF108, F) CF109 og G) CF132. Kolonner med filtrat: Kolonne 1) filtrat A tilsatt, 2) filtrat B, 3) filtrat C, 4) filtrat D, 5) filtrat E, 6) filtrat F, 7) filtrat G. Kolonne 8 og 9 er kontroller uten tilsatt filtrat.

GA-39, CF102, CF103, CF120 og CF132 ble ikke påvirket av fager i noen av filtratene. Veksten til CF108 ble ikke påvirket av fager i filtrat A og B. Ved tilsetning av filtrat C og E ble det ingen/svært lite vekst i brønnene. Ved tilsetning av filtrat D, F og G ble veksten noe påvirket ved at OD gikk ned igjen på slutten av målingene som følge av lysis av cellene, og veksten flatet ut. CF109 var sensitiv for fager i alle filtratene. Ved tilsetning av filtrat A, B, D og E fikk veksten en topp før OD gikk ned og flatet ut. For filtrat D og E ble det noe vekst igjen på slutten

av målingene. Ved tilsetning av filtrat C, F og G fikk kulturene en veldig lang lag-fase før veksten økte kraftig.

### 3.4.2. Påvisning med plaque assay

De syv filtratene (filtrat A-G, tabell 3) ble brukt til å undersøke tilstedeværelse av fager i syrekultur og de syv stammenes sensitivitet for disse (både *epsD*-negative og *epsD*-positive). Det ble laget en  $10^{-1}$  og  $10^{-2}$  fortynning av alle filtratene. Ved hjelp av en 48-pinner replikator ble alle filtratene undersøkt på de syv stammene. Resultatet er vist i tabell 7.

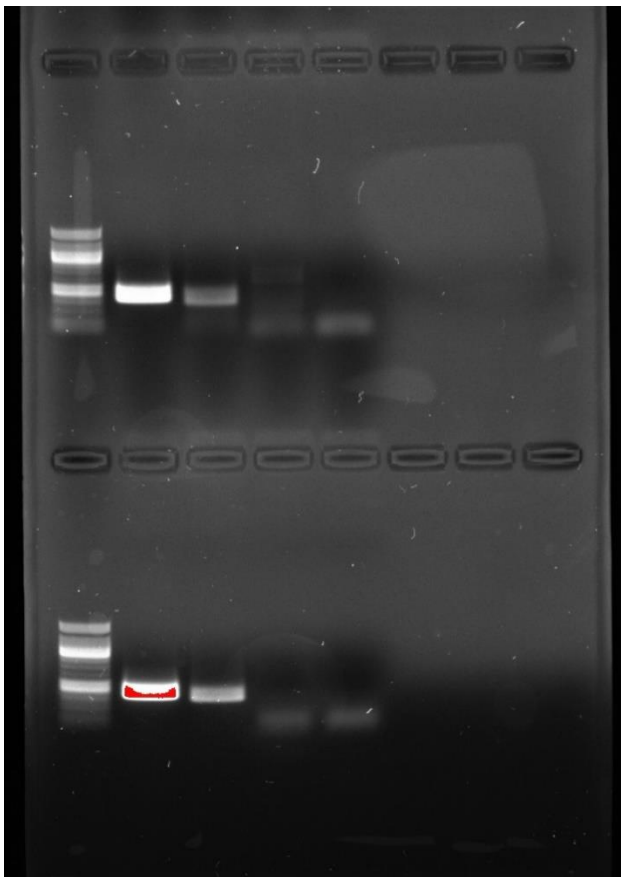
**Tabell 7.** Sensitivitet (+/-) for fager i syrekultur hos ulike stammer (*epsD* positiv og *epsD* negativ). Filtrat A = syrekultur anriket på GA-39, B = CF102, C = CF103, D = CF120, E = CF108, F = CF109, G = CF132. Sensitiviteten ble undersøkt på  $10^{-1}$  og  $10^{-2}$  fortynning av filtratene. Resultatene for stammene GA-39, CF102, CF103 og CF120 ble ikke tatt med i tabellen da de ikke var sensitive til fager i noen av filtratene. Se vedlegg 3.

<i>EpsD</i> +/-	CF108		CF109		CF132	
	+	-	+	-	+	-
<b>Filtrat (A-G)/ Fortynning</b>						
<b>A</b>						
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>						
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	-	-
<b>C</b>						
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	-	-
10 <sup>-2</sup>	-	+	+	+	-	-
<b>D</b>						
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	-	-
<b>E</b>						
10 <sup>-1</sup>	+	+	-	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	+	+	-	-	-	-
<b>F</b>						
10 <sup>-1</sup>	-	-	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	-	-	+	+	+	-
<b>G</b>						
10 <sup>-1</sup>	-	-	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	-	-	+	+	+	-

CF108, både *epsD*-positiv og *epsD*-negativ var sensitiv for fager i filtrat C og E. *EpsD*-positiv var noe mindre følsom for fager i filtrat C enn *epsD*-negativ da den ikke var sensitiv for fortynning  $10^{-2}$  av filtrat C i motsetning til *epsD*-negativ. CF109, både *epsD* positiv og *epsD* negativ var sensitiv for fager i filtrat C, F og G samt begge fortynninger. CF132 var sensitiv for fager i filtrat F og filtrat G. *EpsD*-negativ var mindre sensitiv for begge filtratene da den ikke fikk plakk på fortynning  $10^{-2}$ , i motsetning til *epsD*-positiv.

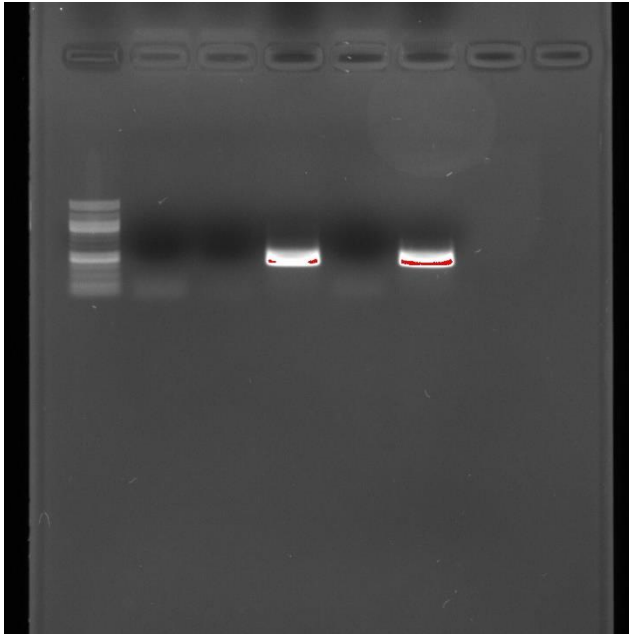
### 3.4.3. PCR av fager fra syrekultur

Det ble gjort en PCR og gel-elektroforese av filtrat A-G for å undersøke hva slags fager som var til stede i filtratene basert på vekstmålingene og plakkingen. Det ble brukt primere for fag 936, c2 og P335. Resultater for filtrat E og F er vist i figur 10.



**Figur 10.** Tilstedeværelse/fravær av fag 936 (468 bp), c2 (172 bp) og P335 (682 bp) i filtrat E og F fra syrekultur. Øvre rekke: 1) 100 kb ladder, 2) filtrat F m/936, 3) filtrat F m/c2, 4) filtrat F m/335, 5) 1000 x fortynning av filtrat F m/335. Nedre rekke: 1) 100 kb ladder, 2) filtrat E m/936, 3) filtrat E m/c2, 4) filtrat E m/335, 5) 1000 x fortynning av filtrat E m/335.

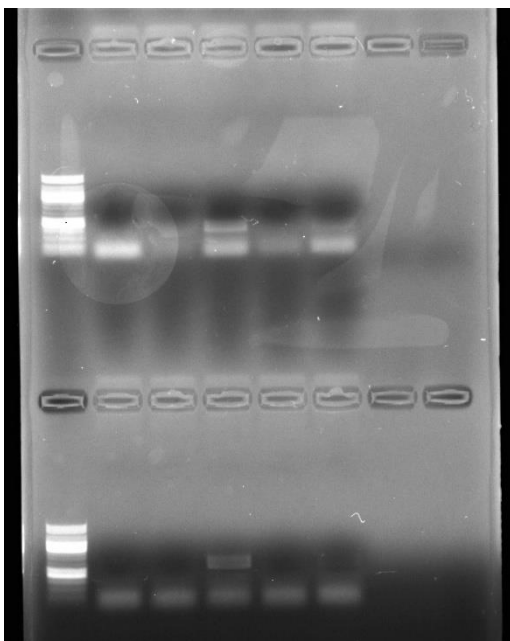
Fag 936 var til stede i begge filtratene da det ser ut til at de fikk bånd på ca 468 bp. Det var vanskelig å se om de nederste båndene i gelen var bånd for c2. For P335 så var båndene som ble observert fra begge filtratene for små. Resultater for resten av filtratene er vist i figur 11.



**Figur 11.** Tilstedeværelse/fravær av fag 936 (468 bp) i filtrat A, B, C, D og G fra syrekultur. Øvre rekke: 1) 100 kb ladder, 2) filtrat A, 3) filtrat B, 4) filtrat C, 5) filtrat D, 6) filtrat G.

Fag 936 var til stede i filtrat C og filtrat G, men ikke i filtrat A, B og D.

Filtrat A, B, C, D og G ble også undersøkt for tilstedeværelse av fag c2 og 335, som vist i figur 12.

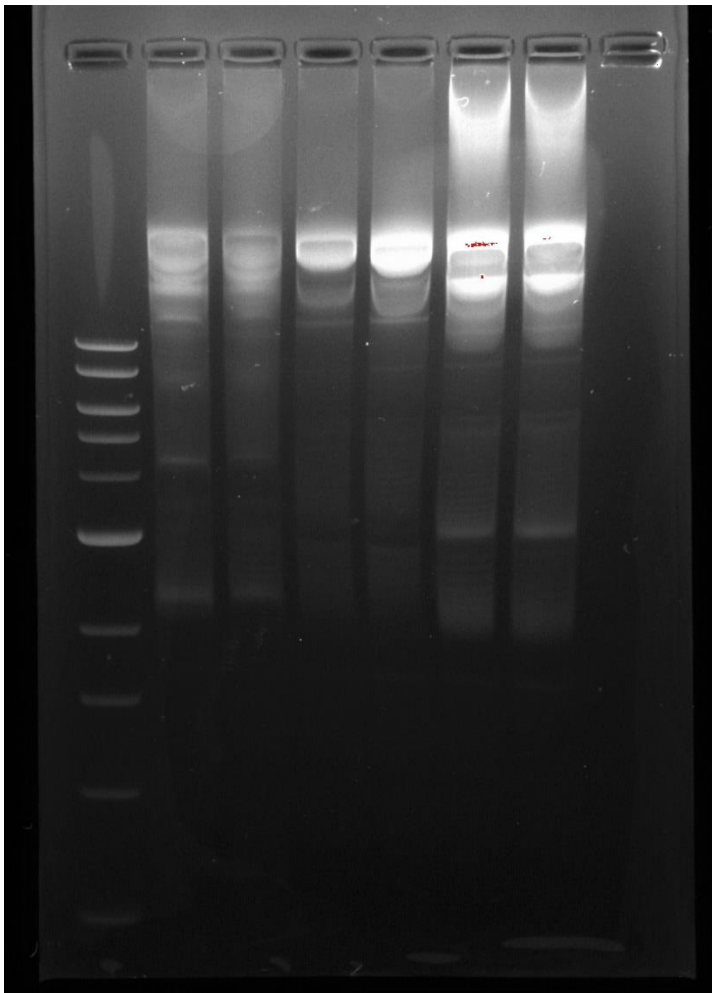


**Figur 12.** Tilstedeværelse/fravær av fag c2 (172 bp) og P335 (682 bp) i filtrat A-D, samt G. Øvre rekke med primer for c2: 1) 100 bp ladder, 2) Filtrat A, 3) filtrat B, 4) filtrat C, 5) filtrat D, 6) filtrat G. Nedre rekke med primer for P335: 1) 100 bp ladder, 2) filtrat A, 3) filtrat B, 4) filtrat C, 5) filtrat D, 6) filtrat G.

Det var vanskelig å tyde om det var bånd på ca 172 for fag c2 i den øvre rekken, selv om noen av de var ganske sterke. Når det gjelder fag P335 kunne det se ut til at filtrat C inneholdt P335 fag da den fikk et bånd på ca 700 bp.

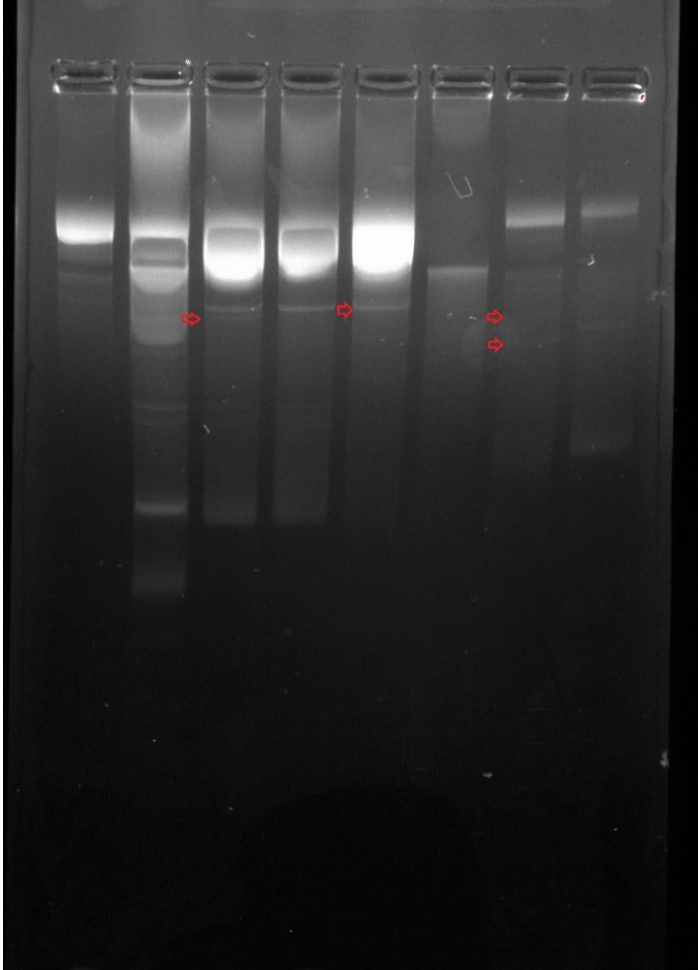
### 3.5. Plasmider i *epsD*-positive og *epsD*-negative stammer

Det ble gjort en plasmidisolering av GA-39, CF102, CF103, CF120, CF108, CF109 og CF132. *EpsD*-positive og *epsD*-negative stammer ble sammenliknet for å kunne se om det var noen forskjell i tilstedeværelse av plasmider. Resultatet for CF132, CF109 og CF120 er vist i figur 13.



**Figur 13.** Plasmidprofil av *epsD* positive og *epsD*-negative stammer. Brønn 1) 1 kb ladder, 2) CF132 (+), 3) CF132 (-), 4) CF109 (+), 5) CF109 (-), 6) CF120 (+), 7) CF120 (-).

Det kan se ut som det ikke var noen forskjell i plasmidprofil mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ for CF132, CF109 og CF120. For gelbilde fra plasmidisolering for stammene GA-39, CF108, CF102 og CF103 se figur 14.



**Figur 14.** Plasmidprofil av *epsD* positive og *epsD*-negative stammer. Brønn 1) GA-39 (+), 2) GA-39 (-), 3) CF108 (+), 4) CF108 (-), 5) CF102 (+), 6) CF102 (-), 7) CF103 (+), 8) CF103 (-).

Ut i fra figur 14 ser det ut til at det var en forskjell i plasmidprofil mellom GA-39 *epsD*-positiv og *epsD*-negativ da sistnevnte viste flere bånd enn *epsD*-positiv. Det ser ut til at CF108 *epsD*-positiv hadde et bånd som manglet hos *epsD*-negativ. For CF102 kan det også se ut til at *epsD*-positiv hadde et bånd som manglet hos *epsD*-negativ. Dette gjelder også for CF103. Det ene plasmidet hos *epsD*-negativ lå «mellom» de to plasmidene til *epsD*-positiv.



### 3.6. DNA Sekvensering

Det ble gjort en PCR av CF102 *epsD*-negativ med primere for *purR* for å sekvensere på *purR*, og en PCR av filtratene (tabell 3) med primere for 936 for å sekvensere på produktet head protease. Før prøvene ble sendt til sekvensering ble noe av PCR produktene kjørt på gel for å undersøke at de ønskede gensekvensene var til stede. Det var de for alle prøvene. Sekvensene ble brukt i BLAST fra National Center for Biotechnology Information for å søke i databasen etter liknende sekvenser. For alle sekvensene, samt deres produkt og BLAST-søk, se vedlegg 4. Sekvensen fra CF102 *epsD*-negativ tilsatt reverse primer ble ikke brukt videre da sekvenseringen ikke hadde fungert.

Sekvensen til CF102 *epsD*-negativ var liknet på andre sekvenser fra *L.lactis* subsp. *lactis* ved undersøkelse med BLAST. Sekvensen fra CF102 *epsD*-negativ ble sammenliknet med tidligere sekvensert CF102 *epsD*-positiv gjort av Cyril Franzen (kalt referansestamme) (5). Resultatet er vist i figur 15.

```
CF102+ 19169 TGACNATTGCCACAAAAGGGATTCCAATTGCTCAGTCAGTTGCTGAGATTCTAGATGTTTC 19110
CF102-      1 TGA CTATTGCCACAAAAGGGATTCCAATTGCTCAGTCAGTTGCTGAGATTCTAGATGTTTC 60

CF102+ 19109 CTTTCGTAATTGTTTCGTCGTGACCCTAAAGTGACCGAAGGAGCAACGCTCAATGTAAATT 19050
CF102-      61 CTTTCGTAATTGTTTCGTCGTGACCCTAAAGTGACCGAAGGAGCAACGCTCAATGTAAATT 120

CF102+ 19049 ATATGTCAGTTCAAGCTCTCGTGTGAAAATATGACTTTATCCAAACGGAGTCTTTCAA 18990
CF102-     121 ATATGTCAGTTCAAGCTCTCGTGTGAAAATATGACTTTATCCAAACGGAGTCTTTCAA 180

CF102+ 18989 TTGGTCAAAATGTTTTGATCGTTGATGACTTCATGAAAGGCGCAGGAACAATCAATGGAA 18930
CF102-     181 TTGGTCAAAATGTTTTGATCGTTGATGACTTCATGAAAGGCGCAGGAACAATCAATGGAA 240

CF102+ 18929 TGAGAAGTCTTGCCATGAATTTGATTGTTTACTTGCCGGTGTGCGCTCTTTCTTGAGG 18870
CF102-     241 TGAGAAGTCTTGCCATGAATTTGATTGTTTACTTGCCGGTGTGCGCTCTTTCTTGAGG 300

CF102+ 18869 GACCTTTTAAAGGAGAACGATTGATTGATGATTACAAATCAATCTTGAAAGTTGATCGAA 18810
CF102-     301 GACCTTTTAAAGGAGAACGATTGATTGATGATTACAAATCAATCTTGAAAGTTGATCGAA 360

CF102+ 18809 TTGATATTGCTAACCGCTCAATTGATGTTCAATTGGGAAATATATTTAATGACA 18756
CF102-     361 TTGATATTGCTAACCGCTCAATTGATGTTCAATTGGGAAATATATTTAATGACA 414
```

**Figur 15.** Sammenlikning av tidligere sekvensert *epsD* positiv CF102 (kalt referansestamme (CF102+)) og CF102 *epsD*-negativ (CF102-). Stammene har blitt sekvensert på *purR*.

Som vist i figur 15 hadde referansestammen en «T», mens CF102 *epsD*-negativ hadde en «C» på base 206, men ellers var sekvensene like. Sekvensene ble sammenliknet i programmet ExPASy for å se om denne baseforskjellen førte til en endring i aminosyrerekkefølgen eller innføring av stoppkodon. Det gjorde det ikke. «N» for CF102 *epD*-negativ på base 5 ble korrigert til «T» som i referansestammen i BioEdit.

For filtrat C, E, F og G så var produktene av alle sekvensene head protease ved undersøkelse med BLAST, og sekvensene til alle filtratene liknet på andre sekvenser til *Lactococcus fageri*. Sekvensene av filtratene ble sammenliknet med hverandre for å se om det var en forskjell mellom de. Filtrat E var annerledes enn de tre andre filtratene på en base. Sekvensene til filtrat C, F og G var helt like. Sekvensene fra filtrat C, F, G (samlet) og E ble sammenliknet med allerede sekvenserte 936 fag. Disse fagene har tidligere blitt isolert fra brukssyreprøver hos ulike TINE meierier produsert med samme syrekultur som filtratene stammer fra. Dette har blitt gjort av Cyril Frantzen (9). Resultater er vist i figur 16.

φ844	-----CTTA	4
C,G,F	TTTGGACGGTTCTAAGTCGTTCCAAGGCATTGGTTCAGAAGTTGGTGTAGAGAATCTTA	60
E	TTTNGACGGTTTNTAGTCGTTCCAAGGCATTGGTTCAGAAGTTGGTGTAGAGAATCTTA	60
φ844	ACGGTATTGTCTTGACACCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTGCTGT	64
C,G,F	ACGGTATTGTCTTGACACCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTGCTGT	120
E	ACGGTATTGTCTTGACACCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTGCTGT	120
φ844	ATGAACACGGAGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGGGGACGCAAAAGTTTATTATGACTTAG	124
C,G,F	ATGAACACGGAGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGGGGACGCAAAAGTTTATTATGACTTAG	180
E	ATGAACACGGAGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGGGGACGCAAAAGTTTATTATGACTTAG	180
φ844	CTTCTAATAAATACCTGACTGACTTTACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGG	184
C,G,F	CTTCTAATAAATACCTGACTGACTTTACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGG	240
E	CTTCTAATAAATACCTGACTGACTTTACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGG	240
φ844	CTGTGGAAAATGGAGCGTTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTT	244
C,F,G	CTGTGGAAAATGGAGCGTTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTT	300
E	CTGTGGAAAATGGAGCGTTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTT	200
φ844	TTGATGATAATGACGCTCTAGTTGTAATAAAGCAAGTTTAAAGAGATTCTCTTGTTT	304
C,F,G	TTGATGATAATGACGCTCTAGTTGTAATAAAGCAAGTTTAAAGAGATTCTCTTGTTT	360
E	TTGATGATAATGACGCTCTAGTTGTAATAAAGCAAGTTTAAAGAGATTCTCTTGTTT	360
φ844	CAGTACCAGCAGACCCTAACGCAAAATTTATTCAAATGCCTTAGGCGAAGAACTTACAG	364
C,F,G	CAGTACCAGCAGACCCTAACGCAAAATTTATTCAAATGCCTTAGGCGAAGAACTTACAG	420
E	CAGTACCAGCAGACCCTAACGCAAAATTTATTCAAATGCCTTAGGCGAAGAACTTACAG	420
φ844	AAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGTAACGCTTTGAAAGAAAATTGAGGA	416
C,F,G	AAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGTAACGCTTTGAAAGAAAATTGAGGA	471
E	AAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGTAACGCTTTGAAAAAAATTGAGGA	471

**Figur 16.** Sammenlikning av sekvenser fra filtrat C, F, G sekvensert på 936 fager (produkt; head protease) med sekvenser fra φ844, og sammenlikning av sekvenser fra filtrat E sekvensert på 936 fager (produkt; head protease) med sekvenser fra φ844.

Som vist i figur 16 så var sekvensene til φ844 og filtrat E like. Filtrat C, F, og G hadde en base forskjellig på base 279 hvor filtrat C, F og C hadde en «C» i motsetning til «A» hos φ844 og filtrat E. Ved undersøkelse i exPASy førte den ene baseforskjellen mellom filtrat C, F og G og φ844 til en aminosyreendring.

## 4. Diskusjon

### 4.1. Kultivering av *epsD*-positive stammer

Alle stammene var *epsD*-positive før kultiveringen startet, og dette var som forventet da stammene ble valgt ut basert på deres tilstedeværelse av *epsD*. Frantzen et al. viste at kun to av 97 *L.lactis* stammer fra kommersielle DL-kulturer var *epsD*-negative (5). Likevel var kun 9 av de 30 tidligere publiserte genomsekvensene av *L.lactis epsD*-positive. Disse genomsekvensene ble hentet fra National Center of Biotechnology Information (NCBI). Dette kan muligens skyldes at stammene allerede hadde mistet *epsD* spontant før de ble undersøkt for tilstedeværelsen av *epsD*, da dette kan skje relativt fort. I denne undersøkelsen mistet CF108 *epsD* (og dermed også produksjon av EPS) etter tre overføringer, GA-39 og CF120 mistet *epsD* etter fem overføringer, CF132 og CF109 mistet *epsD* etter seks overføringer, CF103 mistet *epsD* etter ni overføringer og CF102 mistet *epsD* etter tolv overføringer. Det kan tenkes at stammene mistet *epsD* hurtigere enn hva som ble registrert, da det ikke ble undersøkt for hver kultivering. Resten av stammene mistet ikke *epsD*, selv etter sytten kultiveringer. Dette viser at det er stor forskjell mellom hvor fort stammene spontant mister *epsD*. De resterende stammene som ikke mistet *epsD* etter sytten kultiveringer, viste at de var *epsD*-negative ved PCR av kulturene, men ved PCR av kolonier fra de samme «*epsD*-negative» kulturene så var alle disse *epsD*-positive. Årsaken til dette kan være at det er mange flere celler (og DNA) i en koloni enn i 1 µl kultur, slik at det ikke var nok DNA i kulturen til at *epsD* kunne detekteres ved hjelp av PCR. Dette er sannsynlig ettersom de fleste koloniene var *epsD*-positive. Det kan dermed se ut til at det var en svakhet ved PCR-metoden som ble brukt.

Årsaken til at det er så stor forskjell i hvor fort, og eventuelt om de ulike stammene mister EPS (*epsD*) spontant er ikke kjent. Frantzen et al. viste at i de 97 undersøkte stammene fra DL-kulturer så ble det påvist 52 ulike *epsD*-sekvenser, og den store diversiteten i *epsD* sekvensene kan gjenspeile at stammene har blitt utsatt for forskjellige miljømessige utfordringer (5). Dette kan muligens være fagangrep. Hvis en stamme er sensitiv for mange fager så vil den muligens miste EPS senere enn stammer som ikke er sensitive for mange fager. Dette er så lenge EPS kan ha en beskyttende virkning mot fag. Det ser ikke ut til at det er noen sammenheng mellom fagsensitivitet og hvor fort de mistet *epsD* spontant i denne studien. Videre så kreves det mye energi for stammene å beholde EPS da noen bakterier investerer mer enn 70 % av deres energi i produksjonen av EPS (37). Om de ulike stammene bruker ulik mengde energi for å produsere EPS, så kan dette også muligens påvirke hvor fort de mister *epsD* spontant i miljøer hvor det ikke er fager til stede og hvor de ikke trenger EPS for å beskytte seg. Dette kan også eventuelt

forklare hvorfor noen *epsD*-negative stammer generelt vokste fortere enn de *epsD*-positive stammene. Videre så kan *eps* operoner hos *Lactococcus* befinne seg på et plasmid eller på kromosomet (22, 23). Når det gjelder plasmidprofil kunne en ikke se noen forskjell i båndene mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ for CF109, CF132 og CF20. Dette kan muligens tyde på at operonet befinner seg på kromosomet hos disse stammene. Når det gjelder CF108, CF102 og CF103 så det ut til at *epsD*-positiv hadde et bånd ekstra enn *epsD*-negativ. Dette kan tyde på at operonet hos disse stammene har vært lokalisert på et plasmid, som har blitt mistet ved gjentatte kultiveringer. De tre førstnevnte stammene mistet *epsD* etter 5-6 overføringer, men CF108 mistet *epsD* etter kun tre overføringer. Her kan det se ut til at operonet lokalisert på kromosomet var mer stabilt enn operon på plasmid, men dette kan også skyldes at første PCR ble gjort etter 5-6 overføringer for de tre førstnevnte stammene slik at de egentlig kan ha mistet *epsD* tidligere enn etter seks overføringer. I tillegg måtte det relativt mange overføringer til for at CF102 og CF103 mistet *epsD*, selv om det antakeligvis var lokalisert på et plasmid. Det ser dermed ikke ut til at lokaliseringen av operonet har noe å si for hvor fort stammene mister *epsD* spontant. Det finnes ikke vist at operoner lokalisert på kromosomet er mer stabile ved gjentatte kultiveringer enn operoner lokalisert på plasmidet (22). Det var stor forskjell i plasmidprofil mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ fra GA-39. Årsaken til dette er ukjent, men det kan muligens skyldes en kontaminering da *epsD*-negativ hadde mange bånd i forhold til *epsD*-positiv. GA-39 *epsD*-negativ hadde bånd for både *purR* og *cwps*, så dette var en *Lactococcus*, men muligens en annen stamme.

Det ser også ut til at det ikke er noen forskjell i hvor fort/om de mister *epsD* med tanke på om stammene tilhører subsp. *lactis* eller subsp. *cremoris* da stammer fra begge subspecies mistet *epsD*, og det var ingen merkbar forskjell i hvor fort de mistet *epsD*. Etter renstrykingen av de *epsD*-positive kulturene så ble også disse forsøkt kultivert for at de skulle miste *epsD*, men her mistet ingen av stammene *epsD*. Årsaken til dette er ukjent, men det kan muligens ha noe med at kulturene ble renstrøket for andre gang da de utleverte kulturene var fra allerede renstrøkede kulturer. Det at de «nye» *epsD*-positive kulturene ikke mistet *epsD* skyldes ikke en kontaminering av andre bakterier i de «gamle» *epsD*-positive kulturene da det kun er *Lactococcus* som har *epsD*, og i tillegg viste plakkingen likt resultat for de «nye» *epsD* positive-kulturene og for de «gamle» *epsD*-positive kulturene.

## 4.2. Undersøkelse av fagsensitivitet ved hjelp av plaque assay

Undersøkelsene viser at det er stor forskjell i sensitivitet til fager mellom ulike stammer, som igjen av flere faktorer muligens skyldes den ulike *epsD* sekvensen. Resultatene var noe forskjellig fra tidligere plakking gjort med de samme stammene og med samme fagprøver (9). Årsaken til at det var forskjell i sensitivitet for de samme stammene nå, sammenliknet med tidligere resultater er ikke kjent. Når det gjelder GA-39 fikk denne stammen svært svake plakk for brukssyreprøvene fra Nærbø og Voss. Dette tyder på at det var fager i disse prøvene som GA-39 var sensitive for. Likevel fikk GA-39 plakk for disse prøvene kun en gang, og ikke andre ganger hvor det ble plakket med samme prøver under samme forhold. Årsaken til dette er ukjent, men det kan muligens skyldes andre faktorer som det ikke har vært kontroll på. Dette, i tillegg til de ulike båndene mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ ved plasmidprofileringen gjør resultatet fra plakking/vekstmåling for GA-39 noe usikkert. Det kan ikke bekreftes at *epsD* positiv og *epsD* negativ av GA-39 er samme *L.lactis* stamme.

Basert resultatene fra plakking for sensitiv/ikke sensitiv ble det valgt ut noen enkelte fager for å se forskjell i titer mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ for å enklere kunne se en forskjell i sensitivitet mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ. Ved undersøkelse av forskjell i titer var PFU/ml på skålene med CF102-*epsD* positiv høy, bortsett fra for ø815/B3 selv om denne stammen hadde vist seg å være sensitiv for denne fagen tidligere. CF102 var fortsatt resistent mot alle de undersøkte fagene, og uansett fortytning. Liknende resultater ble observert for CF103 da PFU/ml var høyere for *epsD*-positiv enn for *epsD*-negativ for tre av fem undersøkte fager. For de to andre fagene var resultatet omtrent likt mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ, men det var generelt vanskelig å se plakkene på skålene med *epsD*-negativ. Resultatene for CF102 og CF103 stemmer ikke helt med teorien da det tidligere er beskrevet at EPS forstyrrer adsorpsjonen av fag til reseptorer på overflaten til bakteriecellene. Forde et al. viste at et plasmid isolert fra en stamme av *L.lactis* subsp. *cremoris* koder for produksjon av et EPS som forstyrrer adsorpsjon av fager til reseptorer på overflaten til bakteriecellene (14, 23). Deveau et al. har også vist at enkelte stammer med plasmidet som koder for *eps* operonet adsorberer fager dårligere enn samme stamme uten plasmidet (25). Ved vasking av cellene til den førstnevnte stammen slik at EPS ble fjernet, så var adsorpsjonseffektiviteten for stammen med plasmidet den samme som for stammen uten plasmidet. I motsetning til dette ser det ut til at for CF102 og CF103 gir fravær av EPS mindre sensitivitet til fager/resistens. For CF103 ga mangel på *epsD* et lavere titer for noen av fagene enn *epsD*-positiv. Etersom CF102 *epsD*-negativ ble helt resistent til alle fager ble den *purR* sekvensert, og *purR*-sekvensen viste seg å være lik en

tidligere sekvensert *epsD*-positiv CF102, med unntak av en base. Om dette hadde vært en kontaminering hadde en forventet flere forskjellige baser i sekvensen enn kun en (33). Baseforskjellen kan muligens skyldes en feil under PCR-reaksjonen da TaqPolymerase har en viss feilrate (38). CF102 ble *purR* sekvensert ettersom *epsD* genet som varierer enda mer blant stammer, var borte (5). Likevel så førte ikke baseforskjellen til en aminosyreendring eller innføring av stoppkodon. Dermed er det svært lite sannsynlig at baseforskjellen har noen konsekvens for bakteriofagsensitiviteten.

Den nedsatte sensitiviteten til CF103 *epsD*-negativ og resistensen til CF102-*epsD* negativ kan muligens skyldes at andre gener i tillegg til *epsD* har blitt mistet under kultiveringen. Et eksempel på dette er genet som koder for cellevegg polysakkarider. Chapot-Chartier et al. viste at mutanter av en *L.lactis* stamme med en mutasjon i et gen involvert i syntesen av cwps slik at de ikke syntetiserte cwps, ble resistent mot noen bakteriofager tilhørende 936-gruppen (32, 39). Resistensen stammene fikk uten cwps-syntese indikerer at noen fager tilhørende gruppen 936 og P335 bruker cwps som en reseptor (17). Likevel så var cwps til stede i begge de *epsD*-negative stammene som gjør dette mindre sannsynlig. For CF109 så var det ingen forskjell i sensitivitet, så for denne stammen ser det ut til at tilstedeværelse av EPS ikke har så mye å si for beskyttelse mot fager. Noen fager har utviklet seg til å gjenkjenne EPS, og eventuelt også degradere disse polysakkaridene (40). Enzymer som degraderer polysakkarider kan deles inn i to grupper som er hydrolaser og lyaser. Disse enzymene kan bli funnet enten bundet til fagstrukturen eller som frie enzymer fra lyserte bakterieceller. EPS til CF109 kan muligens blitt degradert slik at den ikke har gitt beskyttelse mot fager. I tillegg viste ikke CF109 *epsD* negativ sensitivitet for både  $\phi$ 833/C9,  $\phi$ 805-N og  $\phi$ 877/G5 ved den første plakkingen (sensitiv/ikke sensitiv), mens ved undersøkelse av titer var den sensitiv for alle de tre fagene. Årsaken til dette er ikke kjent, men det tyder på at sensitiviteten til ulike fager kan variere. Når det gjelder CF108 og CF132 var resultatene i samsvar med teorien da de *epsD*-negative stammene generelt var mer sensitive mot fager enn *epsD*-positive. Her ser det ut til at produksjon av EPS har hatt en effekt når det gjelder beskyttelse av bakteriofager, og Forde et al. konkluderte med at et gitt plasmid som kodet for produksjonen av et hydrofilt eksopolysakkarid maskerte reseptorene på celleoverflaten og dermed førte til en betydelig reduksjon i adsorpsjonen av fager (23).

### 4.3.Fager i syrekultur

Tilstedeværelsen av fager som angriper *epsD*-negative stammer ble undersøkt ettersom omtrent alle stammer i kommersielle syrekulturer er *epsD*-positive (5). Likevel så hadde fager i syrekulturen effekt på både *epsD*-positive og *epsD*-negative stammer, selv om den ble anrikt på *epsD*-negative stammer. PCR viste at 936 fager var til stede i filtrat C, E, F og G fra syrekulturene som ble anrikt på henholdsvis stamme CF103, CF108, CF109 og CF132 (*epsD*-negative). Ut i fra vekstmålingene var det forventet å finne fager i disse filtratene da de hemmet veksten til CF108 og CF109, både *epsD* positiv og *epsD* negativ. Det ble vist at sekvensen til filtrat E var lik en tidligere sekvensert  $\phi$ 844, som er et 936 fag. Andre tidligere sekvenserte 936 fag viste større forskjeller. Det kan dermed se ut til at faget i filtrat E var et  $\phi$ 844 fag. Det er tidligere antatt at fagene i brukkssyretankene stort sett kommer fra omgivelsene, og ikke fra råmelken eller syrekulturene (7). Det ser dermed ut til at dette ikke stemmer helt da det ble funnet et  $\phi$ 844 fag i en kommersiell syrekultur. Denne fagen har tidligere blitt isolert fra brukkssyretanken av Cyril Frantzen hos ulike TINE meierier (9). CF108 som filtrat E ble anrikt på, var også sensitiv for  $\phi$ 844 under plakkingen med isolerte fager, men det var ikke CF109 selv om denne stammen (*epsD*-negativ) var sensitiv for denne fagen fra filtrat E under vekstmålingene. Årsaken til dette er ikke kjent, men antall fag i fagprøven kan muligens vært for lavt til å gi plakk på CF109, men ikke på CF108. Videre så kan funn av fager i kommersielle syrekulturer ha en stor betydning for fermenteringsproblemene som oppstår under ystingen, og dette er noe som produsentene av kommersielle starterkulturer bør ta tak i da det er problematisk at fager er til stede allerede i syrekulturene. Filtrat C, F og G hadde en base midt i sekvensen ulik til  $\phi$ 844, og denne baseforskjellen førte til en aminosyreendring. Om det hadde vært et annet fag til stede enn  $\phi$ 844 hadde en som nevnt ovenfor (for CF102) forventet flere forskjeller i sekvensene enn kun ett nukleotid (33). Det kan dermed ut til at fagene i filtrat C, F og G også var  $\phi$ 844 fag.

Det ble også funnet bånd for fag P335 i filtrat C. P335 kan muligens ha vært en del av bakteriokromosomet som et profag hos CF103, og ved lysis av cellene kan P335 DNA kommet ut i kulturen. Dette kan ha skjedd ved hjelp av fag 936 da denne også var til stede i filtrat C. Det ble ikke gjort en PCR av kulturen til CF103, men det burde blitt gjort for å undersøke om denne stammen bærer P335 som et profag. Det er usikkert om c2 fag var til stede i filtratene da det var vanskelig å lese av størrelsen på båndene. Her burde PCR-prøvene blitt applisert på en ny gel med høyere agaroseprosent for å separere båndene bedre. Likevel så er det mulig at c2 fag var til stede i filtrat A, B og D ettersom disse filtratene ikke fikk bånd for P335 og 936, men



filtratene hadde en hemmende effekt på veksten til CF109. Det kan også skyldes tilstedeværelse av andre mindre forekommende lactococcus-spesifikke fag. I tillegg så var det filtrat fra flere av stammene (GA-39, CF102, CF120 og CF132) som ikke hadde en effekt på veksten til sin egen stamme som de ble anriktet på, men på veksten til noen av de andre stammene. Årsaken til dette er ukjent, da det var forventet at de i tillegg til andre stammer også skulle hatt effekt på stammene de ble anriktet på. Det var i utgangspunktet ikke forventet å finne fag i syrekulturene da det som nevnt tidligere ikke har blitt funnet DNA fra fag 936 og c2 i syrekulturer (7). Det har blitt funnet DNA fra fag P335, men disse har vært som profag. Årsaken til at det ikke har blitt funnet 936 og c2 fager i kommersielle syrekulturer kan være fordi det muligens har blitt gjort PCR fra syrekulturene uten å anrike de på vertsstammer. Det kan dermed se ut til at det er fager til stede i syrekulturene, men at antallet er for lavt til å oppdages med PCR. Ved anrikning av syrekulturene på ulike stammer kommer fagene opp i et høyt nok antall til at det er mulig å se båndene på gel ved hjelp av PCR.

Om en sammenlikner vekstmålingene med plakkingen med alle filtratene, så ser det ut til at sensitiviteten for fagene i filtratene var vanskeligere å se ved plakking da CF108 (både *epsD* positiv og *epsD* negativ) kun ga plakk ved stempling med filtrat C og E, men ikke med filtrat D, F og G. Årsaken til dette er ukjent, men det kan hende det var nok fager i filtratene til at det syntes på vekstmålingene, men ikke nok fager til at det ga plakk som kunne sees. Dette kan stemme for CF108 da ufortynnet filtrat C og E ga så godt som ingen vekst under vekstmålingene ved tilsetning til stammene, men også plakk som kunne observeres, selv med fortynnet filtrat. I motsetning til dette så vokste stammene godt ved tilsetning av filtrat D, F og G før OD gikk noe ned og flatet ut. Dette kan igjen ha vært nok vekst til at plakk ikke kunne observeres for disse filtratene. Når det gjelder CF109 ser det ikke ut til at det er noe tydelig mønster mellom plakk og veksthemming da den kun ga plakk ved stempling av filtrat C, E og G, men ikke resten av filtratene selv om de påvirket veksten i like stor grad. Ved plakking med fagprøver for å kunne se forskjell i titer mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ stamme var CF108 *epsD*-positiv mindre sensitiv enn CF108-*epsD* negativ. Dette stemmer ikke helt med hva som ble observert ved plakking med filtratene da CF108 *epsD*-positiv var mindre sensitiv for filtrat C enn *epsD*-negativ. Når det gjelder CF109 så var sensitiviteten lik mellom *epsD*-positiv og *epsD*-negativ med plakking med filtratene, og dette stemmer med tidligere resultater. Videre så var det overraskende at CF132 *epsD*-positiv og *epsD*-negativ fikk plakk fra filtratene da de ikke viste sensitivitet for noen av filtratene under vekstmålingene bortsett fra i brønn med  $10^{-8}$  fortykning med *epsD*-positiv stamme (og filtrat G). Der ser det ut til at det var noe lysis av cellene. Ved

plakking med filtratene så fikk *epsD*-positiv plakk for filtrat F og G (begge fortyninger), og *epsD*-negativ fikk også plakk for filtrat F og G, men kun på fortyning  $10^{-1}$ . Her var *epsD*-negativ mindre sensitiv, men dette stemmer ikke med tidligere plakking. Årsaken til at denne stammen viste sensitivitet for plakking med filtratene, veldig lite på vekstmålingene er ikke kjent. Inkuberingstemperaturen til skålene ser også ut til å være av betydning for om det kan observeres plakk eller ikke på skålene. Ved inkubering ved 30°C så ble det ikke observert plakk, men ved inkubering ved 22°C ble det observert plakk. Dette kan muligens skyldes at veksten på skålene blir for høy ved inkubering ved 30°C slik at det blir overvekst, og spesielt hvis det ikke er nok fager i filtratene at de kan gi tydelige plakk. Årsaken til dette kan være at *L.lactis* er en mesofil bakterie, og mesofile bakterier har en optimumstemperatur på 30-40° (2, 3). Ved undersøkelse av vekst ved tilsetning av filtrat ble det observert flere ganger at det omtrent ikke var noe vekst i brønnene før etter en lang periode hvor veksten plutselig økte. Dette skjedde blant annet for CF109 *epsD*-negativ ved tilsetning av filtrat F og G. Tilstedeværelsen av fager i filtratene har ført til at det ikke har blitt noe vekst før etter en lang tid, men veksten på slutten kan muligens skyldes resistente stammer. Disse stammene er eventuelt i mindretall og bruker lang tid på å vokse opp.

Avslutningsvis ser det ut til at effekten av EPS når det gjelder fagfølsomhet varierer mellom de ulike stammene, men også mellom *epsD*-negativ stamme og *epsD*-positiv morstamme. Den ulike effekten av EPS kan muligens skyldes ulik *epsD*-sekvens mellom stammene, og eventuelt produksjon av ulik EPS (5). Det ser også ut til at EPS både kan beskytte mot bakteriofager, men også fungere som en reseptor. CF102 ble resistant til fager ved tap av EPS, og for denne stammen kan EPS muligens ha fungert som en reseptor for fager. For fremtidig forskning kunne det vært interessant med helgenomsekvensering av denne *epsD*-negative stammen for å se om andre gener har blitt mistet/endret som også kan ha vært en årsak til endret fagfølsomhet. Et interessant tiltak i meieriene kan være gjentatte kultiveringer av stammer som blir resistente til fager ved tap av EPS, for å så bruke disse stammene i syrekulturer. ø844 fag ble detektert i en kommersiell syrekultur, og denne fagen har også tidligere blitt isolert fra brukssyren hos ulike TINE meierier (9). Dette kan ha stor betydning når det gjelder fagproblemer i meieriene.

## 5. Referanser

1. Frantzen CA. 2017. The microbial diversity of mesophilic starter cultures used in cheese production. Doktoravhandling. Ås, NMBU.
2. Adams MR, Moss MO, McClure, P. 2016. Food Microbiology, 4 ed. Royal Society of Chemistry, UK.
3. Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2006. Dairy Science and Technology, 2 ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
4. El Soda M, Madkor, SA, Tong, PS. 2000. Adjunct Cultures: Recent Developments and Potential Significance to the Cheese Industry. Journal of Dairy Science 83:609-619.
5. Frantzen CA, Kleppen, HP, Holo H. 2017. Diversity of *Lactococcus lactis* in undefined mixed dairy starter cultures revealed by comparative genome analysis and targeted amplicon sequencing of *epsD*. Applied and environmental microbiology.
6. Kleppen HP. 2012. Studies on bacteriophages infecting lactic acid bacteria of industrial food fermentations. Doktoravhandling. Ås, NMBU.
7. Kleppen HP, Bang T, Nes IF, Holo H. 2011. Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. International Dairy Journal 21:592-600.
8. Ayad E, Verheul A, Wouters JTM, Smit G. 2001. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. International Dairy Journal 11:51-61.
9. Frantzen CA, Kleppen HP, Holo H. 2016. Use of M17 and a milk-based medium enables isolation of two distinct and diverse populations of *Lactococcus lactis* strains from undefined mesophilic starter cultures. International Dairy Journal 53:45-50.
10. Ackermann HW. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Research in Microbiology 154:245-251.
11. Oliveira J, Mahony J, Hanemaaijer L, Kouwen TRHM, van Sinderen D. 2018. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. American Dairy Science Association 101:96-105.
12. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R, Harrison SC. 2013. Molecular biology of the gene, 7 ed. Pearson, New York.

13. Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA. 2015. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 13:641-650.
14. Forde A, Daly C, Fitzgerald GF. 1999. Identification of Four Phage Resistance Plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Applied and environmental microbiology* 65:1540-1547.
15. Mahony J, van Sinderen D. 2014. Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology* 5:1-7.
16. Deveau H, Labrie SJ, Chopin M-C, Moineau S. 2006. Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages. *Applied and environmental microbiology* 72:4338-4346.
17. Oliveira J. 2017. Biodiversity of lactococcal bacteriophages and associated phage-host interactions. Doktoravhandling. University College Cork, Cork.
18. Garneau J, Moineau S. 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories* 10:1-10.
19. van Kranenburg R, Marugg JD, van Swam II, Willem NJ, Willem MV. 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* 24:387-397.
20. Suzuki C, Kobayashi M, Kimoto-Nira H. 2013. Novel Exopolysaccharides Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and the Diversity of *epsE* Genes in the Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Clusters *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 77:2013-2018.
21. Vuyst D, Degeest B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23:153-177.
22. Dabour N, LaPointe G. 2005. Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and environmental microbiology* 71:7414-7425.
23. Forde A, Fitzgerald GF. 1999. Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *International Dairy Journal* 9:465-472.
24. Forde A, Fitzgerald GF. 2003. Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid* 49:130-142.

25. Deveau H, Van Calsteren M-R, Moineau S. 2002. Effect of Exopolysaccharides on Phage-Host Interactions in *Lactococcus lactis*. Applied and environmental microbiology 68:4364-469.
26. van Kranenburg R, Vos HR, van Swam II, Kleerebezem M, de Vos WM. 1999. Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from *Lactococcus lactis* and Other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression and Diversity. Journal of Bacteriology 181:6347-6353.
27. Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Melarme K, Weissenbach J, Ehrlich D, Sorokin A. 2001. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Research 11:731-753.
28. Ainsworth S, Zomer A, de Jager V, Bottacini F, van Hijum SAFT, Mahony J, van Sinderen D. 2013. Complete Genome of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC509,9, Host for a Model Lactococcal P335 Bacteriophage. Genome Announcements 1:e00119-12.
29. Omega bio-tek. 2013. E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol [http://2015.igem.org/wiki/images/1/18/NUDT\\_CHIAN-Protocol.pdf](http://2015.igem.org/wiki/images/1/18/NUDT_CHIAN-Protocol.pdf). Accessed 11.04.2018.
30. Inc. NEB. PCR Protocol for OneTaq DNA Polymerase (M0480). <https://www.neb.com/protocols/2012/10/11/onetaqdnapolymerasem0480>. Accessed 11.04.2018
31. Labrie S, Moineau S. 2000. Multiplex PCR for Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages. Applied and environmental microbiology 66:987-994.
32. Mahony J, Kot W, Murphy J, Ainsworth S, Neve H, Hansen LH, Heller KJ, Sørensen SJ, Hammer K, Cambillau C, Vogensen FK, van Sinderen D. 2013. Investigation of the Relationship between Lactococcal Host Cell Wall Polysaccharide Genotype and 936 Phage Receptor Binding Protein Phylogeny. Applied and environmental microbiology 79:4385-4392.
33. Frantzen CA. 2018. Muntlig meddelelse. NMBU, Ås.
34. Lee P, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Journal of Visualized Experiments 62:e3923.
35. Macherey-Nagel. 2017. PCR clean-up Gel extraction. [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM\\_PCRcleanup\\_Gelex\\_NSgelPCR.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSgelPCR.pdf). Accessed 25.04.2018.

36. Biotech G. Sanger sequencing. <https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/sanger-sequencing.html>. Accessed 25.04.2018.
37. Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E, Abee T, Hugenholtz J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. International Journal of Food Microbiology 64:71-80.
38. McInerney P, Adams P, Hadi MZ. 2014. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. Molecular Biology International 2014.
39. Chapot-Chartier M-P, Vinogradov E, Sadovskaya I, Andre G, Mistou MY, Trieu-Cuot P, Furlan S, Bidnenko E, Courtin P, Pechoux C, Hols P, Dufrene YF, Kulakauskas S. 2010. Cell Surface of *Lactococcus lactis* Is Covered by a Protective Polysaccharide Pellicle. The journal of biological chemistry 285:10464-10471.
40. Labrie S, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. Nature Reviews Microbiology 8:317-327.

## 6.Vedlegg

Vedlegg 1. *EpsD*-positive stammer og deres sensitivitet for ulike fag/myse/brukssyreprøver (sensitiv +/ikke sensitiv -).

	G A- 39	CF102/ 806	CF103/ 811	CF120/ 856	CF108/ 821	CF109/ 822	CF132/ 890	CF116/ 844	219/6 A47	218/6 A41	127/ 880	CF101/ 801	CF121/ 857
φ-8-25	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ342/D6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ43-8 Voss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ803/A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ803-J	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ803-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ803-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ805/A5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ805-J	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ805-N	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ805-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ806/A6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ807-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ807-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ812/J350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ812-Voss	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ812-U2/N	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ813/B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ814/137	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ815/B3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ815-J	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ815-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ815-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ816/B4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ816-J	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ817-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ819-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ819-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ820/B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ824/B12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ824-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ824-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ824-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ827/C3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ831/C7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ833/C9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ835/C11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ840/D4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ841/D5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

φ842/D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ844/D8	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
φ849/E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ863/F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ868/F8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ870/F10	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ873/G1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ889/H5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ891/H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ845/D9	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ49-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ49-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ49-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ851/E3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ854/E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ854/N	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ855/E7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ857/E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ858/E10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ859/E11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ860/V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ861/F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ862/F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ863/J	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ863/N	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ863/V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ864/F4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ865/F5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ866/F6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ867/F7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ871/F11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ872/F12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ874/G2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ876/64	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ877/G5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ882/G10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ883/G11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ884/G12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ885/H1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ886/H2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ887/H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ888	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ890/H6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φ892	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ893/H9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ894/H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



φ896/H12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-15	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-21	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-26N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-50-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-54	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-70	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φGA-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-13-N	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-13-V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-14	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φGA-20	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φGA-33	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φGA-34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-40-1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
φGA-40-2	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
φGA-42-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-42-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-43	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φGA-44	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-51	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
φGA-60-V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ801A1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ802	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ804	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ804-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ811	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ814	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ821	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ829	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ830/C6	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
φ832/C8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ834	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ836/C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ838	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ839-J	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

φ847/D11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ852/E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ862/F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ878/G6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ879/G7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ880/G8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
φ895/H11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B.syre 19/7 Nærbø	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
B.syre 2/1/14 Nærbø	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
B.syre 7/8 Voss	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Myse 5/12 Voss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voss 06.30	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Voss 15.00	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

**Vedlegg 2.** EpsD-negative stammer og deres sensitivitet for fag/myse/brukssyreprøver (sensitiv +/ikke sensitiv -).

	IL1403	CF228 /GMA60	UC509,9	GA-39	CF102 /806	CF103 /811	CF120 /856	CF108 /821	CF109 /822	CF132 /890
φ-8-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ342/D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ43-8 Voss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ803/A3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
φ803-J	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ803-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ803-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ805/A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ805-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ805-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ805-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ806/A6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ807-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ807-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ812/J350	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ812-Voss	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ812-U2/N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ813/B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ814/137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ815/B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ815-J	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ815-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

φ815-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ816/B4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ816-J	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ817-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ819-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ819-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ820/B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ824/B12	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
φ824-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ824-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ824-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ827/C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ831/C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ833/C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ835/C11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ840/D4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φ841/D5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ842/D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ844/D8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
φ849/E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ863/F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ868/F8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ870/F10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ873/G1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ889/H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ891/H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ845/D9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ49-J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ49-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ49-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ851/E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ854/E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ854/N	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ855/E7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ857/E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ858/E10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ859/E11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ860/V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ861/F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ862/F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ863/J	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φ863/N	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φ863/V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ864/F4	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φ865/F5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ866/F6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

φ867/F7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ871/F11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ872/F12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ874/G2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ876/64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ877/G5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ882/G10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ883/G11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ884/G12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ885/H1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φ886/H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ887/H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ888	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ890/H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φ892	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ893/H9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ894/H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ896/H12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-21	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φGA-24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-26N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-50-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-13-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-13-V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-14	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-40-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-40-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
φGA-42-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-42-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-43	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φGA-44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

φGA-60-V	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
φGA-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φGA-90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ801A1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ802	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ804	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ804-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ811	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ814	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ821	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ829	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ830/C6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ832/C8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ834	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ836/C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ838	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ839-J	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ847/D11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ852/E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ862/F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ878/G6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ879/G7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φ880/G8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
φ895/H11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>B.syre 19/7 Nærbø</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>B.syre 2/1/14 Nærbø</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>B.syre 7/8 Voss</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Myse 5/12 Voss</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Voss 06.30</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Voss 15.00</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

**Vedlegg 3.** Sensitivitet (+/-) for fag i syrekultur hos ulike stammer (*epsD* positiv og *epsD* negativ). Syrekulturene ble anrikt på *epsD*-negative stammer. Filtrat A = syrekultur anrikt på GA-39, B = CF102/806, C = CF103/811, D = CF120/856, E = CF108/821, F = CF109/822, G = CF132/890. Sensitiviteten ble undersøkt på  $10^{-1}$  og  $10^{-2}$  fortynning av filtratene.

	GA-39		CF102/806		CF103/811		CF120/856		CF108/821		CF109/822		CF132/890	
<i>EpsD</i> +/-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>Filtrat (A-G)/ Fortynnin g</b>														
<b>A</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<b>D</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>F</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<b>G</b>														
$10^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
$10^{-2}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

**Vedlegg 4.** Fasta-sekvenser, hva slags produkt sekvensene koder for og treff med BLAST-søk for sekvenser fra stamme CF102/806 *epsD*-negativ sekvensert med primere for *purR*, og av filtrat C, E, F og G sekvensert med primere for fag 936 for produktet head protease.

#### CF102/806 m/forward primer

>39461959.seq - ID: 96IJ89- on 2018/4/23-2:22:54 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 64  
Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

tgacnATTGCCACAAAAGGgaTTCCAATTGCTCAGTCAGTTGCTGagaTTCTAGATGTTCCCTTTTCGTAATT  
GTTTCGTCGTGACCCTAAAGTGACCGAAGGAGCAACGCTCAATGTAAATTATATGTCAGGTTCAAGC

TCTCGTGTGAAAATATGACTTTATCCAAACGGAGTCTTTCAATTGGTCAAATGTTTTGATCGTTG  
 ACGACTTCATGAAAGGCGCAGGAACAATCAATGGAATGAGAAGTCTTGTCCATGAATTTGATTGTT  
 TACTTGCCGGTGTGCCGCTTTCTTGAGGGACCTTTTAAAGGAGAACGATTGATTGATTACAA  
 ATCAATCTTGAAAGTTGATCGAATTGATATTGCTAACCGCTCAATTGATGTTCAATTGGGAAATATA  
 TTTAATGACACTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCc

Produkt: pur operon repressor

Treff med BLAST:

<a href="#">Lactococcus lactis subsp. lactis strain G423 chromosome, complete genome</a>	761	761	93%	0.0	99%	<a href="#">CP024958.1</a>
<a href="#">Lactococcus lactis subsp. lactis strain F44 chromosome, complete genome</a>	761	761	93%	0.0	99%	<a href="#">CP024954.1</a>

**Filtrat C m/forward primer**

>39450529.seq - ID: 96IJ83- on 2018/4/20-18:52:59 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 12  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

tggtGtagananCTTAaCGGTATTGTCTTGACaCCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTG  
 CTGTATGAACACGgaGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGggnACGCAAAGTTTATTATGACTTAGCTTC  
 TAATAAATACCTGACTGACTttACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGGCTGTGGAAAAT  
 GGAGCGTTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTTTTGATGATAATGACGCTC  
 TAGTTGTAATAAAGCACAGTTTAAAGAGATTTCTCTTGTTCAGTACCAGCAGACCCTAACGCAA  
 AATTTATTCAAATGCCTTAGGCGAAGAACTTACAGAAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGT  
 AACGCTTTGAAaAAaTTGAGGAa

**Filtrat C m/reverse primer**

>39465215.seq - ID: 96IJ85- on 2018/4/23-2:30:40 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 31  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

TnCTTCGCCTAAGGCATTTtGAATAAATTTTGCCTTAGGGTCTGCTGGTACTGAAACAAGAGAAATC  
 TCTTTAAACTGTGCTTTATTTACAACCTAGAGCGTCATTATCATCAAAGTATAATCTGTGATGTAAT  
 AGGCAATTGATAGTGAATCAAACGCTCCATTTCCACAGCCTTATTAATGTTTGGTGCATTGTGCGTA  
 AAGCGTAAAGTCAGTCAGGTATTTATTAGAAGCTAAGTCATAATAAACTTTTGCCTCCCAATGAC  
 TTCCTAGATCCAGCTCCGTGTTTCATACAGCAATGGATATCGTTCTCTATCGAACTCGATAACAATTA  
 GGTGTCAAGACAATACCGTTAAGATTCTCTACACCAACTTCTGAACCAATGCCTTGGAACGACTTg  
 aac

Produkt: head protease

Treff med BLAST:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP1502c, complete genome</a>	680	1329	99%	0.0	95%	<a href="#">MF775705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP1502b, complete genome</a>	680	1329	99%	0.0	95%	<a href="#">MF775704.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP1502a, complete genome</a>	680	1329	99%	0.0	95%	<a href="#">MF775703.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage 16W12L, complete genome</a>	680	1324	99%	0.0	95%	<a href="#">KX379672.1</a>

**Filtrat E m/forward primer**

>39450383.seq - ID: 96IJ82- on 2018/4/20-18:14:5 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 24  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

tnAaCGGTATTGTCTTGACaCCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTGCTGTATGAA  
 CACGGAGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGGGGACGCAAAGTTTATTATGACTTAGCTTCTAATAAA  
 TACCTGACTGACTTTACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGGCTGTGGAAAATGGAGCG  
 TTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTTTTGATGATAATGACGCTCTAGTTGT  
 AAATAAAGCAAAGTTTAAAGAGATTTCTCTTGTTCAGTACCAGCAGACCCTAACGCAAATTTAT  
 TCAAATGCCTTAGGCGAAGAACTTACAGAAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGTAACGCTT  
 TGAAaAAaTTGAGGA

**Filtrat E m/reverse primer**

>39450525.seq - ID: 96IJ81- on 2018/4/20-18:52:59 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 12  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

gTtgcGTTcTTCTGTaGTTCTTCGCCTAaGGCATTtGAATAAAATTTTGCgTTAGGGTCTGCTGGTACTGA  
 AACAAAGAGAAATCTCTTTAAACTTTGCTTTATTTACAACCTAGAGCGTCATTATCATCAAAAAGTATAA  
 TCTGTGATGTAATAGGCAATTGATAGTGAATCAAACGCTCCATTTTCCACAGCCTTATTAATGTTTG  
 GTGCATTGTCGTAAGCGTAAAGTCAGTCAGGTATTTATTAGAAGCTAAGTCATAATAAACTTTTG  
 CGTCCCAATGACTTCACTAGATCCAGCTCCGTGTTTCATACAGCAATGGATATCGTTCTCTATCGAA  
 CTCGATAACAATTAGGTGTCAAGACAATACCGTTAAGATTCTCTACACCAACTTCTGAACCAATGCC  
 TTGGAACGactanAAaccgTCnaaa

Produkt: head protease

Treff med BLAST:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Lactococcus phage 16W12L_complete genome</a>	669	1329	99%	0.0	96%	<a href="#">KX379672.1</a>
<a href="#">Lactococcus phage MW18L_complete genome</a>	669	1329	99%	0.0	96%	<a href="#">KX379673.1</a>
<a href="#">Lactococcus phage LP1502c_complete genome</a>	665	1329	99%	0.0	95%	<a href="#">MF775705.1</a>
<a href="#">Lactococcus phage LP1502b_complete genome</a>	665	1329	99%	0.0	95%	<a href="#">MF775704.1</a>

### Filtrat F m/forward primer

>39453355.seq - ID: 96IJ84- on 2018/4/20-19:0:40 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 23  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

CTTanGGTATTGTCTTGACaCCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTGCTGTATGAA  
 CACGGAGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGGGGACGCAAAAGTTTATTATGACTTAGCTTCTAATAAA  
 TACCTGACTGACTTTACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGGCTGTGGAAAATGGAGCG  
 TTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTTTTGATGATAATGACGCTCTAGTTGT  
 AAATAAAGCACAGTTTAAAGAGATTTCTCTTGTTCAGTACCAGCAGACCCTAACGCAAAATTTAT  
 TCAAAATGCCTTAGGCGAAGAAGTACAGAAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGTAACGCTT  
 TGAAAgAaaTTGAGGAa

### Filtrat F m/reverse primer

>39450691.seq - ID: 96IJ86- on 2018/4/20-18:53:2 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 11  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

TTTGTTgCgTtcTtCTGTaGTTCTTCGCCTAAGGCATTtGAATAAAATTTTGCgTTAGGGTCTGCTGGTAC  
 TGAAACAAGAGAAATCTCTTTAAACTGTGCTTTATTTACAACCTAGAGCGTCATTATCATCAAAAAGT  
 ATAATCTGTGATGTAATAGGCAATTGATAGTGAATCAAACGCTCCATTTTCCACAGCCTTATTAATG  
 TTTGGTGCATTGTCGTAAGCGTAAAGTCAGTCAGGTATTTATTAGAAGCTAAGTCATAATAAACT  
 TTTGCGTCCCAATGACTTCACTAGATCCAGCTCCGTGTTTCATACAGCAATGGATATCGTTCTCTAT  
 CGAACTCGATAACAATTAGGTGTCAAGACAATACCGTTAAGATTCTCTACACCAACTTCTGAACCAA  
 TGCCTTGGAACGACTtagAaCCGTCcAaaaa

Produkt: Head protease

Treff med BLAST:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Lactococcus phage LP1502c_complete genome</a>	693	1363	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775705.1</a>
<a href="#">Lactococcus phage LP1502b_complete genome</a>	693	1363	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775704.1</a>
<a href="#">Lactococcus phage LP1502a_complete genome</a>	693	1363	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775703.1</a>
<a href="#">Lactococcus phage LP9903_complete genome</a>	693	1357	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775685.1</a>

### Filtrat G m/forward primer

>39450459.seq - ID: 96IJ88- on 2018/4/20-18:14:7 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 20  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1



AgnnCTTaaCGGTATTGTCTTGACaCCTAATTGTATCGAGTTCGATAGAGAACGATATCCATTGCTGTA  
 TGAACACGGAGCTGGATCTAGTGAAGTCATTGGGGACGCAAAAGTTTATTATGACTTAGCTTCTAA  
 TAAATACCTGACTGACTTTACGCTTTACGACAATGCACCAAACATTAATAAGGCTGTGGAAAATGG  
 AGCGTTTGATTCACTATCAATTGCCTATTACATCACAGATTATACTTTTGATGATAATGACGCTCTA  
 GTTGTAATAAAGCACAGTTTAAAGAGATTTCTCTTGTTCAGTACCAGCAGACCCTAACGCAAAA  
 TTTATTCAAATGCCTTAGGCGAAGAACTTACAGAAGAACGCAACAAAATTATTGAAAGCCGTAAC  
 GCTTTGAAAnaAaTTGAGGAa

>Filtrat G – m/reverse primer

>39450359.seq - ID: 96IJ87- on 2018/4/20-18:14:5 automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 15  
 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1

gtngcGTTcTtCTGTaGTTCTTCGCCTAAGGCATTTTGAATAAATTTTTCGTTAGGGTCTGCTGGTACTG  
 AAACAAGAGAAAATCTCTTTAAACTGTGCTTTATTTACAACCTAGAGCGTCATTATCATCAAAGTAT  
 AATCTGTGATGTAATAGGCAATTGATAGTGAATCAAACGCTCCATTTCCACAGCCTTATTAATGTT  
 TGGTGCATTGTCGTAAAGCGTAAAGTCAGTCAGGTATTTATTAGAAGCTAAGTCATAATAAACTTT  
 TGCGTCCCAATGACTTCACTAGATCCAGCTCCGTGTTTCATACAGCAATGGATATCGTTCTCTATCG  
 AACTCGATACAATTAGGTGTCAAGACAATACCGTTAAGATTCTCTACACCAACTTCTGAACCAATG  
 CCTTGGAACGACTTtagAACCGTCcAaaa

Produkt: head protease

Treff med BLAST:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP1502c_complete genome</a>	684	1361	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP1502b_complete genome</a>	684	1361	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775704.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP1502a_complete genome</a>	684	1361	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775703.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactococcus phage LP9903_complete genome</a>	684	1355	98%	0.0	96%	<a href="#">MF775685.1</a>



**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway