

NORWEGIAN UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES





## Forord

Arbeidet i denne oppgaven ble utført ved Laboratorium for mikrobiell genteknologi (LMG) ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB).

Jeg ønsker først å takke mine veiledere Professor Dzung Bao Diep og Anbjørg Rangberg for muligheten til å gjennomføre min oppgave ved LMG og for god veiledning gjennom hele oppgaven.

Jeg ønsker å takke Claus Kreibich for god hjelp til innsamling og håndtering av biene og Dr. Daniel Münch for god hjelp til oppsett av bieforsøkene. En takk rettes til Gro Amdam for at jeg fikk få lov til å bruke biene i min oppgave. Takk til Davide Porcellato for at du hadde tålmodighet til å gi meg opplæring i GelCompare.

Ikke minst vil jeg takke alle ansatte ved LMG og Amdam Lab for sosialt samvær og faglige kommentarer, og en spesiell til May-Britt Selvåg Hovet for autoklivering og destruksjon.

Jeg vil tilslutt takke familie og venner som har motivert meg gjennom studiene.

Ås 13. Desember 2013

Birgitte Engelsen Flatval

## Abstract

Honey bees are important pollinators, as they play a critical role in global agriculture. However, during the last decade the population of honey bees has been decreasing worldwide. As the consequences of this trend, different research fields arose trying to explain it.

The honey bees have acquired a distinct gut microbiota, where *Lactobacillus kunkeei*, which have shown to be the dominating bacteria.

In this thesis different *L. kunkeei* strains was added to the bees diet over a set period of time, to observe if the bacteria prolonged the bees life span. Survival analyses were applied to interpret the results, where only 9 different strains were useful. Besides, genome diversity among 47 different *L. kunkeei* strains has also been studied related to their monthly isolation using the rep-PCR. GelCompare allowed us to differentiate among the different *L. kunkeei* strains due to its electrophorese pattern.

Only on of the *L. kunkeei* strains isolated in September showed positive effects on the honey bees life span. Unfortunately the remaining strains, isolated from September, late October and November, showed none or negative effect. Furthermore, dendrogram analysis from rep-PCR result showed nine clusters revealing variation among different *L. kunkeei* strains.

## Sammendrag

Honningbiene er en viktig resurs for verdens landbruk gjennom dens bestøvning, og derfor viktig for verdens matforsyning. Det siste tiåret har det blitt observert en økning i biedød over hele verden, noe som har skapt stor bekymring. Som en følge av dette har mye forskning blitt rettet mot bienes helse.

Honningbiene har en distinkt bakterieflora i magen, hvor melkesyrebakterien *Lactobacillus kunkeei* er en dominerende bakterie. Det er i dette studiet undersøkt om *L. kunkeei* kan ha en effekt på honningbienes levetid. Dette ble utført ved å tilsette ulike bakteriestammer fra *L. kunkeei* til bienes fôr. Tolkningen av observasjonene ble utført ved overlevelsesanalyser, hvor kun 9 av bakteriestammene ble benyttet. Det ble så studert om det foreligger en genetisk variasjon mellom 47 ulike *L. kunkeei* stammer, avhengig av hvilken måned bakteriestammer er isolert i. GelCompare ble benyttet for undersøke om det forelå en variasjon mellom bakteriestammen av elektroforesemønsteret fra rep-PCR,

Resultatet viser at en *L. kunkeei* stamme, isolert fra september, har positiv effekt på bienes levetid. De resterende stammene viste negativ eller ingen effekt på biene. Analysen av rep-PCR dannet et dendrogram som dannet ni ulike grupperinger. Det ble avdekket at det foreligger en variasjon mellom bakteriestammene.

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	1
Abstract .....	2
Sammendrag .....	3
Innholdsfortegnelse .....	4
1. Introduksjon .....	6
1.1 Honningbien, <i>Apis Mellifera</i> .....	6
1.1.1 Biens livssyklus .....	6
1.1.2 Bienes fordøyelsessystem .....	8
1.2 Bienes bakterieflora .....	8
1.2.1 Næring .....	8
1.2.2 Overføring av bakterieflora i en koloni .....	9
1.2.3 Bienes tarmbakterier .....	9
1.3 Melkesyrebakterier .....	10
1.3.1 <i>Lactobacillus kunkeei</i> .....	10
1.4 Variasjon analyse av bakteriestammer .....	12
1.4.1 Repetitive extragenic palindromic – polymerase kjedereaksjon .....	12
1.5 Mål med oppgaven .....	14
2. Materialer og Metoder .....	15
2.1 Bakteriestammer .....	15
2.2 Kultivering og vekst av bakterier .....	15
2.2.1 Vekstmedier og kultivering .....	15
2.2.2 Kultivering og lagring av <i>L. kunkeei</i> og <i>L. plantarum</i> .....	16
2.2.3 Vekstforsøk .....	16
2.2.4 Kolonidannende enheter per ml (CFU/ml) .....	16
2.3 Overlevelsesanalyse av honningbier .....	17
2.3.1 Behandling .....	17
2.3.2 Innsamling og inkubering av bier .....	18
2.3.3 Overlevelsesanalyse av honningbier .....	20
2.4 Genotypiske analyser .....	21
2.4.1 Isolering av genomisk DNA .....	21

2.4.2 Måling av renhet av isolert DNA .....	22
2.4.3 Polymerase kjedereaksjon .....	22
2.4.4 Gel elektroforese og visualisering av isolert DNA og rep-PCR produkt .....	24
2.5 Programvarer .....	25
2.5.1 Statistica, Starsoft .....	25
2.5.2 BioNumerics, Applied Math. ....	25
3. Resultater .....	26
3.1 Pilotforsøk på overleve og optimalisering .....	26
3.1.2 Vekstforsøk .....	30
3.3 Overlevelsanalyse .....	31
3.4. Diversitet analyse av <i>L. kunkeei</i> stammer .....	35
3.4.1 Gel bilde og dedrogram av rep-PCR produkt med (GTG) <sub>5</sub> primer .....	36
3.4.2 Gel bilde og dedrogram av rep-PCR produkt med BOXA1R primer .....	39
4. Diskusjon .....	42
4.1 Effekten av <i>L. kunkeei</i> på honningbienes overlevelse .....	42
4.2 Diversitet analyse .....	45
4.3 Oppsummering og videre arbeid .....	46
Referanser .....	48
Vedlegg 1: Bakteriestammer .....	52
Vedlegg 2: Løsninger .....	53
Vedlegg 3: Kjemikalier, enzymer, primere og kommersielle kit .....	55
Vedlegg 4. Flytskjema .....	57
Vedlegg 5: Resultater .....	58
Vedlegg 6. Protokoll .....	63

## 1. Introduksjon

Den europeiske honningbien *Apis Mellifera* er en viktig ressurs rundt om i verden. Biene har en viktig rolle i bestøvning av mange store globale matråvarer. Produkter som honning og voks har vært viktige i et historisk perspektiv og er fortsatt svært ettertraktede. Derfor er den drastiske nedgangen av arbeidsbier, sett i bie kolonier en stor bekymring for birøktere verden over (vanEngelsdorp & Meixner 2010).

Den drastiske nedgangen i kolonier er kjent som koloni kollaps lidelse (*Coloni collaps disorder*, CCD). Sprøytemidler, andre kjemikalier, dårlig ernæring, påvirkning fra patogene mikroorganismer og virus er noen mulige årsaker til CCD (Evans & Schwarz 2011).

Ved CCD, vil biene forsvinne og kun dronningen og noen få arbeidsbier er igjen i kolonien. Midden *Varroa destructor* har lenge vært kjent for å medføre nedgang i biekolonier, hvor midden kan angripe både yngle og arbeidsbier (Cox-Foster et al. 2007). Dette medfører at biene dør inne i kolonien ved at biene blir infisert av virus som bæres av midden (Genersch 2010). Andre utfordringer biene er utsatt for er infeksjon av andre virus, protozoer, parasitter, patogene bakterier og sopp (Evans & Schwarz 2011). Sesongbaserte faktorer som overvintring er i tillegg en årsak til tap av kolonier, spesielt om biene er infisert av *V. destructor* ettersom dette reduserer bienes proteinlager (Amdam et al. 2004; Dainat et al. 2012). Dette viser at det er vanskelig å identifisere én faktor som forårsaker det globale tapet av kolonier (Genersch 2010).

### 1.1 Honningbien, *Apis Mellifera*

#### 1.1.1 Biens livssyklus

En koloni består av 10,000- 15,000 sterile hunner, arbeidsbier og noen få hanner som kalles droner. Hannens eneste oppgave er å befrukte dronningen, som skjer gjennom hele sesongen, men det legges et betraktelig høyere antall egg om våren.

Eggene fra dronningen legges i cellene i kuben hvor de utvikler seg til larve og puppa før de klekkes ut til unge arbeidsbier. Denne utviklingen tar om lag 21 dager (Seeley 1995).



Arbeidsbiene vil gjennom sin levetid besette ulike roller. De yngste biene, kalt ammebier er ansvarlig for foring og ”oppfostring” av larver. Deretter påtar de seg oppgaver som voks produksjon, mottak og bearbeiding av pollen og nektar, samt vokte kubens innganger før de tilslutt ender som trekkbier (Davis 2004). Biene lever som regel som trekkbier helt til de dør, men er også vist å kunne reverseres (Amdam et al. 2005). Bienes roller er illustrert i figur 1.1.

Levealderen til biene er avhengig av når på året de klekkes ut til unge arbeidsbier. Biene fra sommermånedene lever i gjennomsnitt fire uker, mens arbeidsbier fra høstmånedene overvintrer og lever helt til våren. Optimaltemperaturen i en koloni er 34°C. Når temperaturen synker om vinteren, klynger biene seg tett sammen. Der genererer de varme ved å vibrere vingemuskulaturen. Enkelte av biene vil også dø på grunn av lav temperatur. Vinterbier skiller seg fysiologisk fra sommerbier ved at de har en redusert metabolisme og et reservelager av fett og proteiner. (Davis 2004)

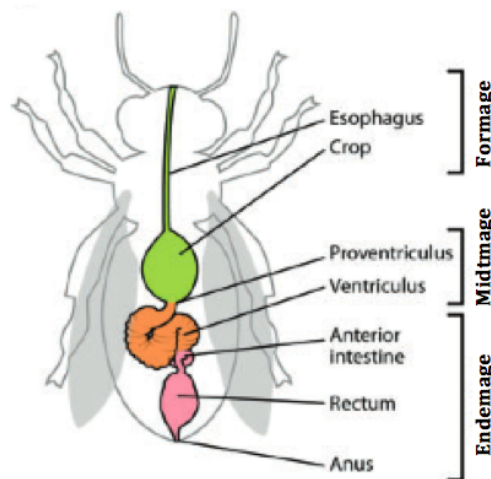


**Figur 1.1.** Denne tegningen illustrerer dronningen og arbeidsbienes roller i bienes livsløp. A er dronningen, B-E er arbeidsbier med ulike oppgaver inne i kuben, og F er trekkbier. Illustrasjonen er modifisert versjon fra (Rangberg et al. 2012)

### 1.1.2 Bienes fordøyelsessystem

Fordøyelseskanalen hos biene kan deles i tre deler; formage, midtmage og endemage (figur 2). Honning magen (crop) fungerer som reservoar for transport av nektar og vann. Denne løsningen holdes her ved hjelp av en kontrollmekanisme, proventriculus, som hindrer at materialet vandrer nedover i tarmen.

Fordøyelsen skjer i midtmagen hvor det med epitelceller skilles ut enzymer som bryter ned proteiner, fett og komplekse sukkerforbindelser. Dette er omringet av en membran, kalt peritrophic som beskytter mot slitasje og fører gjennom nedbrutt materiale til absorpsjon i tynntarmen, hvor avføringen deretter akkumuleres i endemagen (Davis 2004).



Figur 1.2. Komposisjonen av fordøyelsessystemet til en voksen arbeidsbie, oppdelt i formage, midtmage og endemage. Illustrasjonen er en modifisert versjon fra (Rangberg et al. 2012).

## 1.2 Bienes bakterieflora

### 1.2.1 Næring

Nektar er bienes viktigste kilde til næring og består av en konsentrert sukkerløsning, hovedsakelig sukrose, fruktose og glukose. Når trekkbiene returnerer til bikuben, overføres nektaren til arbeidsbiene i kuben. Denne mekanismen kalles *trophallaxis*, der begge bienes tunger berøres og trekkbien gulper opp nektaren til mottakerbienen.

Pollen er for biene en viktig kilde for proteiner, vitaminer, mineraler og lipider. Proteinene blir brutt ned til aminosyrer som er nødvendig for utvikling av de unge biene. (Davis 2004)

### 1.2.2 Overføring av bakterieflora i en koloni

Det er forskjeller mellom bienes bakterieflora i forhold til sammensetning og mengde. Larver og nyklekkede bier har en fraværende bakterieflora motsetning til de eldre arbeidsbiene. Siden biene er sosiale insekter er det påvist en økning av bakteriefloraen i tarmsystemet. Dette skjer gradvis som biene blir eldre, noe som fremkommer enten ved trophallaxis med eldre arbeidsbier eller fra omgivelsene inne i kuben (Martinson et al. 2012). Dette viser at bienes mikrobiota overføres horisontalt, arbeidsbie til arbeidsbie og ikke vertikalt fra dronningen. (Engel & Moran 2013).

### 1.2.3 Bienes tarmbakterier

Det er kjent at bienes bakterieflora i tarmen består av et mikrobielt mangfold, hvor det gjennom kulturavhengige metoder er dokumentert en tilstedeværelse av bakterieslektene *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* og *Cornybacterium* (Gilliam 1997).

Ved bruk av moderne molekylære metoder som 16S rDNA og fylogenetiske analyser har det blitt kartlagt en rekke bakteriearter i honningbiens mage. Flere studier viser at bakteriefloraen fra tarmen til voksne arbeidsbier består av 8 distinkte fylotyper, representert av fem bakterieklasser; Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Firmicutes og Actinobacteria. Disse er høyt konserverte hos honningbien, *A. mellifera* til tross for ulikheter innen geografiske områder, miljø og underarter av *A. mellifera* (Cox-Foster et al. 2007; Engel et al. 2012; Jeyaprakash et al. 2003; Martinson et al. 2012).

Det kan forekomme variasjoner mellom fylotypene, hvor dette kan reflekteres gjennom alder og helse hos biene. Det generelle samsvaret mellom fylotypene kan tyde på at bakteriene har en funksjonell rolle hos honningbiene (Moran et al. 2012), ved at bakteriene kan ha en mulig innvirkning på bienes ernæring og beskyttelse mot trusler fra omgivelsene som patogene bakterier (Engel et al. 2012)

### 1.3 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier ble definert tidlig på 1900-tallet som Gram positive, ikke sporedannende staver eller kokker, og med melkesyre som endeprodukt ved fermentering av karbohydrater (Stiles & Holzapfel 1997). Melkesyrebakteriene er assosiert med ulike habitat som planter, mat og drikkevarer, men er i tillegg naturlig i fordøyelsessystemet hos både mennesker og dyr (Claesson et al. 2007; Makarova et al. 2006). På grunn av deres fermenterende egenskaper har melkesyrebakterier i en årrekke blitt benyttet til konservering av mat og drikke. I dag har melkesyrebakterier en viktig rolle i matproduksjonen ved fermenterte meieriprodukter, kjøtt og grønnsaker (Makarova et al. 2006).

*Lactobacillus* er en velkjent melkesyrebakterie og denne slekten er den største innen familien *Lactobacillaceae* og inngår under fylum *Firmicutes*. De har et lavt innhold av GC og danner melkesyre i sure miljøer, enten under aerotolerente eller anaerobe forhold. De kan være homofermenterende hvor hovedproduktet er melkesyre eller være heterofermenterende hvor endeproduktet i tillegg er etanol og CO<sub>2</sub>. *Lactobacillus* er avhengig av en kompleks næring som består av karbohydrater, aminosyrer, peptider, fettsyrer, salt og vitaminer (Tannock 2004).

*Lactobacillus* går inn under betegnelsen GRAS (*generally-recognized as safe*) som betyr at bakteriene er trygge for både mennesker og dyr ved matinntak (Salminen et al. 1998). Enkelte av disse bakteriene har muligens probiotiske egenskaper i fordøyelsessystemet som kan gi helsemessige fordeler, ved at disse levende organismene hindrer mageinfeksjoner og lidelser (Giraffa et al. 2010). De produserer også antimikrobielle metabolitter som består av organiske komponenter som kan hindre vekst av mikroorganismer. Spesielt bakteriosiner med sine probiotiske egenskaper kan ha potensiale for en ny generasjon av antibiotika (Stoyanova et al. 2012).

#### 1.3.1 *Lactobacillus kunkeei*

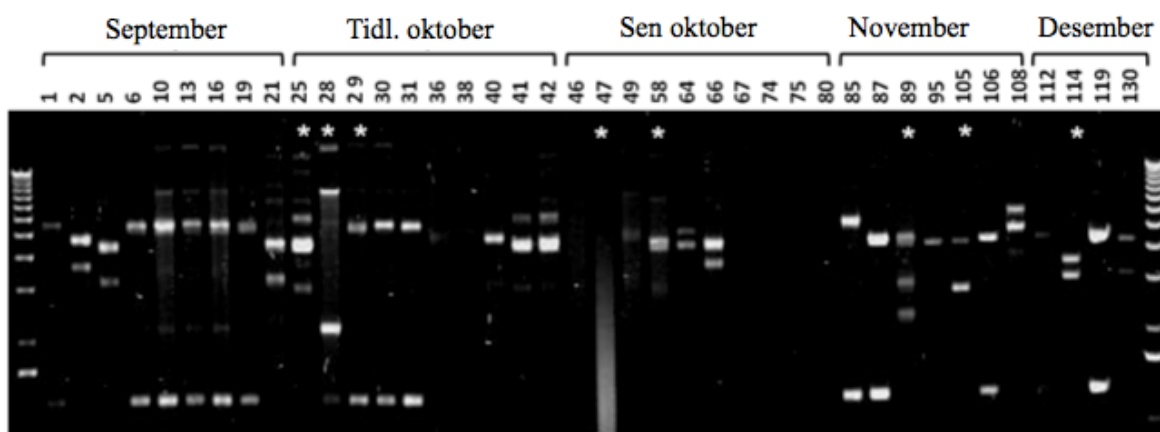
*L. kunkeei* ble for første gang karakterisert og identifisert som en ny art ved fylogenetisk analyse basert sekvensering av 16S rDNA. Isolert fra druejuice ble den antatt å føre til en svakere alkoholfermentering i vin. Den ble karakterisert som Gram positiv, ikke bevegelig, stavformet, fakultativ anaerob og katalase negativ. Den inneholder også et lavt innhold av GC

og produserer melkesyre fra D-fruktose, D-glukose, mannitol, D-raffinose og sukrose (Edwards et al. 1998).

*L. kunkeei* er isolert fra blomster og frukt, som anses som en nisje for fruktofile melkesyrebakterier. Fylogenetiske undersøkelser viser at bakterien har likhet til slekten *Fructobacillus*. *L. kunkeei* ble reklassifisert til obligat fruktofil, ved at de foretrekker D-fruktose som karbonkilde og metaboliserer glukose aerobisk. Dette gjør at den skiller seg fra andre melkesyrebakterier som ikke foretrekker tilstedeværelse av oksygen. Det er også nødvendig med eksterne elektronakseptorer som fruktose og pyruvat for dissimilering av glukose (Endo et al. 2009).

Olofsson og Vazquez (2008) dokumenterte tilstedeværelse av flere melkesyrebakterier fra slektene *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*, i bienes honningmage (Olofsson & Vasquez 2008). Der disse er bestående av 13 bakterielle arter (Vasquez et al. 2009), hvor *Lactobacillus kunkeei* er vist å dominere (Vasquez et al. 2012). Isolert fra tarmen til biene, er *L. kunkeei* dokumentert en være obligat fruktofil, heterofermenterende bakterie (Neveling et al. 2012).

Rangberg et al. (2011) som isolerte bakteriestammene fra *L. kunkeei*, utførte en 16S rDNA analyse på de utvalgte stammene som viste en heterogenitet av bakteriestammene på bakgrunn av plasmidprofilen, vist i figur 1.3. Fermentasjonen av ulike karbohydrater ble utført der hvor *L. kunkeei* viste høy aktivitet ved fruktose og sukrose.



Figur 1.3. Plasmid profil av utvalgte *L. kunkeei* stammer isolert fra månedene september, tidlig oktober, sen oktober, november og desember. Bildet er i modifisert versjon (Rangberg et al. 2012).

## 1.4 Variasjon analyse av bakteriestammer

### 1.4.1 Repetitive extragenic palindromic – polymerase kjedereaksjon.

For å kunne identifisere eller undersøke variasjon mellom stammer for en gitt bakterie, er det hovedsakelig benyttet molekylære teknikker det siste tiåret forhold til fysiologiske og biokjemiske metoder. Molekylære metoder fører til en høyere diskriminering mellom arter, i tillegg til at metodene er reproduserbart, tids- og kostnadseffektiv (Foxman et al. 2005).

*Lactobacillus* stammer fra ulike omgivelser har blitt genotypet med metoder som puls-felt gel elektroforese (PFGE), tilfeldig amplifisert polymorf DNA (RAPD), og ”repetitive extragenic palindromic” (REP) polymerase kjedereaksjon (PCR). En sammenligning av disse metodene viser at rep-PCR er en god metode ved differensiering av lactobacilli arter. (Gevers et al. 2001; Stephenson et al. 2009; Turkova et al. 2012). Denne metoden har vist seg å være reproduserbar ved karakterisering av art og stammenivå av *Lactobacillus* (Porcellato et al. 2012).

Fingerprinting metoden, rep-PCR er basert på ulike sekvenser i genomet som består av ”interspersed” repetitive sekvenser som kan benyttes som bindingssete for oligonukleotid primere ved en PCR reaksjon. Disse sekvensene som primerne er komplementære til, er konserverte i diverse bakterieslekter. Det er fire typer konserverte sekvenser som benyttes som primere, REP sekvens, ”enterobacterial repetitive intergenic consensus” (ERIC) sekvens, BOX sekvens og polytrinukleotid (GTG)<sub>5</sub> sekvens. (Mohapatra et al. 2007; Versalovic et al. 1994) Opprinnelig består REP sekvensen av 35-40 basepar (bp), ERIC sekvens med 124-127 bp og BOX elementer som består av tre konserverte underenheter av BOX; boxA, boxB og boxC (Schneider & deBruijn 1996).

I dette studiet har det blitt benyttet primere basert på BOX elementene og GTG<sub>5</sub> sekvensen ved amplifiseringen av DNA ved bruk av PCR. Produktet fra denne prosessen undersøkes ved gel elektroforese, hvor det ved visualisering under UV lys observeres et båndmønster. Ut i fra gel bilde undersøkes genetisk variasjon ved å utføre en grupperingsanalyse (*cluster analysis*) ved bruk av UPGMA analyse og Person korrelering.

UPGMA analyse.

”*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*” (UPGMA) er en grupperingsmetode for dannelsen av et fylogenetisk tre, hvor det involveres gruppering av arter basert på fylogenetiske avstander. Det antas at arten har en lik avstand fra roten og begynner på bygningen ved å gruppere de to mest beslektede artene. Dette gir en redusert matrise som tillater at den mest nærliggende arten som ligger nærmest blir lagt til.

Dette er en av de enkleste grupperings metodene, hvor det benyttes en kronologisk, gitt avstand (Xiong 2006). Denne metoden benyttes for å danne en grupperingsanalyse av rep-PCR produktet i programvaren, GelCompare (Applied Math, Belgia)

## 1.5 Mål med oppgaven

Pågående forskning tester om honningbienes dominerende tarmbakterie *L. kunkeei* kan benyttes til å utføre paratransgenesis. Dette er en metode hvor symbiotiske bakterier blir genetisk manipulert til å avgi effektor proteiner som for eksempel blokkerer utviklingen av patogener (Rangberg et al. 2012). Under forskningen ble det observert at bakterien ga en mulig forlenget levetid hos biene (ikke publisert). Derfor er det i denne oppgaven utført et større forsøk, *in vivo* på honningbier for å undersøke om dette er tilfellet.

Hovedmålene i dette studiet er følgende:

- Undersøke om bakterien *L. kunkeei* har en effekt på bienes overlevelse. Dette utføres *in vivo* på honningbier, *A. mellifera*, ved å tilføre et utvalg av ulike stammer av bakterien til bienes fôr under kontrollerte forhold.
- Undersøke det om foreligger en genetisk variasjon mellom isolerte stammer av *L. kunkeei* avhengig av måneden de er isolert.



## 2. Materialer og Metoder

En oversikt over løsninger, kjemikalier, enzymer og primere som ble benyttet i studiet er listet opp i vedlegg 2 og 3. Arbeidet utført i dette studiet er oppsummert i et flytskjema, vedlegg 4.

### 2.1 Bakteriestammer

*L. kunkeei* stammene (AH) som benyttes i denne oppgaven er villtyper isolert fra midtmagen til honningbier i perioden september til desember 2010. Fra hver prøvetaking ble det inkludert bier fra minst to kuber (Rangberg et al. 2012). Dette arbeidet ble utført av Anbjørg Rangberg. En stamme fra bakterien *Lactobacillus plantarum*, (WCFSI) inkluderes som referanse i studiene som har blitt utført. Disse bakteriene er listet opp i vedlegg 1.

### 2.2 Kultivering og vekst av bakterier

#### 2.2.1 Vekstmedier og kultivering

For å gjennomføre vekst av en gitt mikroorganisme benyttes et vekstmedium som inneholder essensielle næringsstoffer som er nødvendig for organismens metabolisme. Mediene kan være definerte, komplekse eller selektive.

For å kunne dyrke frem kolonier av bakterien benyttes agar, som gir fast media. Dette vil immobilisere cellene og dermed vokse frem som kolonier på skålen.

Vekstmediene må være sterile før det inokuleres mikroorganisme. I disse tilfellene er det viktig å jobbe med aseptiske teknikker for å hindre kontaminering.

Nødvendige faktorer for vekst er tilgjengeligheten av mikrobielle næringsstoffer, oksygen, pH, vann og optimaltemperatur (Madigan et al. 2012).

Overnatt kulturer (ON) refererer til en bakterie som er inokulert i media og satt til vekst dagen før de tas i bruk. Cellene i løsningen vokser eksponentielt til den stasjonære fasen.

### 2.2.2 Kultivering og lagring av *L. kunkeei* og *L. plantarum*

*L. kunkeei* stammer (AH) dyrkes i MRS medium (deMan-Rosa.-Sharpe, Oxiod) med 1%(v/v) D-fruktose, anaerobt ved 30 °C.

*L. plantarum* stamme, WCFSI, dyrkes i MRS medium, anaerobt ved 30°C.

Villtyper av *L. kunkeei* stammer og *L. plantarum* stammen ble langtidslagret ved -80°C i 20% (v/v) glyserol.

### 2.2.3 Vekstforsøk

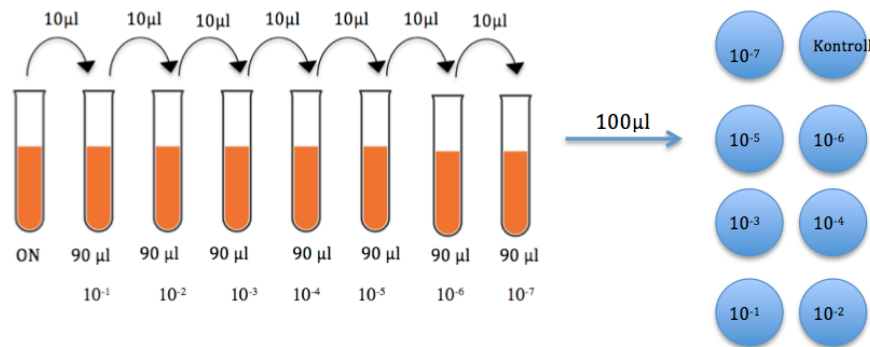
Veksten av fire ulike *L. kunkeei* (AH) stammer og en *L. plantarum* stamme (WCFSI) ble undersøkt i MRS vekstmedium supplert med 15% sukroseløsning og i en løsning bestående kun av 15% sukroseløsning, ved inokulering av ON kultur i MRS medium (hhv. med 1% (v/v) D-fruktose og uten fruktose, se 2.2.2)

10 µl ON kultur ble inokulert i 10 ml MRS medium med 15% (v/v) sukrose og 1% (v/v) D-fruktose sukkerløsning eller 200 µl ON kultur kun i 15% (v/v) sukrose med 1%(v/v) fruktoseløsning.

Under begge oppsettene ble bakteriene inkubert ved 30°C og OD<sub>620nm</sub> målt hver time over en periode på 8 timer, deretter etter 24 og 26 timer for å anslå bakterievekst.

### 2.2.4 Kolonidannende enheter per ml (CFU/ml)

Antall kolonidannende enheter (*coloni forming units*, CFU) tilstede rett etter inokulering av ON kulturen og etter 6 og 24 timer i en sukkerløsning (15%(v/v) sukrose og 1%(v/v) fruktose) ble undersøkt ved å lage en 10x fortytning. Figur 2.1 viser oppsettet. CFU/ml ble utregnet på følgende måte: (antall kolonier x fortytning) / volum platet ut (ml).



**Figur 2.1.** Fortynningsserie for kolonidannede enheter av bakterier tilstede i sukkerløsningene (15% sukrose og 1% fruktose). Hver fortynning ble platet ut med 100 µl til den respektive fortynningskålen. Fortynningen med optimalt antall bakteriedannende kolonier ble benyttet for videre utregning.

## 2.3 Overlevelsesanalyse av honningbier

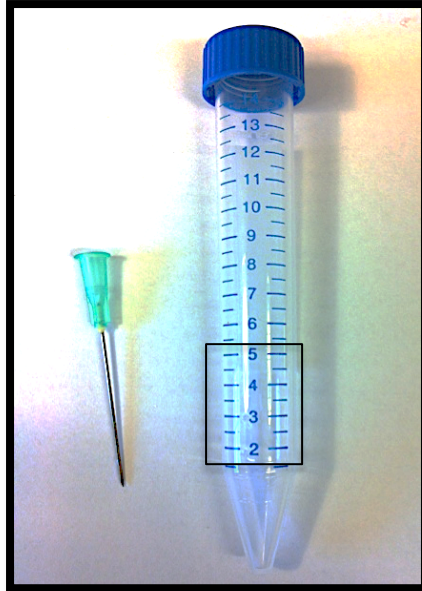
Studie av *L. kunkeei* sin effekt på honningbiers, *A. mellifera* overlevelse, ble undersøkt *in vivo*, ved at honningbiene ble fôret med ulike behandlinger. Kubene er lokalisert i området ved Universitetet for miljø og biovitenskap og innsamling pågikk høst 2012 og vinter 2013.

### 2.3.1 Behandling

Behandlingene er består av følgende løsning; 15%(v/v) sukrose og 1% (v/v) D-fruktose i dH<sub>2</sub>O som videre inokuleres med enten 1/25 fortynning av *L. kunkeei* eller 1/50 fortynning *L. plantarum* og deretter dyrkes i 6-7 timer ved 30°C til OD<sub>620nm</sub> er ~0.2 . Kontrollbier behandles kun med sukkerløsning. I tilfeller hvor annen behandling benyttes blir det oppgitt.

Bakterieløsningen overføres til sterile 15 ml plastrør (Cell Star), som består av 6 små hull fordelt nederst på røret (området mellom merket 2 og 5 ml), vist i figur 2.2. Disse hullene konstrueres ved hjelp av en opphetet kanyl (BD Microlance), med målene 0,8 x 40 mm. Når lokket skrues på skapes det et vakuum som gjør at bakterieløsningen ikke renner ut av

hullene. Biene får i seg behandlingen ved at de har lange tunger som de kan føre inn i de små hullene og drikker av løsningen.



**Figur 2.2.** Bildet viser kanylen som ble benyttet for å lage små hull på nederste del av behandlingsrøret ved at den blir varmet opp under flamme. Hullene lages mellom merket 5 og 2 på røret, markert på bildet. (Foto: Birgitte Engelsen Flatval)

### 2.3.2 Innsamling og inkubering av bier

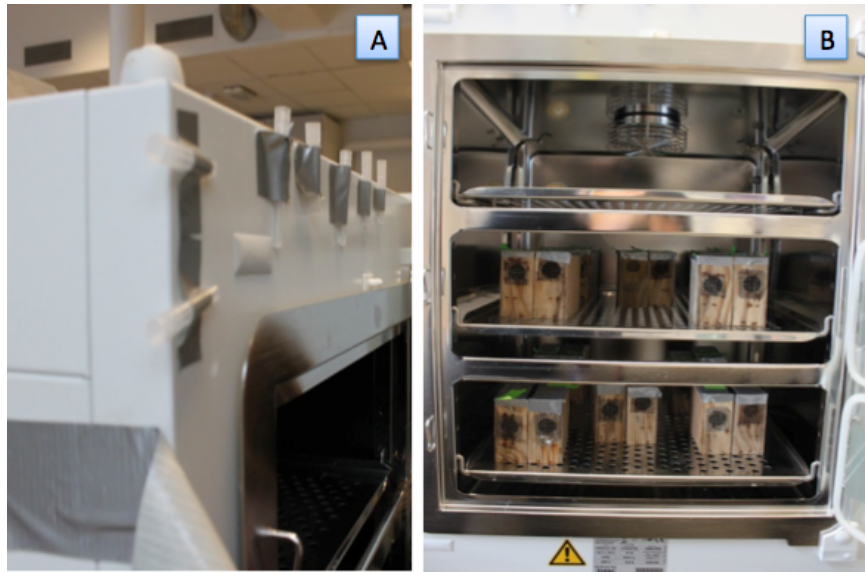
For å gi en heterogenitet av bier i forsøket ble det hentet inn honningbier fra tre ulike kuber (kubenummer 1, 2 og 5). Biene ble samlet inn og oppbevart i bur laget av treverk. Det ble kun plukket bier som lå klynget sammen på toppen av rammene og ikke bier som svermet rundt utenfor kuben, figur 2.3(A)(B).

Burene består av to kamre med luftehull på hver kortsida, som er dekket med stålgritter. På toppen av buret er det ett hull hvor behandlingsrøret settes. Den ene langsiden er dekket med en gjennomsiktig plastikkplate slik at det er mulig å observere biene inne buret. Døde bier vil falle ned i det nederste kammeret, vist i figur 2.3(C)(D).



**Figur 2.3.** Kuben består av åtte rammer vist ovenfra hvor biene ligger i en tett klynge under vintermånedene(A). Biene blir plukket enkeltvis inn i bur med pinsett(B). Komplettert bur med behandlingsrør og bier(C). Nærbilde av biene i buret hvor de klynges rundt røret for å drikke av løsningen(D) (Foto: Dzung Diep).

Burene ble plassert i en inkubator (Hera Cell 150, Thermo- Scientific) som holdt en temperatur ved 30° C, O<sub>2</sub> nivå ved 21.5 % og et CO<sub>2</sub> nivå ved 1.5 %. Ved inkubering av biene økte CO<sub>2</sub> nivået til omtrent 3.0. For å redusere dette nivået under overlevelsesforsøket ble det derfor montert pipettespisser i døråpningen for å hindre en opphopning av CO<sub>2</sub> inne i inkubatoren, figur 2.4. Ved hvert forsøk beholdt burene samme plassering og inkubatoren ble rengjort mellom settene.



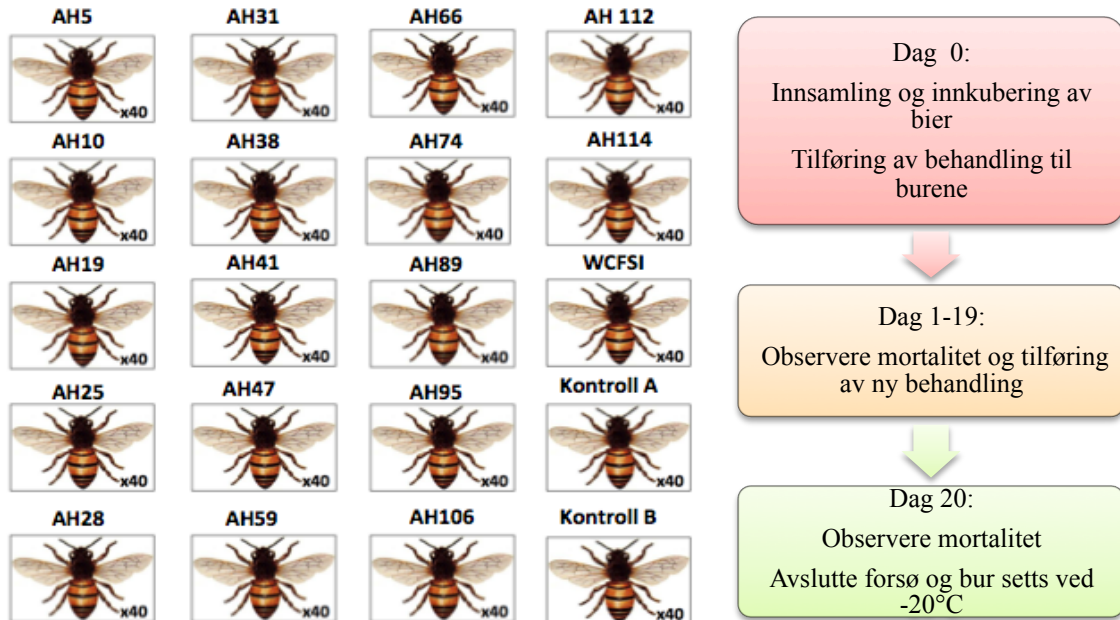
**Figur 2.4.** Inkubatoren som ble benyttet med monterte pipettespisser i døråpningen(A). Burene ble fordelt på to plan og hadde samme plassering inne i inkubatorene, ved hver av oppsettene(B) (Foto: Dzung Diep).

### 2.3.3 Overlevelsesanalyse av honningbier

Utførelsen av forsøkene ble gjort på to ulike tidspunkter. Det ene ble utført 8. februar 2013, og det andre ble utført 4. mars 2013. Forsøkene navngis med måneden de ble utført, Februar og Mars. Det må videre tas hensyn til væromgivelsene under innsamling av biene.

Temperaturen i februar var under  $0^{\circ}\text{C}$  og overskyet, mens det i mars var over  $0^{\circ}\text{C}$  og solskinn.

Hvert bur inneholder 40 bier med totalt ulike 20 behandlinger, disse er vist i figur 2.5. Etter fullført innsamlingen av bier ble burene inkubert i  $30^{\circ}\text{C}$  i en time før supplering av behandling og observasjon av biene ble utført. Dette for å eliminere bier som døde under innsamling og transport.



Figur 2.5. Illustrasjon av oppsettet for både Februar og Mars, 17 ulike *L. kunkei* (AH) stammer, med referanse, *L. Plantarum* (WCFSI) og bur med to kontrollbehandlinger (Kontroll A og B). Forsøkene pågikk over 20 dager, hvor hvert enkelt bur fikk daglig tilføring av samme behandling. Ved avsluttet forsøk settes burene til  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Genotypiske analyser

### 2.4.1 Isolering av genomisk DNA

Frysekulturer ble strøket ut på skåler med MRS agar, disse ble inkubert i  $30^{\circ}\text{C}$  i 72 timer, deretter ble det satt opp ON kultur for hver enkelt bakteriestamme, ved å overføre en koloni fra skålen.

Ved isolering av genomisk DNA fra *Lactobacillus* ble det benyttet en modifisert versjon av Sigma GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma- Aldrich).

Ved bruk av dette kommersielle kittet tilsettes det lyzosyme (Invitrogen) som fører til lysis av peptidoglykanveggen. Det tas i bruk et silicabasert system med microspin format som eliminerer bruken av skadelige organiske komponenter som fenolkloroform (Sigma Aldrich 2010).

For detaljert beskrivelse av protokollen se vedlegg 3 .

Følgende avvik fra protokollen ble utført ved isolering av genomisk DNA:

- 1 ml av ON kultur sentrifugeres i 2 min ved 12,000- 16,000 5g.
- Cellepellet resuspenderes i 200 µl lyzosymløsning som består av 40mg/ml lyzosyme
- Elueringen ble utført med 50 µl Elution solution.

Kvaliteten på genomisk DNA ble bestemt spektrofotometrisk ved  $A_{260/280nm}$  på Nanodrop og ved å kjøre elektroforese i en 1% agarosegel. Fragmentstørrelsen ble sammenlignet med 1 kb størrelsesmarkør. Isolert genomisk DNA, PCR produkt og annet genetisk materiale oppbevares ved  $-20^{\circ}C$ .

### 2.4.2 Måling av renhet av isolert DNA

Kvaliteten av isolert DNA kan måles spektrofotometrisk. Gitt absorbans ved 260nm og 280nm kan benyttes for å undersøke renheten til både DNA og RNA. En ratio ved  $\sim 1,8$  er akseptert i forhold til renhet av DNA. Om ratioen er lavere indikerer dette at det prøven inneholder proteiner, fenol eller annen kontaminering. En ratio ved  $\sim 2,0$  tilsier rent RNA.

### 2.4.3 Polymerase kjedereaksjon

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode som brukes for å amplifisere en spesifikk sekvens av DNA. Denne metoden består av tre temperaturregulerte faser med ulike egenskaper; denaturering, hybridisering og polymerisering. DNA dobbeltråden blir separert



til enkeltråder, deretter hybridiseres primerne, som er kunstig syntetiserte DNA sekvenser til de komplementære områdene til enkeltrådene.

Syntetiseringen av DNA syntesen initieres ved bruk av DNA polymerasen, som utvider primerne og naturlig syntetiserer kopier av nytt DNA.

Amplifiseringen ved PCR er eksponentiell ettersom de tre fasene blir repetert omtrentlig 25-35 gange, som gir  $10^{-6}$  til  $10^{-9}$  ganger økning av målsekvensen (Madigan et al. 2012).

PCR reaksjonsmiks består av en buffer, 10x PCR buffer( invitrogen), Taq® polymerase (invitrogen),  $MgCl_2$ (invitrogen), primer, nukleotider (dNTP) og genomisk DNA. I reaksjonsmiksen i dette studiet benyttes Q solution (Qiagen) som fungerer på ulike måter iforhold til ulike bakterier. Eksakt innhold og konsentrasjon er ikke kjent, men det er en saltløsning som kan hjelpe på spesifisiteten av primernes plassering på templat DNAet. PCR er utført ved bruk av Thermacycler S1000™(Bio-Rad)

I dette studiet utføres rep-PCR av isolert genomisk DNA fra *L. kunkeei* stammer.

Reaksjonsmiksen og PCR programmet tatt i bruk ved rep-PCR vises i tabell 2.1 og 2.2.

**Tabell 2.1. Reaksjonsmiks benyttet i rep-PCR**

<b>Reagenser</b>	<b>Volum(<math>\mu</math>l)</b>
10x Taq PCR Buffer (- $MgCl_2$ )	2,5 $\mu$ l
dNTP (1.25 mM)	4 $\mu$ l
$MgCl_2$ (50 mM)	1,7 $\mu$ l
Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
Q solution	1 $\mu$ l
Taq polymerase	0,2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	9,6 $\mu$ l
DNA templat (~ 20-50 ng)	2 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

**Tabell 2.2. PCR programet benyttet i arbeidet er vist i tabellen nedenfor. Det ble utført med Thermacycler S1000.**

Temperatur	Tid
95°C	5 min
40 sykluser med:	
94°C	30 sek
45°C	1 min
65°C	1 min
72°C	1 min
72 °C	16 min
4°C	∞

#### 2.4.4 Gel elektroforese og visualisering av isolert DNA og rep-PCR produkt

For å kunne validere og observere syntetiseringen av de repetitive områdene i genomet, ble PCR produktet kjørt gjennom 1% agarose gel ved bruk av elektroforese. Etersom DNA er negativt ladet ved naturlig pH, fører dette til at DNAet kan migrere mot positiv pol i et elektrisk felt. Agarosegel fungerer ved at den inneholder porer som tillater separering av DNA fragmenter gjennom gelen basert på størrelse av fragmentet; større molekyler migrerer saktere enn små. Etidiumbromid tilsettes gelen slik at det dannes et kompleks med DNAet i løpet av migreringen.

Dannelsen av dette komplekset er fluoriserende under UV-lys og tillater dermed observasjon av DNA fragmentet (Watson et al. 2008).

Gel elektroforese ble benyttet ved visualisering av isolert DNA som kjøres på mindre agarosegeler ved 70V i 1 time, og rep-PCR produkt som kjøres på store agarose geler ved 100 V i 4 timer.

## 2.5 Programvarer

### 2.5.1 Statistica, Starsoft.

Statistica er en omfattende programvarepakke som brukes for å utføre statistiske tester. I dette studiet ble programmet benyttet for å kjøre tester på observasjonene innhentet fra overlevelsesforsøket med bier. Kaplan Meier overlevelsesanalyse ble beregnet basert på antall registrerte dødsfall. I tillegg ble det kjørt en post-hoc analyse i form av two sample test, Cox-F test. Et nivå på 5% ( $p < 0,05$ ) ble evaluert som signifikant nivå (*StatSoft, Electronic Statistics Texbook*).

### 2.5.2 BioNumerics, Applied Math.

GelCompare II, versjon 6, er en bioinformatisk programvare som benyttes for analyse og sammenligning av elektroforesemønstre og gjør det mulig å linke multiple elektroforesemønstre til stammer eller prøver som studeres (*GelCompare II* 2013).

I dette studiet benyttes denne programvaren til å danne en grupperingsanalyse på bakgrunn av rep-PCR elektroforesemønstre med bruk av Pearson korrelering og UPGMA.

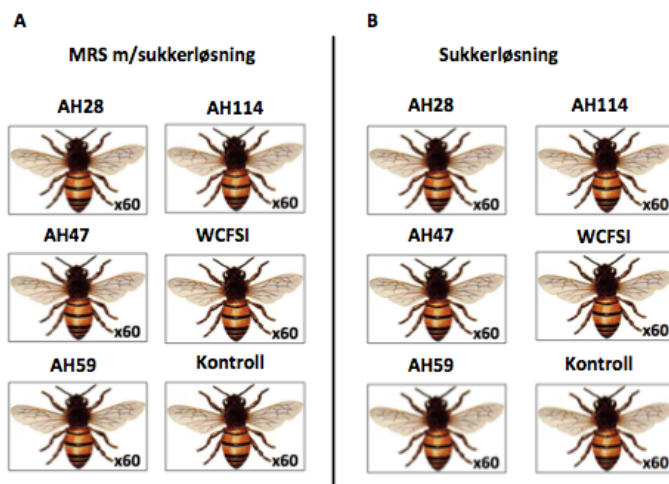
### 3. Resultater

Resultatene delt opp i tre avsnitt. Første avsnitt to pilotforsøk, hvor effekten av noen få utvalgte *L. kunkeei* stammer er testet på honningbienes overlevelse ved bruk av to ulike behandlingsløsninger. Her inkluderes også optimalisering av forsøkene, som lekkasje, vekstforsøk og tilstedeværelse av bakterier i behandlingsløsningene. Dette blir benyttet videre i overlevelsesanalysen, som inngår i andre avsnitt. I tredje og siste avsnitt fremlegges studiet av genetisk variasjon mellom *L. kunkeei* stammer basert på hvilke måneder de er isolert i.

#### 3.1 Pilotforsøk på overleve og optimalisering

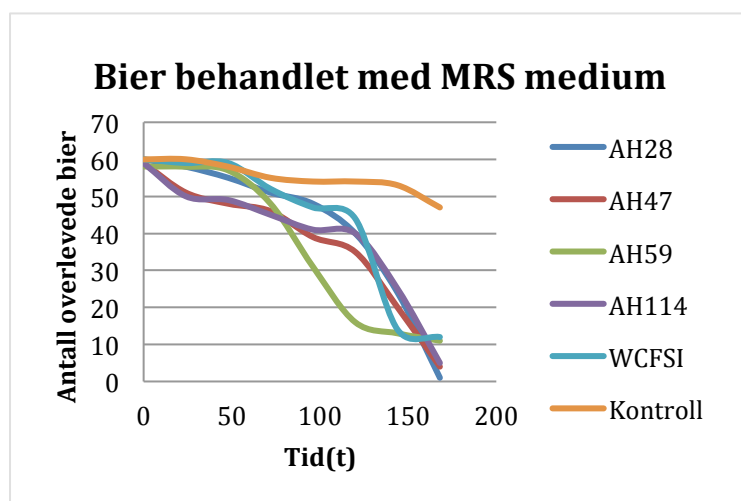
Høsten 2012 ble det utført to ulike pilotforsøk for å teste bakteriers effekt på honningbienes overlevelse. De samme bakteriene ble benyttet i begge pilotforsøkene, hvor hver behandling besto av fire ulike *L. kunkeei* (AH) stammer, en referanse, *L.platarum* (WCSFI) og en kontrollbehandling (15%(v/v) sukroseløsning).

Hvert bur bestod av 60 bier. Behandling og observasjon av mortalitet ble utført daglig. Begge pilotforsøkene ble utført over en periode på 8 dager. Oppsettet ved disse forsøkene er vist i figur 3.1. Det ene forsøket med MRS behandling ble kun utført en gang(A). Det andre pilotforsøket, som kun besto av behandling med kun sukkerløsning ble utført med tre replikater(B).



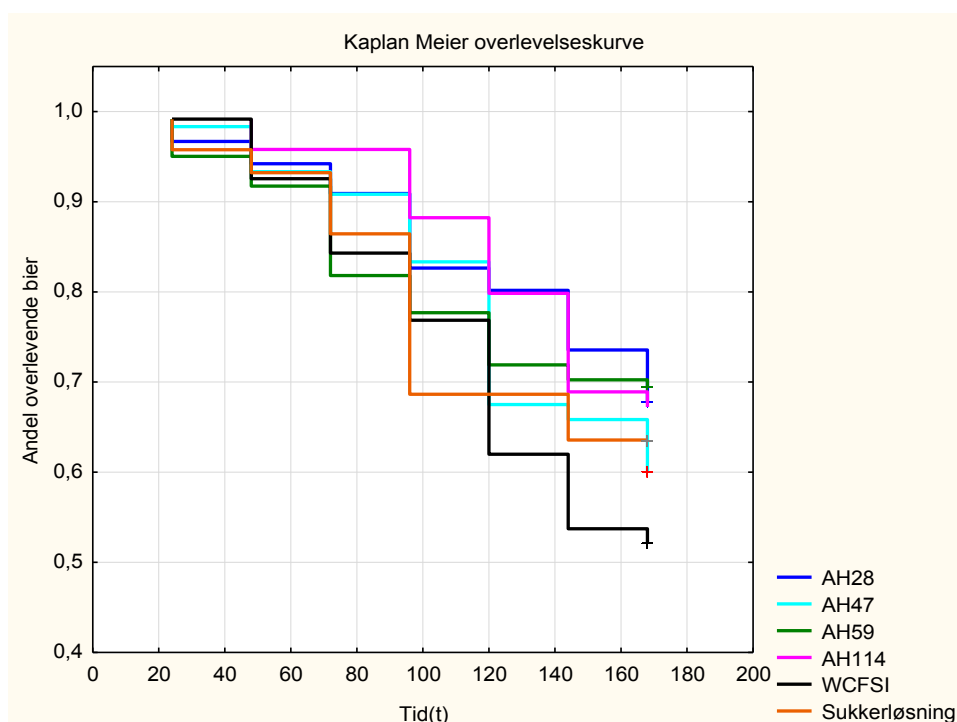
Figur 3.1. Illustrasjon av de to ulike pilotforsøkene som ble utført og *L.kuneei* (AH) stammene som behandlingene besto av. En serie ble utført med behandling bestående av MRS medium med sukkerløsning (A). Det andre pilotforsøket ble utført med tre replikater, hvor behandlingen kun besto av sukkerløsning (B).

Under det første forsøket som ble utført med honningbier besto behandlingen av bakterier inokulert i MRS medium tilført sukkerløsning (15% (v/v) sukrose og 1% (v/v) D-fruktose). Som vist i figur 3.1 ble det observert en svært høy mortalitet av bier (77,5% ) etter endt forsøk, hvor kontrollbehandlingen viser lavest observert mortalitet av bier.



Figur 3.2. Utfallet av observasjon ved første pilotforsøk hvor biene er behandlet med *L. kuneii* (AH) dyrket i MRS med 15%(v/v) sukrose og 1%(v/v) fruktose. WCFSI dyrket i MRS med kun 15%(v/v) sukrose. Observasjonene ble utført daglig over en periode på 8 dager.

Siden behandling med MRS medium ga en høy observert mortalitet hos biene ble behandlingen endret til kun sukkerløsning (15%(v/v) sukrose og 1% (v/v) D-fruktose). Dette pilotforsøket bestod av tre replikater, hvor den samlede effekten av alle behandlingene ble undersøkt i en Kaplan Meier overlevelseskurve, figur 3.3. Kurven viser at det er en signifikant effekt av behandlingene  $p < 0,01$  ( $p = 0,0094$ ) og en observert mortalitet på 28%.

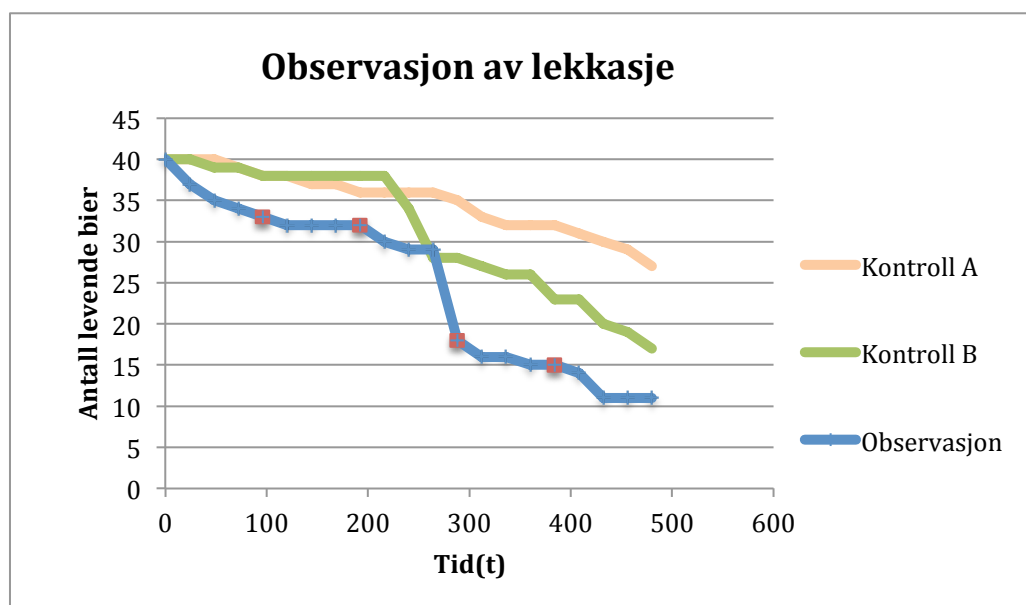


**Figur 3.3.** Kaplan meier overlevelseskurven viser resultatet for tre replikater med behandling bestående av kun sukkerløsning med *L. kunkeei* stammer(AH), *L. plantarum* (WCFSI) som referanse og en kontrollbehandling. Kaplan meier overlevelseskurve, viser at den samlede effekten for behandlingene er signifikant for bienes overlevelse.

For å kunne undersøke hvilke av behandlingene som ga signifikant effekt, gjennomføres en Cox-F test, hvor hver enkelt behandling settes opp mot kontrollbehandling. Dette viser at enkelte behandlinger gir en signifikant effekt, figur V5-. Det ble observert mange feilkilder underveis i forsøkene som lekkasje fra behandlingsrørene, mangel på væske i rørene og sterke luftstrømmer fra ventilen i inkubatoren, noe som kan føre til høyere mortalitet.

Lekkasjer var en feilkilde som forekom hyppig i pilotforsøkene. Derfor ble det konstruert lekkasjer i et bur. Under Februar forsøket ble det konstruert lekkasjer som forekom hver fjerde dag ( $t_{96}$ ,  $t_{192}$ ,  $t_{288}$  og  $t_{384}$ ) i en periode over 20 dager. For å oppnå lekkasje ble hullene på behandlingsrøret laget med en større diameter enn det som vanligvis ble brukt. Dette resulterte i at løsningen rant ut i burene, i kontrast til at biene selv inntok løsningen fra røret. Dette ble utført for å undersøke hvilken påvirkningen dette har på bienes mortalitet. Figur 3.4 visualiserer hvilken påvirkningen lekkasjene hadde på biene i dette buret, i forhold til kontrollbehandlingene fra samme forsøk.

I perioden etter første lekkasje ( $t_{96}$ ), er det ingen tydelig endring av antall levende bier. Dette kan skyldes at biene klarer å fjerne den overflødige væsken i buret. Etter andre lekkasje ( $t_{192}$ ) ble det observert en økning av mortalitet hos biene. Økningen av mortalitet blant biene var på 35%. Sett i sammenheng med kontrollbehandlingene A og B fra samme forsøk viser dette at den totale mortaliteten for lekkasjebehandling (72,5%) er høyere enn for kontrollbehandlingene (A=32,5%, B=57,5%).



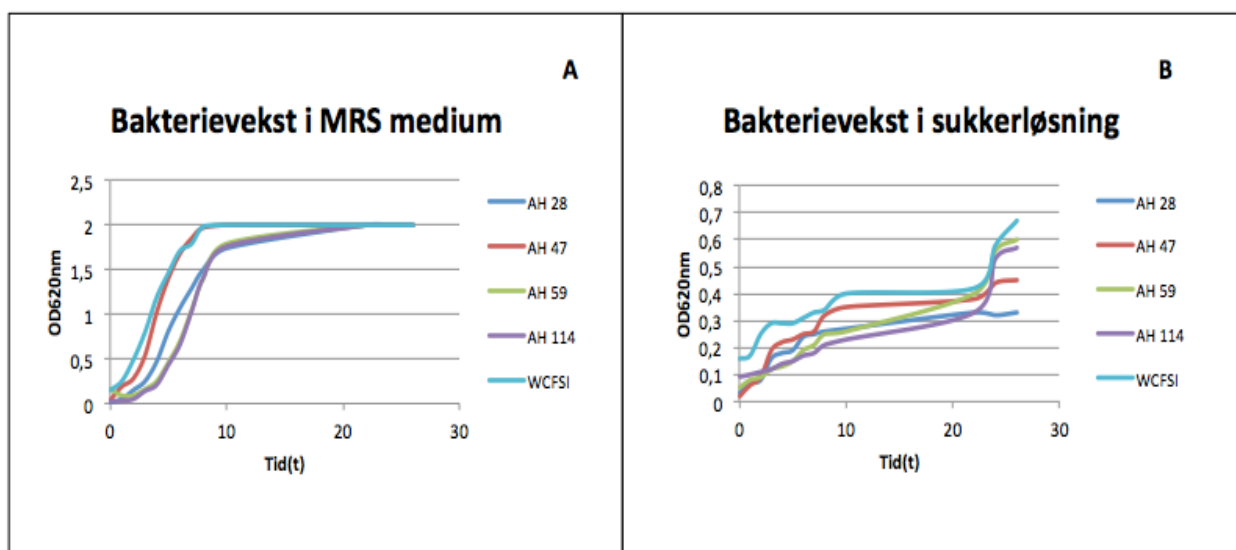
Figur 3.4. Observasjon av konstruert lekkasje i et behandlingsbur. Observasjonen ble gjort parallelt med Februar forsøket, inkubert i 20 dager med behandling bestående kun av sukkerløsning. Behandlingsrør med konstruert lekkasje gitt ved fire ulike tidspunkter,  $t_{96}$ ,  $t_{192}$ ,  $t_{288}$  og  $t_{384}$  (markert med rødt). Store væskeoppsamlinger i burene kan ha påvirkning på mortalitet hos biene.

### 3.1.2 Vekstforsøk

Dokumentasjon av vekst og tilstedeværelse av bakteriene i de to ulike behandlingens løsningene ble utført ved å måle  $OD_{620nm}$  hvert time over en periode på 8 timer, etter 24 og 26 timer (refererer til 2.2.3 i materialer og metoder)

Dette ble utført med to paralleller ved begge løsningene, som er vist i figur 3.5. *L. kunkeei* (AH) stammer og referansen *L. plantarum* (WCFSI) dyrket i MRS medium supplert med 15% (v/v) sukrose, figur 3.5A. Hos AH stammene er det i tillegg tilført D-fruktose i mediet (1%(v/v) ). Denne figuren viser eksponentiell vekst av bakteriene.

Derimot viser figur 3.5 B og tabell 3.1 at de samme bakteriene er tilstede, men at de ikke hadde eksponentiell vekst. Der bakteriene ble dyrket i en løsning bestående av 15% (v/v) sukrose og 1% (v/v) fruktose.



Figur 3.5 A og B. Vekst av fire ulike *L. kunkeei* stammer(AH) i MRS medium tilsatt 15%(v/v) sukrose og 1%(v/v) D-fruktose og *L. plantarum* (WCFSI) dyrket kun i MRS medium med 15%(v/v) sukrose, figur A. Figur B viser vekst av AH stammer dyrket i 15%(v/v) sukrose og 1%(v/v) fruktose, WCFSI dyrket i kun 15%(v/v) sukrose. I begge studiene er bakteriene inkubert ved 30°C og målt ved  $OD_{620nm}$ . Figur A viser at eksponentiell vekst kun forekommer når dyrket i MRS medium.



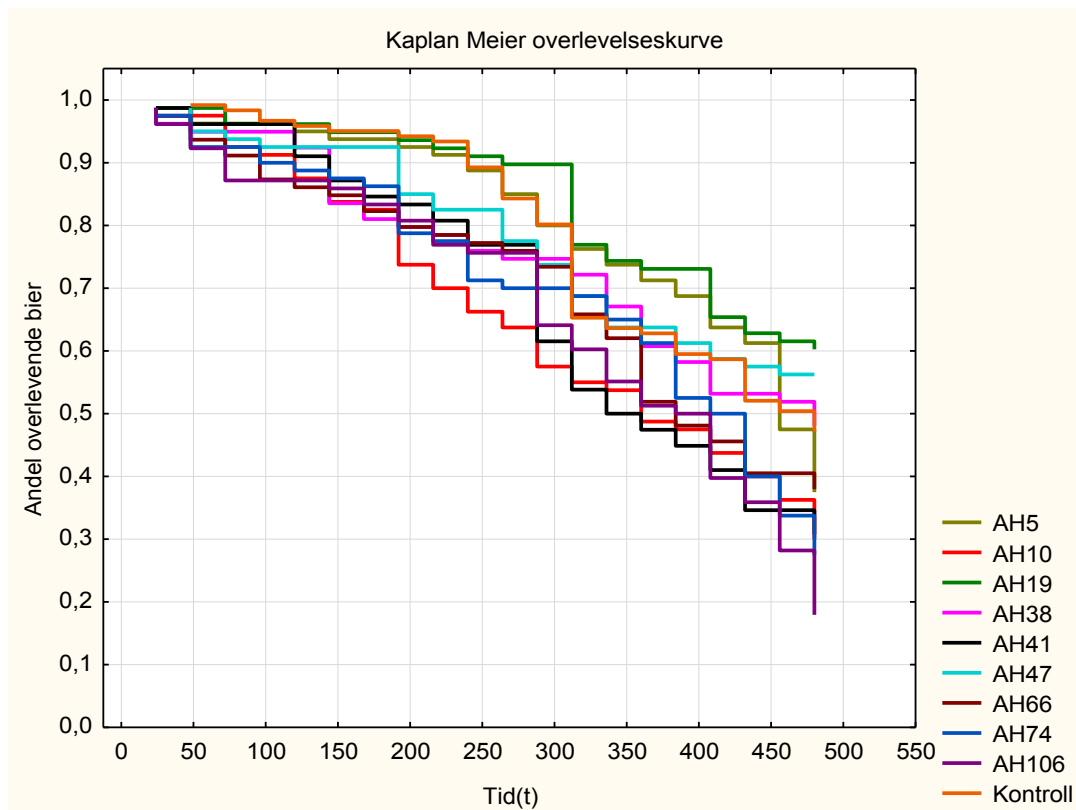
**Tabell 3.1. Viser CFU/ml hos to *L. kunkeei* stammer i sukkerløsning (15%(v/v) sukrose og 1%(v/v) D-fruktose). Første utplanting er etter inokulering av ON kultur i sukkerløsning, for så etter 6 og 24 timer.**

Tid(t)	AH114	AH 28
0	$1,2 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$
6	$1,92 \times 10^7$	$2,24 \times 10^7$
24	$8,0 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$

### 3.3 Overlevelsanalyse

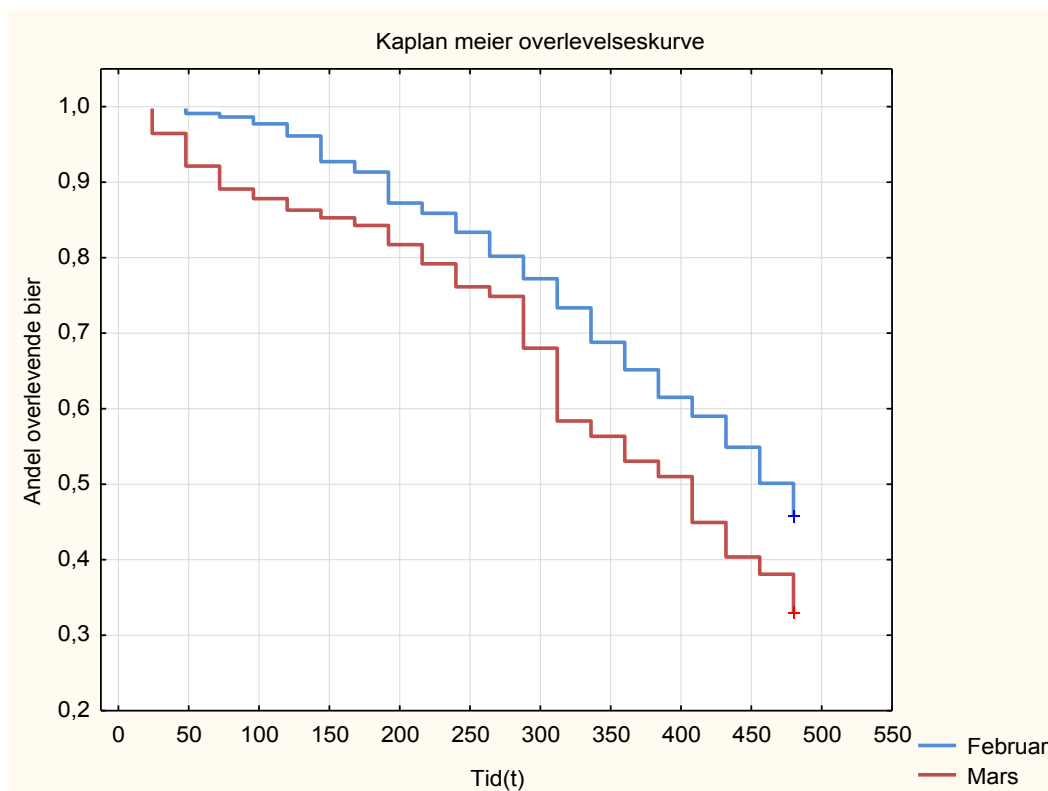
Bakterien *L. kunkeei* mulige effekt på honningbienes overlevelse ble testet ut, *in vivo* ved to forsøk, hvor hvert forsøk har fått navn etter de respektive månedene de ble utført i; Februar og Mars.

Ettersom lekkasje i burene var en feilkilde som ble observert gjentatte ganger i begge forsøkene, ble disse utelukket fra forsøket. Fra begge undersøkelsene ble ni *L. kunkeei* stammer benyttet videre i statistiske analyser. Begge kontrollbehandlingene fra Februar og kun en kontrollbehandling fra Mars ble inkludert. Den samlede effekten av behandlingene fra både Februar og Mars ble undersøkt ved å utføre en Kaplan Meier overlevelsanalyse, hvor dette ga en signifikans på  $p < 0,001$  ( $p = 0,00001$ ,  $\text{Chi}^2 = 40,76920$  med 9 d), vist i figur 3.6.



**Figur 3.6. Kaplan Meier overlevelseskurven av den samlede effekten fra alle behandlingene, fra både Februar og Mars forsøket ( $p=0,00001$ ,  $\text{Chi}^2 = 40,76920$  med 9 d).**

Den observerte mortaliteten etter endt Februar forsøk for alle ni behandlingene var 54% hvor det i Mars forsøket viste hele 71% mortalitet etter 20 dager. Prosentandelen antyder at det er en forskjell mellom forsøkene utført. Kaplan Meier overlevelsesanalyse viser at det foreligger en forskjell mellom Februar og Mars forsøket (figur 3.7) med en signifikant forskjell på  $p < 0,05$  ( $p=0,00001$ ).



**Figur 3.7. Kaplan Meier overlevelsesanalyse viser at det foreligger en signifikant forskjell. Den samlede effekten av behandlingene er ulik mellom Februar og Mars forsøket ( $p=0,00001$ ,  $Z=4,4357$ )**

For å videre kunne bestemme hvilken eller hvilke av behandlingene som ga effekt på honningbienes overlevelse ble det utrettet det en two sample, Cox F-test, ved at hver behandling ble satt opp mot kontrollbehandlingen. Ettersom det var en signifikant forskjell mellom forsøkene ble disse testet separat og deretter kombinert. Dette vises i tabell 3.2, hvor røde stjerner viser hvor den signifikante forskjellen foreligger.

Vist i tabell 3.2 gir tre av behandlingene fra Februar forsøket signifikant effekt; AH 10, 19, 41, 74 og 106. I motsetning til Mars forsøket gir ingen av behandlingene signifikat effekt. Ved å kombinere forsøkene gir dette signifikant effekt ved de samme behandlingene som sett fra Februar forsøket. Det gir i tillegg en høyere signifikant verdi ved to av behandlingene; AH10 og H74.

Tabell 3.2. Cox F-test viser p-verdi for forsøkene separat, Februar og Mars, og begge forsøkene kombinert. Behandling AH10, 19, 41 og 74 106 viser signifikant verdi ved både Februar og forsøkene kombinert. Signifikant effekt er markert med røde stjerner.

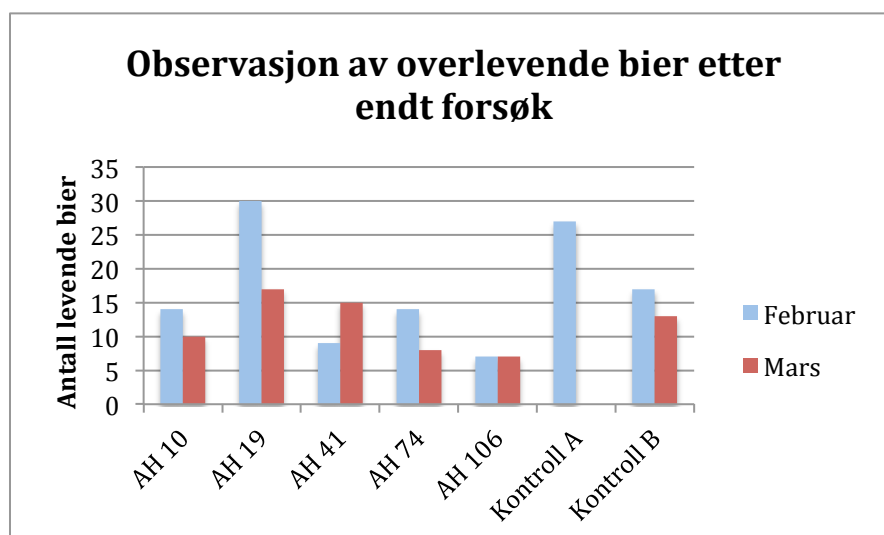
Forsøk/Stamme	AH 5	AH10	AH19	AH38	AH41	AH47	AH66	AH74	AH106
Februar	0,086	*	*	0,454	***	0,105	0,102	*	***
Mars	0,101	0,117	0,081	0,293	0,459	0,281	0,459	0,082	0,110
Kombinert	0,244	**	*	0,463	**	0,199	0,073	**	***

p-verdi: 0,05\* 0,01\*\* 0,001\*\*\*

Om den enkelte signifikante behandling fra Cox F-test har positiv eller negativ effekt på honningbienes overlevelse, er noe som må sees i sammenheng med observasjonene av mortalitet etter endt overlevelsesforsøk.

Vist i figur 3.8 har behandlingen med *L. kunkeei* stamme AH19 høyest antall levende bier etter endt forsøk ved begge forsøkene. Behandlingen med *L. kunkeei* stamme AH106 ga ved begge forsøkene lavest antall levende bier.

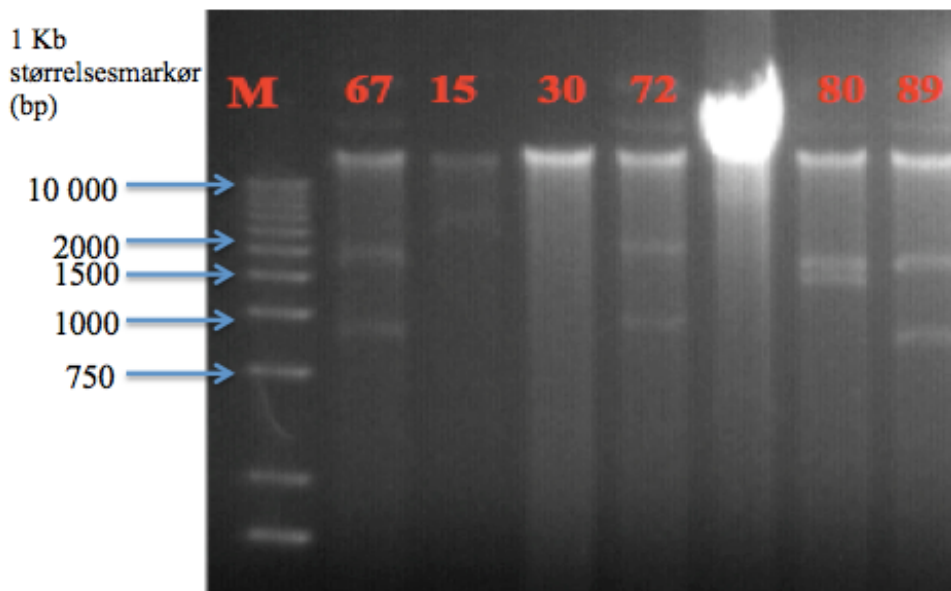
Dette må sees i forhold til kontrollbehandlingen hvor høyere antall levende bier gir positiv effekt og lavere antall levende bier gir negativ effekt.



Figur 3.8. Viser antall bier som levde etter endt forsøk fra både Mars og Februar, hvor disse er signifikante fra Cox F-test. Fra både Februar og Mars forsøket ble AH 19 observert med høyeste antall levende bier i motsetning til AH106, hvor det ble observert med laveste antall levende bier. Kontroll A er ikke inkludert fra Mars forsøket ettersom det forekom lekkasje i denne behandlingen.

### 3.4. Diversitet analyse av *L. kunkeei* stammer

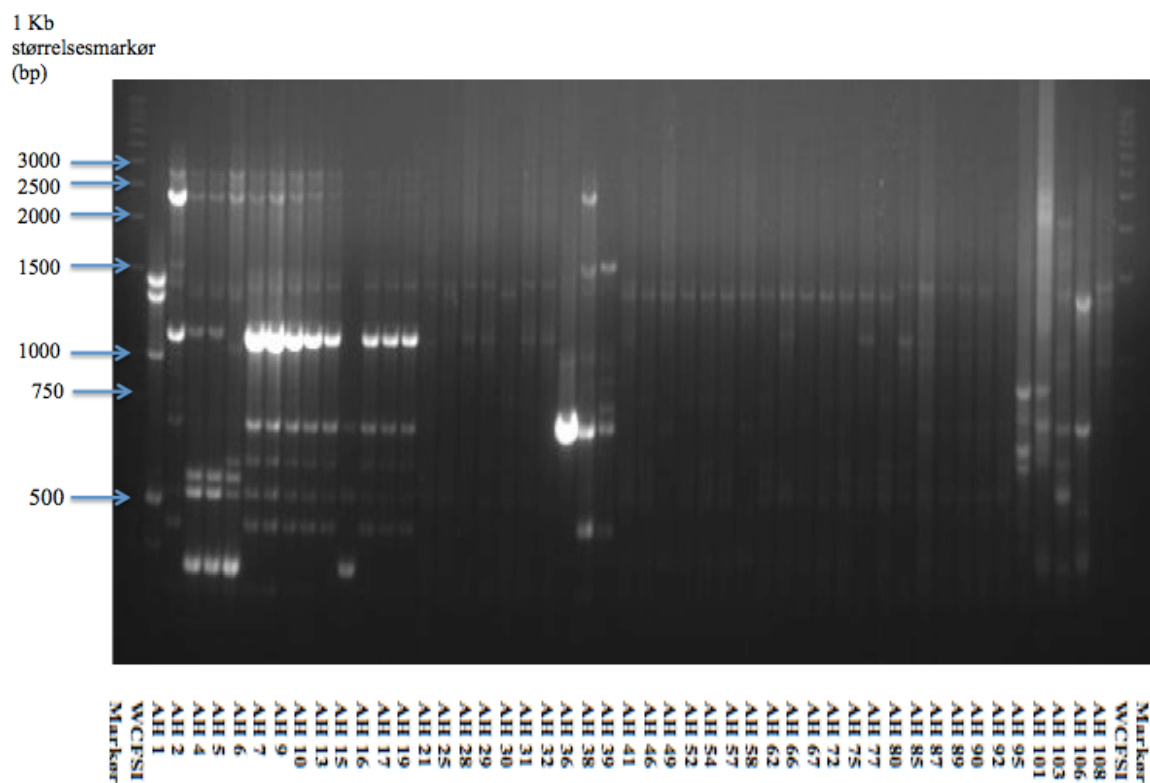
Ettersom *L. kunkeei* stammene benyttet i dette studiet ble isolert fra honningbiene under ulike måneder i løpet av høsten 2010, ble det gjennomført et forsøk hvor diversiteten av disse bakteriestammene ble undersøkt. Det ble anvendt 47 ulike *L. kunkeei* stammer isolert i september, tidlig oktober, sent oktober og i november. *L. plantarum* (WCFSI) ble brukt som referansebakterie, som ikke er isolert fra bier. En vellykket isolering av genomisk DNA ble utført ved å undersøke kvaliteten spektrofotometrisk og tilstedeværelse ved agarosegel. Et utvalgt gel bilde er vist i figur 3.9. Gel bildet viser i tillegg til kromosomalt DNA andre fragmenter som antakelig kan være plasmidet til bakteriestammene. De resterende gel bildene og kvaliteten av isolert genomisk DNA refereres til vedlegg 5 (tabell V5-1 og figur V5-1, V5-2, V5-3). Figur 3.10 og 3.12 viser gel bilde fra rep-PCR produktet med henholdsvis (GTG)<sub>5</sub> primer og BOXA1R primer. Variasjonsanalysen utført i GelCompare på bakgrunn av rep-PCR produktet vises i figur 3.11 og 3.13, med gel bilde og grupperingsanalyse.



Figur 3.9. Viser vellykket isolering av genomisk DNA av seks ulike *L. kunkeei* stammer (nummerert) ved 10 000 bp, øverste båndet. Blå pil indikerer størrelsen på markøren, definert i basepar.

### 3.4.1 Gel bilde og dedrogram av rep-PCR produkt med (GTG)<sub>5</sub> primer

Alle *L. kunkeei* (AH) stammene og referansen *L. plantarum* (WCFSI) ga produkt fra rep-PCR med (GTG)<sub>5</sub> primeren, vist i figur 3.10. Gel bildet viser at båndene enkelte stammer er ikke like tydelig, spesielt midtre delen av gel bildet. For et tydeligere bilde av disse båndene er vist i vedlegg 5, figur V5-5 De ulike bakteriestammer inneholder fra 3-10 synlige bånd.



Figur 3.10. Gel bilde av rep-PCR produktet med (GTG)<sub>5</sub> primer. Alle *L. kunkeei* stammene og *L. plantarum* viser fra 3-10 bånd med 1kb størrelsesmarkør (Markør). Blåpilene indikerer størrelsesmarkøren, definert i basepar (bp)

Figur 3.11 viser gel bildet (A), og dendrogram der bakteriestammer med 90% likhet i forhold til båndmønsteret har blitt gruppert sammen (B).

Det dannes ni grupperinger av *L. kunkeei* stammene, disse er gruppert avhengig av hvilken måned de er isolert. Gruppering I og II består av bakteriestammer fra november.

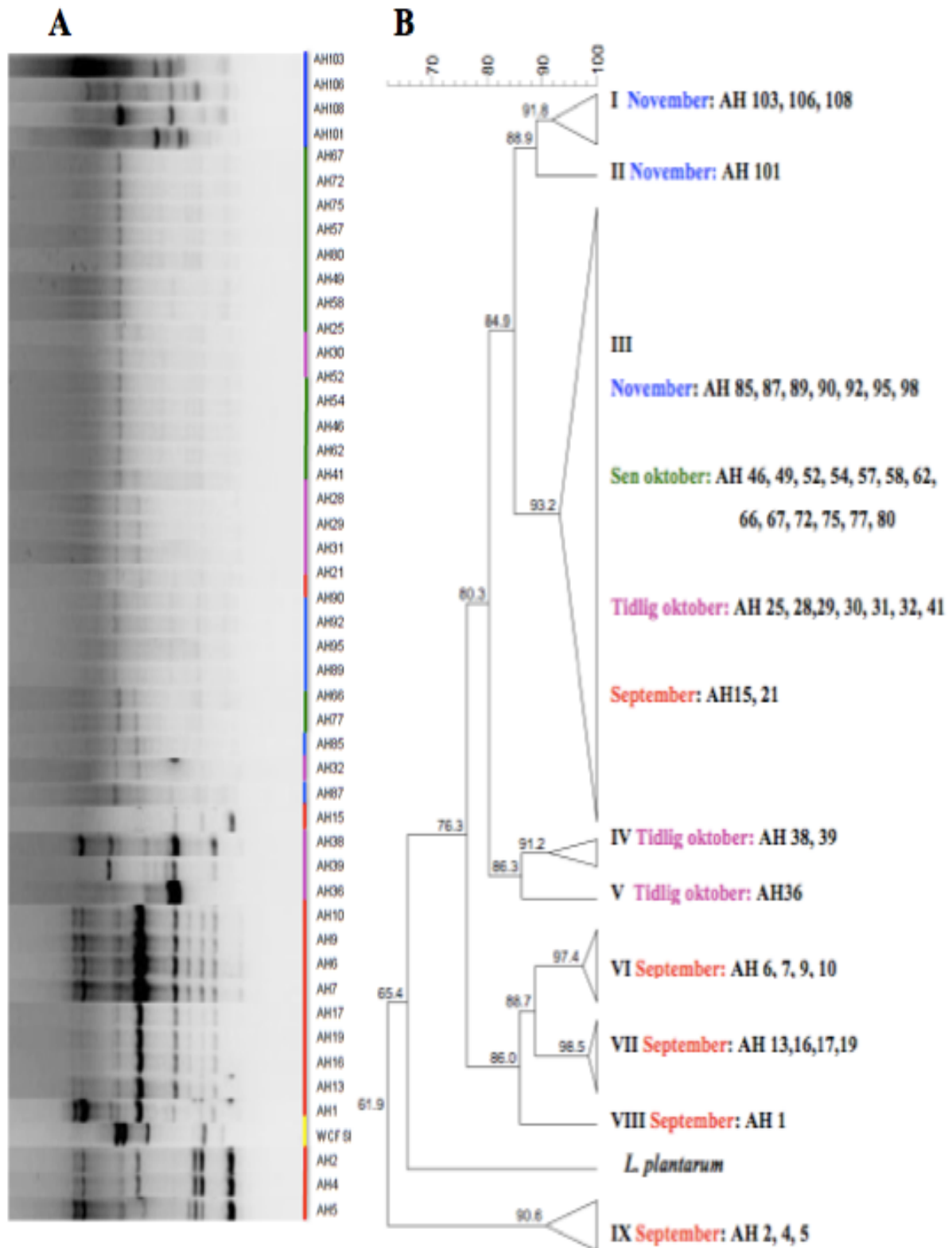
Gruppe III inneholder stammer fra alle månedene benyttet i denne analysen; september, tidlig og sen oktober, og november. Alle stammene fra sen oktober benyttet i studiet inngår i denne gruppen.

Gruppe IV består av en stamme og gruppering V består av to stammer, begge isolert i tidlig oktober.

Gruppering VI, VII, VIII og X er grupperinger kun bestående av en eller flere bakteriestammer isolert i september.

Gruppering IX er starten av dendrogrammet, som består av bakteriestammer fra september.

Referansen, *L. plantarum* er gruppert alene. Gruppering I og II viser størst avstand fra gruppering IX som betyr disse har svært ulikt båndmønster fra rep-PCR.

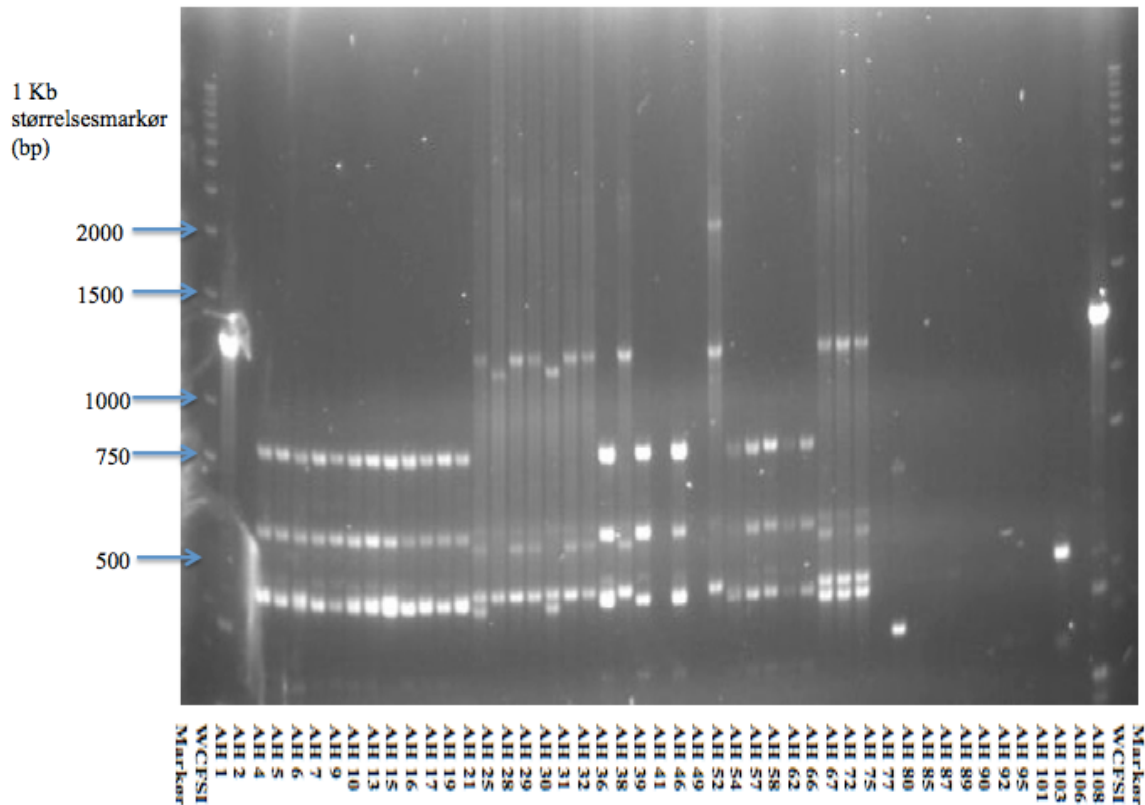


Figur 3.11. GelCompare analysen viser gel bilde av rep-PCR med (GTG)<sub>5</sub> primer(A). Ved 90% likhet er stammene gruppert sammen i dendrogramet (B). *L. kunkeei* stammene fra gel bilde er kodet med farger knyttet til hvilken måned de er isolert fra. (rød= september, rosa= tidlig oktober, grønn= sen oktober, blå= november og gul= WCF SI).



### 3.4.2 Gel bilde og dedrogram av rep-PCR produkt med BOXA1R primer

Komplett gel bilde med størrelsesmarkør er vist i figur 3.12. Enkelte stammer fra rep-PCR med BOXA1 primer ga ikke produkt, i motsetning til (GTG)<sub>5</sub> primeren. Gel bilde viser at *L. kunkeei* stammene har mellom 0-5 fragmenter fra rep-PCR, *L. plantarum* viser 6 bånd på gel bildet.



Figur 3.12. Gel bilde av rep-PCR produktet med BOXA1R primer. En stor andel av *L. kunkeei* stammene viser produkt og *L. plantarum* (WCFSI) viser fragmenter på gel bildet med 1kb størrelsesmarkør (Markør). Blåpilene indikerer størrelsesmarkøren definert i basepar (b

Figur 3.13 viser variasjonsanalysen utført av GelCompare, denne gir et dendrogram med 16 ulike grupperinger av *L. kunkeei* stammene, som ga båndmønstre fra rep-PCR.

De to første gruppene I og II består av bakteriestammer fra sen oktober. Gruppering III, IV og V består av bakteriestammer fra tidlig oktober.

Gruppering VI består av en bakteriestamme fra september og gruppering VII består av en bakteriestamme fra tidlig oktober.

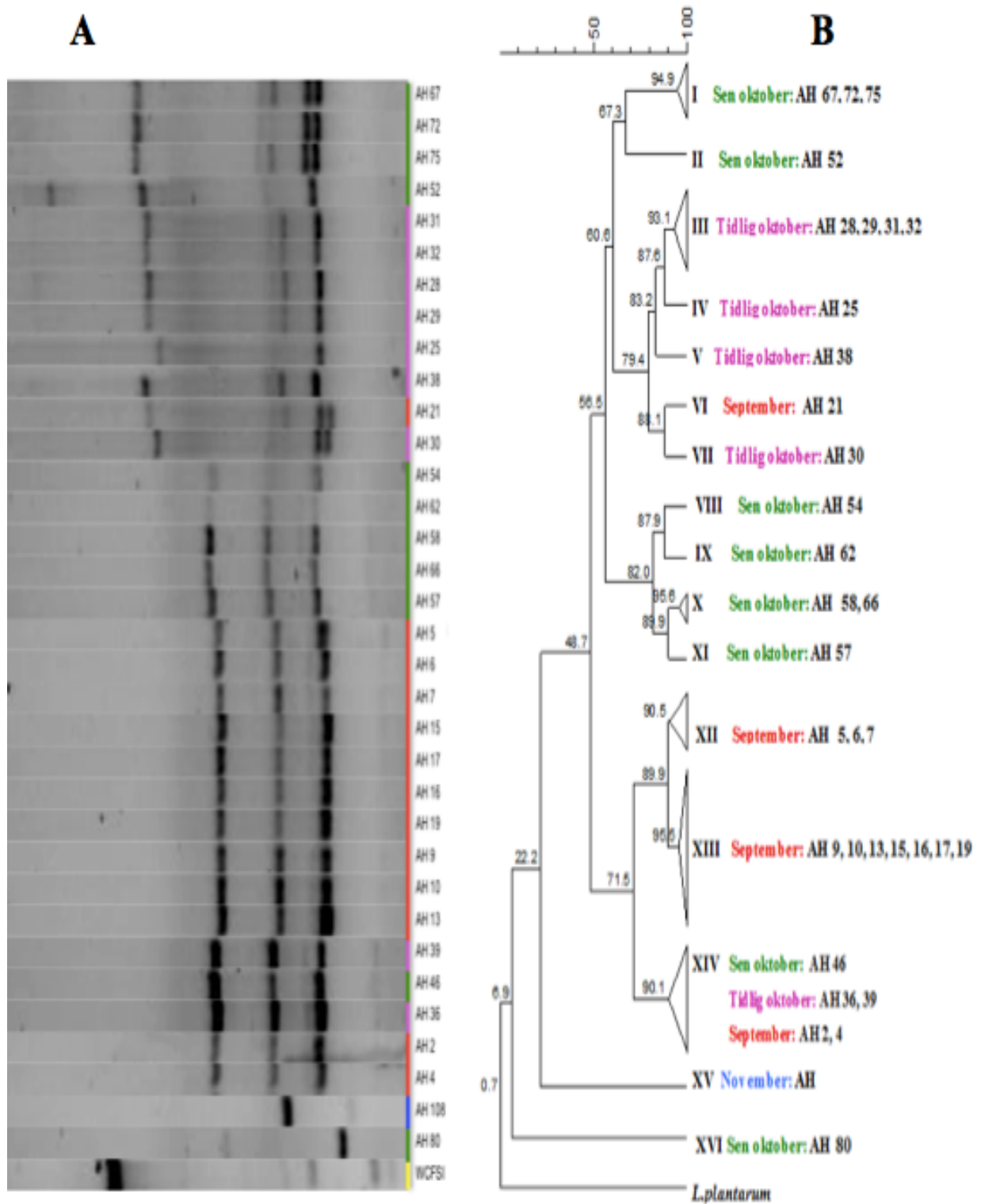
Grupperingene VIII- XI inneholder alle bakteriestammer fra tidlig oktober.

De to neste grupperingene består av bakteriestammer fra september, gruppering XII og XIII.

Gruppering XIV inneholder bakteriestamme fra både sen oktober, tidlig oktober og september.

Avstanden til mange av disse grupperingene er relativt nære, grupperingene XII og XIII har en likhet ved 89,9%, som betyr at ulikhetene mellom bakteriestammene i disse grupperingene er relativt minimale, forhold 90 %.

Som i dendrogramet med (GTG)<sub>5</sub> primer, er *L. plantarum* gruppert alene. Gruppering XV består kun av en bakteriestamme og XVI av en bakteriestamme fra sen oktober. Disse to grupperingene viser en vesentligst avstand til de resterende gruppene, hvor er gruppering I og II, har størst avstand.



Figur 3.13. GelCompare analysen viser gel bilde av rep-PCR med BOXA1 primer(A). Ved 90% likhet er stammene kollapset sammen i dendrogramet (B). *L. kunkei* stammene fra gel bilde er kodet med farger forhold til hvilken måned de er isolert fra. (rød= september, rosa= tidlig oktober, grønn= sen oktober, blå= november og gul= WCFSI)

## 4. Diskusjon

I første del diskuteres resultatene fra overlevelsesanalysen. Her har det vært nødvendig å trekke inn enkelte feilkilder fra optimaliseringen og pilotforsøkene. Det diskuteres hvorvidt disse har hatt en effekt på det endelige resultatet fra Februar og Mars forsøkene. I andre del tas det stilling til hvorvidt det foreligger en diversitet mellom de ulike *L. kunkeei* stammene som ble benyttet i forsøkene.

### 4.1 Effekten av *L. kunkeei* på honningbienes overlevelse.

Resultatene fra overlevelsesanalysen fra Februar og Mars forsøket, viser at én enkelt bakteriestamme fra *L. kunkeei* gav positiv effekt på bienes levetid. De andre signifikante bakteriestammene ga motsatt effekt, levetiden til biene ble ikke forlenget. Tidligere studier viser at melkesyrebakterier isolert fra bier, hvorav *L. kunkeei* er dominerende, har en viktig påvirkning på bakterielle sykdommer som lukket og åpen yngelrute (Forsgren et al. 2010; Vasquez et al. 2012). Dette kan tilsi at *L. kunkeei* kan ha en positiv effekt i bienes tarmsystem. Det er foreløpig ikke kjent hva denne effekten kommer av. De antimikrobielle stoffene som enkelte *Lactobacillus* stammer er kjent for å produsere er ennå ikke dokumentert hos *L. kunkeei* isolert fra bier. Det er påvist at inntak av melkesyrebakterier kan stimulerer immunsystemet til honningbiene (Evans & Lopez 2004).

Enkelte uønskede faktorer forekom og var vanskelig å forutse og kontrollere. Det er derfor nødvendig å ta hensyn til en rekke faktorer ved beskrivelse av dette resultatet. I de neste avsnittene drøftes ulike faktorer og hvilken påvirkning disse kan ha hatt på utfallet av resultatene.

Høye dødsrater ble observert i pilotforsøket der hvor behandlingen besto av MRS medium supplert med sukkerløsning av sukrose og fruktose. Dette viser at behandlingen kan ha en toksisk effekt på honningbiene. Det ble observert 49% høyere mortalitet ved bruk av behandling bestående hovedsakelig av MRS medium i forhold til behandling kun bestående av sukkerløsning. Ettersom det ble observert svært lav mortalitet, og en signifikant effekt av disse behandlingene på biene antas det at små mengder MRS medium i disse behandlingene

ikke har hatt en påfallende negativ effekt på biene. På bakgrunn av denne antagelsen ble det i fortsettelsen valgt å benytte kun sukkerløsning (15%(v/v) sukrose og 1%(v/v) fruktose). Vekstforsøket viste at levende bakterier var tilstede i løsningen, men det viste ikke en eksponentiell vekst, refereres til tabell 3.5 B.

Lekkasje av behandlingsløsningen fra rørene var en annen utfordring som antas å ha påvirket de høye dødsratene av bier. Dette ble observert i alle utførte forsøk og viste seg å være vanskelig å avverge.

Observasjonene fra denne konstruerte lekkasje viste at første lekkasje, dag 4(t=96), hadde liten påvirkning på bienes mortalitet. Dette kan bety at biene klarer og fjerner løsningen som er inne buret i de påfølgende dagene. Andre lekkasje viste en 35% reduksjon av bier og 50% reduksjon av den totale mortaliteten til biene. Dette kan bety at det ved et lavere antall bier i buret og en økning i antall lekkasjer, dannes en opphopning av løsning inne i buret som biene ikke klarer å få fjernet. Observasjonene viser at store mengder lekket løsning kan føre til at biene får sukkerløsningen på vingene, noen som resulterer i at de ikke klarer å bevege seg rundt i buret.

Resultatet av dette er tidligere bidedød enn antatt og tilsier at biene ikke takler utfordringer som øker dødeligheten i buret. Dette er en faktor som må tas med i betraktningen ved observasjon av mortaliteten. Som et resultat av dette ble flere behandlinger ekskludert fra overlevelsesanalysen for å hindre at de statistiske analysene ble basert på misvisende observasjoner.

Blant disse ble referansebakterien *L. plantarum* og det ene kontrollburet fra Mars forsøket fjernet. Dette forårsaket at en undersøkelse av hvordan bienes levetid forholder seg til en fremmed *Lactobacillus* art, som *L. plantarum* i forhold til *L. kunkeei*, ikke kunne gjennomføres.

Det er nærliggende å anta at lekkasjens påvirkning kunne blitt redusert dersom døde bier hadde blitt fjernet fra burene underveis i forsøket. Siden risikoen for at biene flyktet ut av buret var høy ved fjerning av døde bier, ble en slik prosedyre ikke gjennomført.

Før inkubering ble det observert døde bier i enkelte bur. Dette kan være et resultat av stressfaktorer som temperatur, alder, innsamling av bier, og transport. Det kunne ha vært en

fordel og inkubert biene i 24 timer og kun behandle de med sukkerløsning før de ble eksponert mot ulike *L. kunkeei* stammer i behandlingsløsningene. På den måten nullstilles biene og alle biene stiller med samme utgangspunkt.

Det ble i forsøket valgt å bruke vinterbier, det vil si bier som klekkes på høsten. Disse biene overvintrer og har ikke tilgang på nektar og pollen, men blir foret med en sukkerløsning av en ansvarlig birøkter som en del av innvintringen av biene. Det er dokumentert at konsentrasjonen av melkesyrebakterier er svært lav eller fraværende i de siste vintermånedene, i forhold til hva som er vist hos sommerbier (Olofsson & Vasquez 2008). Som en del av innvintringen ble kubene behandlet med maursyre ( $\text{CH}_2\text{OH}_2$ ) mot *Varroa destructor* som både angriper yngelceller og voksne bier. Denne midden, *V. destructor*, endrer fysiologien til biene og er slik en årsak til at noen biekolonier ikke overlever vinteren (Amdam et al. 2004). Derfor er vinterbiene best egnet til å undersøke om *L. Kunkeei* har en påvirkning på bienes levetid, siden de både har en mulig fraværende bakterieflora og redusert fysiologi.

Antallet bier ble redusert fra 60 i hvert bur under pilotforsøkene, til 40 bier under Februar og Mars forsøket. Dette skal ikke ha påvirket effekt på utfallet av undersøkelsene.

Ved å sette fokus på disse faktorene kan det stilles spørsmål til om resultatene er pålitelige, siden dette har stor påvirkning på overlevelsesraten til biene. Resultatene er basert på ett forsøk som er gjentatt, men ideelt burde dette blitt utført parallelt og ikke i to ulike måneder, som var tilfellet i dette studiet. Dette er særlig viktig i forhold til temperaturendringene som ble observert under forsøkene Februar og Mars. Siden temperaturen lå over  $0^\circ\text{C}$  kan dette ha ført til at biene begynte å sverme tidligere og dermed resulterte i at biene fløy ut av kubene. Dette er uønsket situasjon ettersom vinterbiene i utgangspunktet skal oppholde seg inne i kubene. Det kan føre til at biene som flyr ut tidlig ble utsatt for stress som kulde noe som igjen kan redusere bienes levetid. Det ble i Mars registret en høyere dødelighet blant biene sammenlignet med Februar. Dette kan komme av at bies levetid går mot slutten. Å gjennomføre forsøkene på biene på samme tidspunkt ville derfor vært ideelt. Ettersom flere av behandlingene ble ekskludert burde det ha blitt satt opp færre behandlinger hvor dette enklere kunne kontrolleres.

Om disse uønskede faktorene som her er beskrevet ikke forekom i forsøket, og *L. kunkeei* stammene ga positiv effekt, kunne det ha antydnet at bakterien fører til en forlengelse av bienes levetid.

Dette er en tidkrevende prosess som involverer mange forsøksdyr. Det er i tillegg stor sannsynlighet for at uønskede faktorer påvirkende sluttresultatet.

## 4.2 Diversitet analyse

Studier ved bruk av rep-PCR med (GTG)<sub>5</sub> primer produserer båndmønstre med høyere kompleksitet og et høyere antall båndmønstre visualisert fra PCR produktet. Dette er vist seg å være en suksessfull og pålitelig metode ved bestemmelse av slektskap mellom *Lactobacillus* fra ulike kilder (Gevers et al. 2001; Porcellato et al. 2012; Svec & Sedlacek 2008). Det er fra tidligere studier med rep-PCR vist at (GTG)<sub>5</sub> og BOXA1R primerne gir flere bånd i forhold til de andre rep-PCR primerne (Mohapatra et al. 2007). På grunnlag av dette ble kun (GTG)<sub>5</sub> og BOXA1R primerne benyttet.

Dette studiet viste at (GTG)<sub>5</sub> primeren ga et båndmønster fra elektroforesen på alle bakteriestammene samt flere bånd enn med BOXA1R primeren, og viser derfor at (GTG)<sub>5</sub> primeren er bedre egnet til å differensiere mellom bakteriestammene. Dette betyr at *L. kunkeei* stammene inneholder repeterte sekvenser med ulik basepar lengde, hvor (GTG)<sub>5</sub> sekvensen er dominerende i forhold til innhold av repeterte BOX sekvensen. Flere bakteriestammer ga ikke produkt med BOXA1R primeren, som kan bety at disse ikke inneholder BOX sekvensen. Det kan også skyldes andre feilkilder som for eksempel blandingsforholdene i reaksjonsmiksen. Ettersom de sammen prøvene av genomisk DNA fra bakteriestammene ble benyttet ved begge rep-PCR reaksjonene, er ikke dette årsaken til fraværende båndmønstre fra elektroforesen.

Fra variasjonsanalysene, figur 3.10 og 3.13, er det tydelig at det er store forskjeller mellom hvordan bakteriestammene er separert i dendrogrammene. Det som kan observeres ved begge analysene er at referansen av *L. plantarum* blir gruppert alene med en tydelig avstand fra de resterende grupperingene.

Fra studiet av *L. kunkeei* stammenes genetiske variasjon tas det utgangspunkt i resultatet fra rep-PCR med GTG<sub>5</sub> primer ettersom dette viste å gi en fullstendig og suksessfull differensiering av bakteriestammene. Resultatet viser at *L. kunkeei* stammene i gruppering IX; AH 2, AH 4 og AH 5 har en stor avstand til bakteriestammene i gruppering I; AH 101,106 og 108. Ut i fra dette kan det fastslås at det foreligger en diversitet mellom bakteriestammene som er avhengig av hvilken måned de er isolert i. Resultatene viser også variasjon mellom bakteriestammer isolert i september i forhold til de som er isolert i november. Gruppering III viste at bakteriestammer isolert i tidlig og sen oktober viser svært liten variasjon i forhold til hverandre. Dette kan komme av at de er isolert innen samme måned. Det kan antas at det oppstår endringer av *L. kunkeei* i tarmen til biene fra sommer til vinterperioden. Det er også variasjon mellom stammene isolert i samme måned. Enkelte av stammene fra september er gruppert med avstand til hverandre, men som igjen viser større avstand til de resterende stammene. Forklaringene på at bakteriestammene fra september er separert kan muligens komme av at biene forberedes til innvintring. Det ble tilført sukkerløsning, temperaturene sank og trekkbiene hadde ikke mulighet til å høste nektar og pollen.

I denne analysen er det valgt å benytte 90% likhet, da bakteriestammer med høyere prosentandel grupperes sammen fordi variasjonene her er minimale. Denne prosentandelen som benyttes i statistikken er subjektiv og den er i tillegg avhengig av hvor god differensiering som ønskes ut av analysen.

### 4.3 Oppsummering og videre arbeid

I dette studiet er det demonstrert at *L. kunkeei* stammer som er isolert fra honningbienes tarm, kan gi både positiv og negativ effekt på bienes levetid. Bakteriestamme AH 19 isolert i september måned har en positiv effekt på bienes levetid, mens bakteriestamme AH10 isolert i september har en negativ effekt. Bakteriestamme AH106 isolert i november har en tydelig negativ effekt. Dette betyr ikke bare at det er forskjeller mellom månedene bakteriestammene er isolert i, men at det også er påvist forskjeller innad i en og samme måneden.

Ettersom det gjennom undersøkelsen ble avdekket mange uønskede feilkilder, anbefales det at undersøkelsen uføres gjentatte ganger, før det trekkes tydeligere konklusjoner av effekten *L. kunkeei* har på honningbiene overlevelse. Om *L. kunkeei* viser seg å gi positiv effekt på



bienes levetid fra gjentakende observasjoner, kan det være en mulighet å tilføre *L. kunkeei* bakterier til sukkerløsningen biene blir gitt ved innvintring. Studiet av *L. kunkeei* stammenes genom diversitet bekrefter at det foreligger variasjon mellom bakteriestammene isolert i september sammenlignet med bakteriestammene isolert i november.

Ut fra disse konkluderende resultatene kan det være interessant å undersøke variasjonen blant flere bakteriestammer. Dette kan gi et bedre overblikk av genom diversiteten til *L. kunkeei* i bienes tarmflora.

## Referanser

- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A. & Omholt, S. W. (2004). Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera : Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari : Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*, 97 (3): 741-747.
- Amdam, G. V., Aase, A., Seehuus, S. C., Fondrk, M. K., Norberg, K. & Hartfelder, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40 (12): 939-947.
- Claesson, M. J., van Sinderen, D. & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *Fems Microbiology Letters*, 269 (1): 22-28.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., et al. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318 (5848): 283-287.
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. & Neumann, P. (2012). Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *Plos One*, 7 (2).
- Davis, C. F. (2004). *The Honey Bee inside out*.  
utg. Great Britain: Bee Craft Limited. 149 s.
- Edwards, C. G., Haag, K. M., Collins, M. D., Hutson, R. A. & Huang, Y. C. (1998). *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (5): 698-702.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y. & Dicks, L. M. T. (2009). Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Systematic and Applied Microbiology*, 32 (8): 593-600.
- Engel, P., Martinson, V. G. & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (27): 11002-11007.
- Engel, P. & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *Fems Microbiology Reviews*, 37 (5): 699-735.

- Evans, J. D. & Lopez, D. L. (2004). Bacterial Probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97 (3): 752-756.
- Evans, J. D. & Schwarz, R. S. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19 (12): 614-620.
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vasquez, A. & Fries, I. (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie*, 41 (1): 99-108.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D. & Marrs, C. F. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic perspectives & innovations : EP+I*, 2: 10-10.
- GelCompare II*. (2013). Tilgjengelig fra: <http://www.applied-maths.com/gelcompar-ii> (lest 02.12.13).
- Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (1): 87-97.
- Gevers, D., Huys, G. & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *Fems Microbiology Letters*, 205 (1): 31-36.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees (vol 155, pg 1, 1997). *Fems Microbiology Letters*, 157 (1): 219-219.
- Giraffa, G., Chanishvili, N. & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161 (6): 480-487.
- Jeyaprasanth, A., Hoy, M. A. & Allsopp, M. H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta : Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84 (2): 96-103.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. & Clark, D. (2012). *Brock biology of microorganisms*. 13 utg. San Francisco, CA: Pearson Education.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (42): 15611-15616.
- Martinson, V. G., Moy, J. & Moran, N. A. (2012). Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (8): 2830-2840.

- Mohapatra, B. R., Broersma, K. & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *Fems Microbiology Letters*, 277 (1): 98-106.
- Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E. & Sabree, Z. L. (2012). Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *Plos One*, 7 (4).
- Neveling, D. P., Endo, A. & Dicks, L. M. T. (2012). Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* Isolated from Fresh Flowers, Bees and Bee-hives. *Current Microbiology*, 65 (5): 507-515.
- Olofsson, T. C. & Vasquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57 (4): 356-363.
- Porcellato, D., Ostlie, H. M., Liland, K. H., Rudi, K., Isaksson, T. & Skeie, S. B. (2012). Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norwegian cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of Dairy Science*, 95 (9): 4804-4812.
- Rangberg, A., Diep, D. B., Rudi, K. & Amdam, G. V. (2012). Paratransgenesis: An Approach to Improve Colony Health and Molecular Insight in Honey Bees (*Apis mellifera*)? *Integrative and Comparative Biology*, 52 (1): 89-99.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., et al. (1998). Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44 (1-2): 93-106.
- Schneider, M. & deBruijn, F. J. (1996). Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12 (2): 163-174.
- Seeley, T. D. (1995). *The Wisdom of the Hive*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 295 s.
- StatSoft, Electronic Statistics Textbook*. Tilgjengelig fra:  
<http://www.statsoft.com/Textbook/Survival-Failure-Time-Analysis/button/2> (lest 02.12.13).
- Stephenson, D. P., Moore, R. J. & Allison, G. E. (2009). Comparison and Utilization of Repetitive-Element PCR Techniques for Typing *Lactobacillus* Isolates from the Chicken Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (21): 6764-6776.

- Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36 (1): 1-29.
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A. & Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48 (3): 229-243.
- Svec, P. & Sedlacek, I. (2008). Characterization of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolated from surface waters. *Folia Microbiologica*, 53 (1): 53-56.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3189-3194.
- Turkova, K., Rittich, B. & Spanova, A. (2012). Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. *Chemical Papers*, 66 (9): 842-851.
- vanEngelsdorp, D. & Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S80-S95.
- Vasquez, A., Olofsson, T. C. & Sammataro, D. (2009). A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA - A comparison with bees from Sweden. *Apidologie*, 40 (1): 26-28.
- Vasquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L. & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *Plos One*, 7 (3).
- Versalovic, J., Schneider, M., deBruijn, F. J. & Lupski, J. R. (1994). Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. 6. utg. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 841 s.
- Xiong, J. (2006). *Essential bioinformatics*. New York: Cambridge University Press. 339 s.

## Vedlegg 1: Bakteriestammer

Bakteriestammene som ble benyttet i studiet er gitt i tabell V1-1. Det er 52 *L. kunkeei* stammer som er isolert fra honningbiene i ulike måneder; enten september, tidlig oktober, sen oktober, november eller desember. En *L. plantarum* (WCFSI) stamme inkluderes som referanse.

**Tabell V1-1. Oversikt over bakteriestammene fra *L.kunkeei*(AH) benyttet i studiet.**

Bakterie- stamme	Måned isolert	Bakterie- stamme	Måned isolert
<b>AH 1</b>	September	<b>AH 52</b>	Sen oktober
<b>AH 2</b>	September	<b>AH 54</b>	Sen oktober
<b>AH 4</b>	September	<b>AH 57</b>	Sen oktober
<b>AH 5</b>	September	<b>AH 58</b>	Sen oktober
<b>AH 6</b>	September	<b>AH 59</b>	Sen oktober
<b>AH 7</b>	September	<b>AH 62</b>	Sen oktober
<b>AH 9</b>	September	<b>AH 64</b>	Sen oktober
<b>AH 10</b>	September	<b>AH 66</b>	Sen oktober
<b>AH 13</b>	September	<b>AH 67</b>	Sen oktober
<b>AH 15</b>	September	<b>AH 72</b>	Sen oktober
<b>AH 16</b>	September	<b>AH 74</b>	Sen oktober
<b>AH 17</b>	September	<b>AH 75</b>	Sen oktober
<b>AH 19</b>	September	<b>AH 77</b>	Sen oktober
<b>AH 21</b>	September	<b>AH 80</b>	Sen oktober
<b>AH 25</b>	Tidlig oktober	<b>AH 85</b>	November
<b>AH 28</b>	Tidlig oktober	<b>AH87</b>	November
<b>AH 29</b>	Tidlig oktober	<b>AH89</b>	November
<b>AH 30</b>	Tidlig oktober	<b>AH 90</b>	November
<b>AH 31</b>	Tidlig oktober	<b>AH 92</b>	November
<b>AH 32</b>	Tidlig oktober	<b>AH 95</b>	November
<b>AH 36</b>	Tidlig oktober	<b>AH 101</b>	November
<b>AH 38</b>	Tidlig oktober	<b>AH 103</b>	November
<b>AH 39</b>	Tidlig oktober	<b>AH 106</b>	November
<b>AH 41</b>	Tidlig oktober	<b>AH 108</b>	November
<b>AH 46</b>	Sen oktober	<b>AH 112</b>	Desember
<b>AH 47</b>	Sen oktober	<b>AH 114</b>	Desember

## Vedlegg 2: Løsninger

### Medier

#### MRS(deMan-Rosa.-Sharpe) medium:

52g/L MRS buljong(oxid). Denne løsningen blir autoklavert i 15 min. Etter autoklaveringen ble det tilsatt fruktose til en sluttkonsentrasjon på 1% (v/v).

For å lage MRS agar tilsettes det 15g/L agar før autoklaving.

### Buffere

#### Loading buffer (6x) for agarose gel elektroforese:

40% (v/v) sukrose, 5mM EDTA og en spatelspiss med bromfenolblå.

#### 50x TAE( Tris Acetic EDTA) buffer:

242g Tris base, 57,1ml iskald eddiksyre, 18,7g EDTA løst i 900 ml dH<sub>2</sub>O, volumet ble justert til 1l. 50x TAE ble fortynnet til 1x før bruk.

### Andre løsninger

#### Agarose gel

Det ble benyttet 1% (v/v) TAE-agarose geler, som ble tillaget ved å løse 0,5 g agarose i 50 ml TAE buffer. For å få en homogen løsning varmes den i mikrobølgeovn(merke) Det tilsettes 2 µl etidiumbromid før bruk.

#### dNTP 10mM løsning

10 µl dATP

10 µl dCTP

10 µl dGTP

10 µl dTTP

60 µl sterilt vann

Sukkerløsninger

15 % (v/v) Sukrose: 75 g krystallisert sukrose løst opp i 500 ml dH<sub>2</sub>O.

40 % (v/v) D-Fruktose: 200 g krystallisert D-fruktose løst opp i 500 ml dH<sub>2</sub>O.

Reagensrør med sukkerløsning består av 10 ml 15% (v/v) sukrose og 250 µl av 40% D-fruktose, som ut gjør ~ 1% (v/v) fruktose. Rørene autoklaveres i 15 min.

Størrelsesmarkør (DNA) (1kb)

Konsentrasjon 50ng/ml

167 µl Loading buffer

50 µl Størrelsesmarkør 1kb ladder, New England Biolabs

783 µl dH<sub>2</sub>O

Oppbevares ved 4°C



## Vedlegg 3: Kjemikalier, enzymer, primere og kommersielle kit

### Kommersielle kit

Sigma GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit      Leverandør: Sigma-Aldrich

Gram-Positiv Lysis Solution

Lysosyme solution

RNase A solution

Proteinase K

Lysis Solution C

Colum Preperation Solution

Wash Solution 1

Wash Solution Consenstrate

Elution Solution (10 mM Tris- HCL, 0.5 med mer EDTA, pH 9.0)

Collection tubes, 2 ml

GenElute Nucleic Acid Binding Colums (rød ring)

### Enzymer

**Tabell V3-1. Enzymer benyttet i studiet. Deres reaksjonsbetingelser er gitt i tabell.**

	Aktivitet	Leverandør
DNA Taq polymerase	DNA polymerase	Invitrogen
Lysozyme	Katalyserer kløyving av peptidoglykan i celleveggen til Gram-positive bakterier	Sigma
Mutanolysin	Katalyserer kløyving av peptidoglykan i celleveggen til Gram-positive bakterier	Sigma
Proteinase K	Bryter ned proteiner	Sigma
RNase A	Bryter ned RNA	Sigma

## Kjemikalier

Tabell V3-2. Kjemikalier benyttet i studiet.

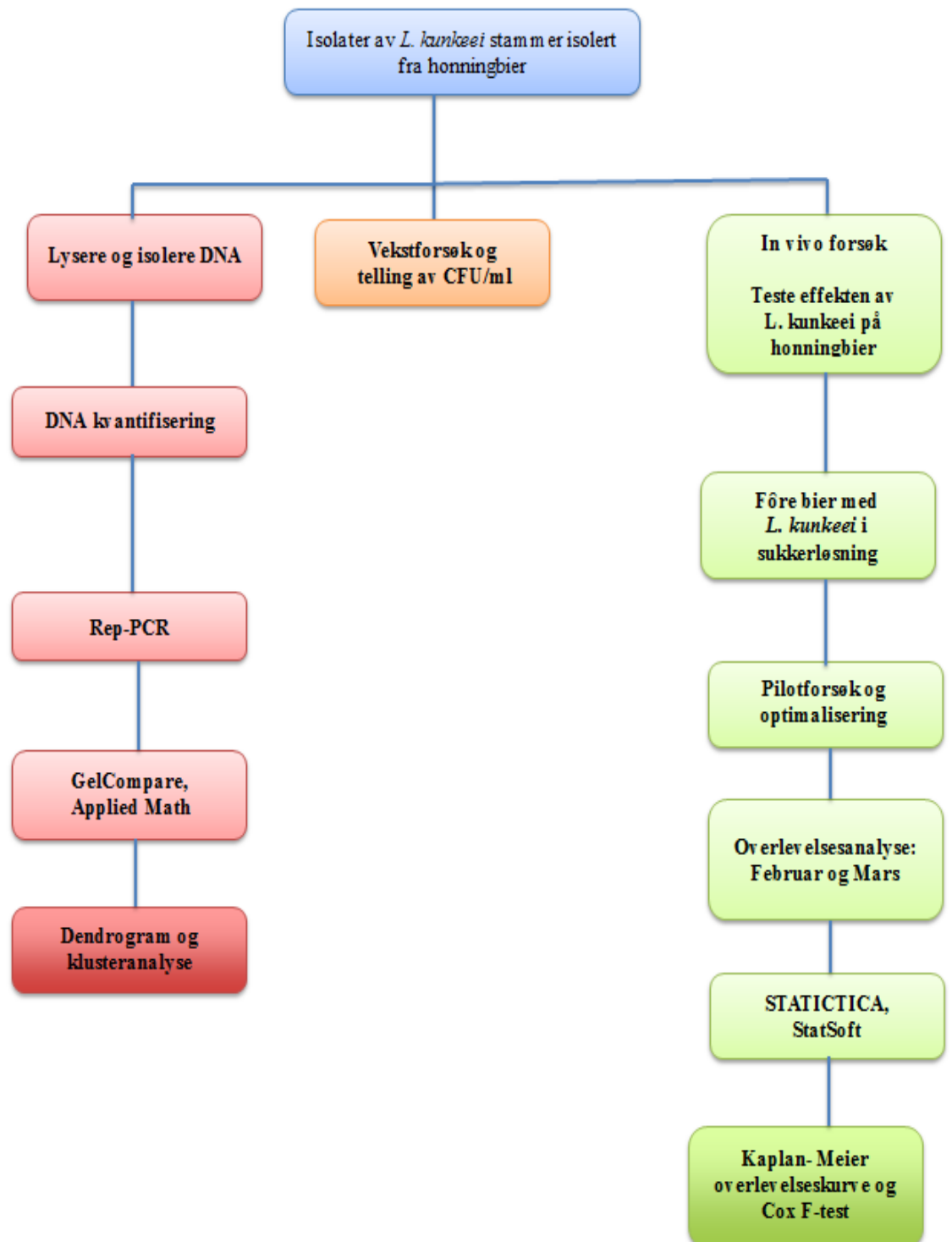
Kjemikalier	Leverandør
Agar	Merck
Agarose Ultra	Pure
Bromfenol blå	Sigma
dNTPs (dATP, DCTP, dGTP og dTTP)	Invitrogen
Eddiksyre	Merck
EDTA	Merck
Etanol	Merck
Etidiumbromid	Invitrogen
D-Fruktose	Merck
Glyserol	Sigma
MRS buljong	Oxoid
Sukrose	Merck
Trizma base	Merck
Solution Q	Invitrogen
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen
PCR buffer	Invitrogen
Q solution	Qiagen

## Oligonkleotider

Tabell V3-3. Primere benyttet ved rep-PCR.

Navn	Sekvens
GTG <sub>5</sub>	5'- GTG GTG GTG GTG GTG-3'
BOXA1R	5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

## Vedlegg 4. Flytskjema



Figur V4-1. Flytskjema viser prosessen i studiet. Grønne bokser viser utførelsen av forsøk med bier, *in vivo*. Røde bokser viser utførelsen av genomdiversitet. Oransje bokse viser vekstforsøk

## Vedlegg 5: Resultater

### Isolering av genomisk DNA

I tabell V5-1, er DNA konsentrasjon og absorpsjonsmålingene fra isolerte bakteriestammene benyttet i rep-PCR listet opp. En ønsket konsentrasjon for rent DNA er mellom en ratio: 1,8-2,0

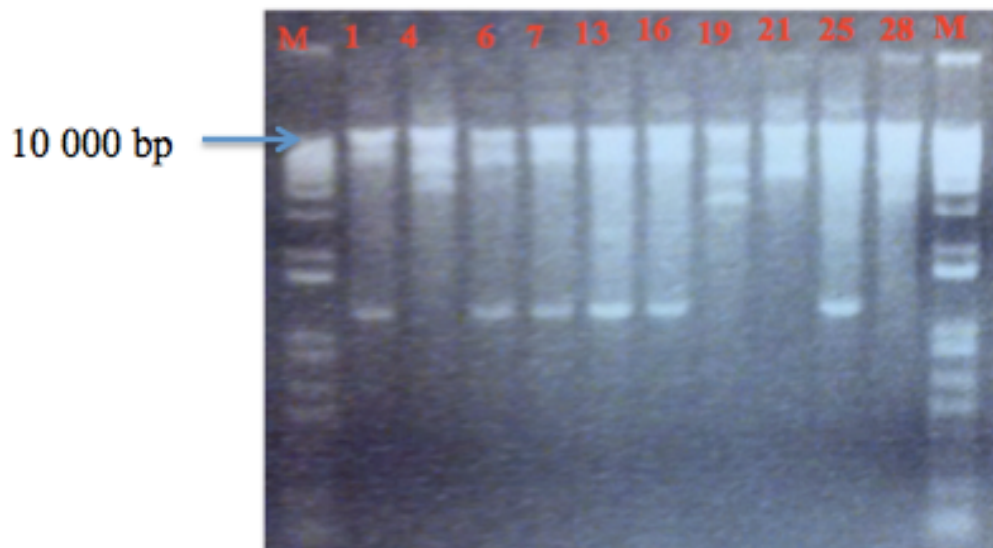
**Tabell V5-1. DNA konsentrasjon (ng/ul) og grad av renhet (OD<sub>260/280</sub>) fra *L.kunkeei*(AH) stammer og en *L.plantarum* stamme(WCFSI)**

Bakterie- stamme	DNA (ng/μl)	OD 260/280	Bakterie- stamme	DNA (ng/μl)	OD 260/280
AH 1	32.2	2.00	AH 46	29.8	1.91
AH 2	37.3	1.93	AH 52	22.7	1.98
AH 4	17.4	1.81	AH 54	16	1.91
AH 5	40.4	1,84	AH 57	30.7	1.95
AH 6	20.1	1.88	AH 58	129	1.92
AH 7	17.7	1.98	AH 62	8.9	1.98
AH 9	33.4	1.95	AH 64	84.5	1.93
AH 10	43.5	1.89	AH 66	32.3	1.88
AH 13	55.3	1.96	AH 67	39.7	1.91
AH 15	11.4	1.86	AH 72	39.4	1.94
AH 16	31	1.83	AH 75	19.6	1.91
AH 17	19.3	2.00	AH 77	19	1.91
AH 19	48.7	1.88	AH 80	21.1	2.0
AH 21	17.2	1.82	AH 85	13.5	2.0
AH 25	16.7	1.87	AH 87	16.5	1.85
AH 28	67	1.84	AH 89	20.0	1.95
AH 29	34.3	1.88	AH 90	9.5	2.0
AH 30	22.3	1.86	AH 92	15.7	1.83
AH 31	53.9	1.96	AH 95	67.0	1.80
AH 32	31.9	1.83	AH 101	194.7	1.92
AH 36	50	1.89	AH 103	70	1.94

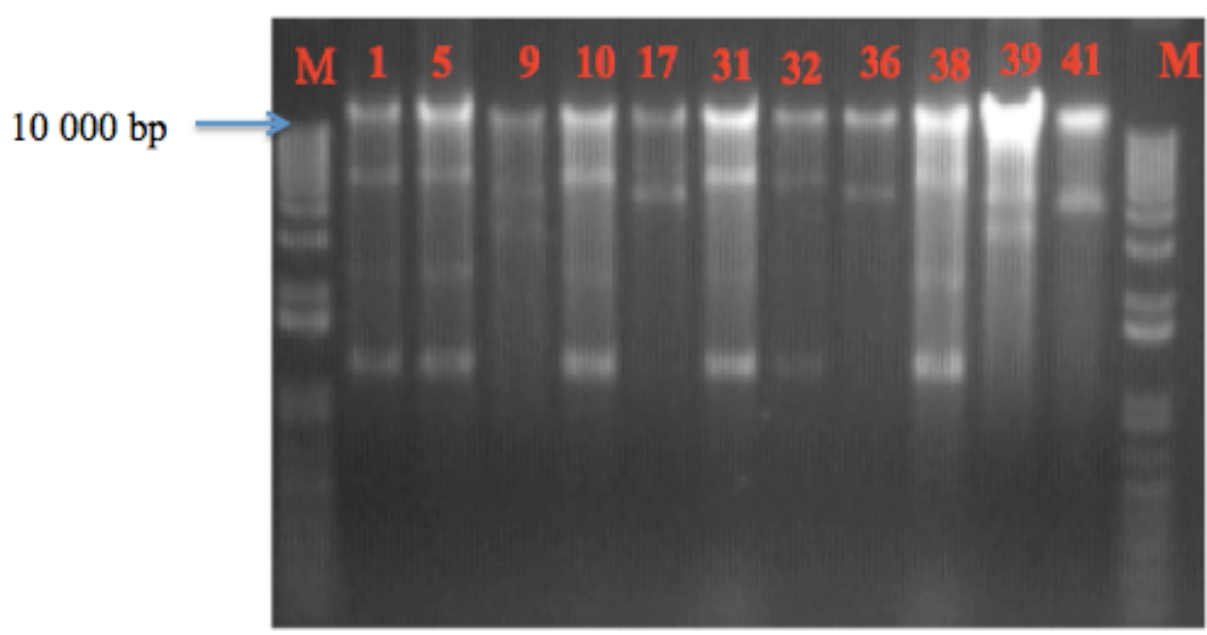
<b>AH 38</b>	55.5	1.86	<b>AH 106</b>	35,9	1.94
<b>AH 39</b>	15.4	1.70	<b>AH 108</b>	124.2	1.88
<b>AH 41</b>	41.4	1.99	<b>WCFSI</b>	596	1.87

### Bekreftelse av tilstedeværelsen av genomisk DNA

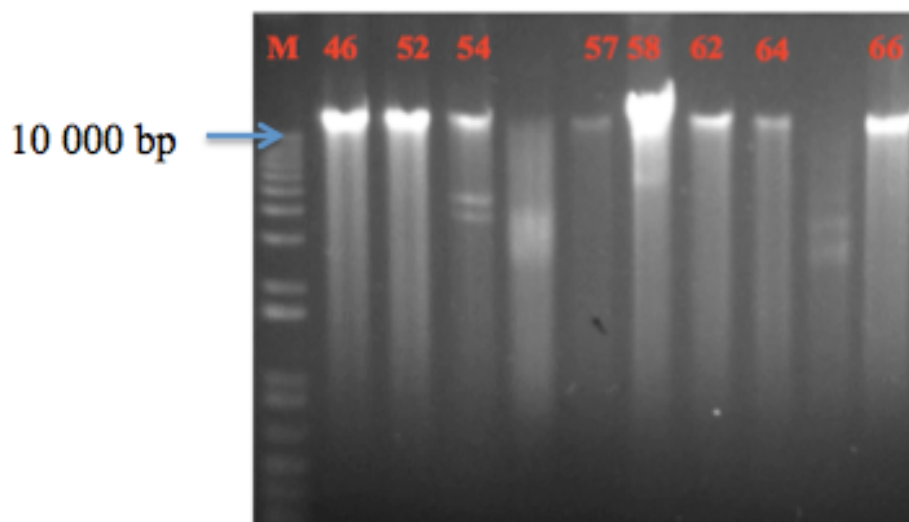
Bekreftelse av isolert genomisk DNA applisert på gel hadde en konsentrasjon mellom 9-50 ng/ $\mu$ l, med 1kb størrelsesmarkør (M). En vellykket isolering av genomisk DNA fra 47 ulike *L. kunkeei* stammer er vist i figur V.



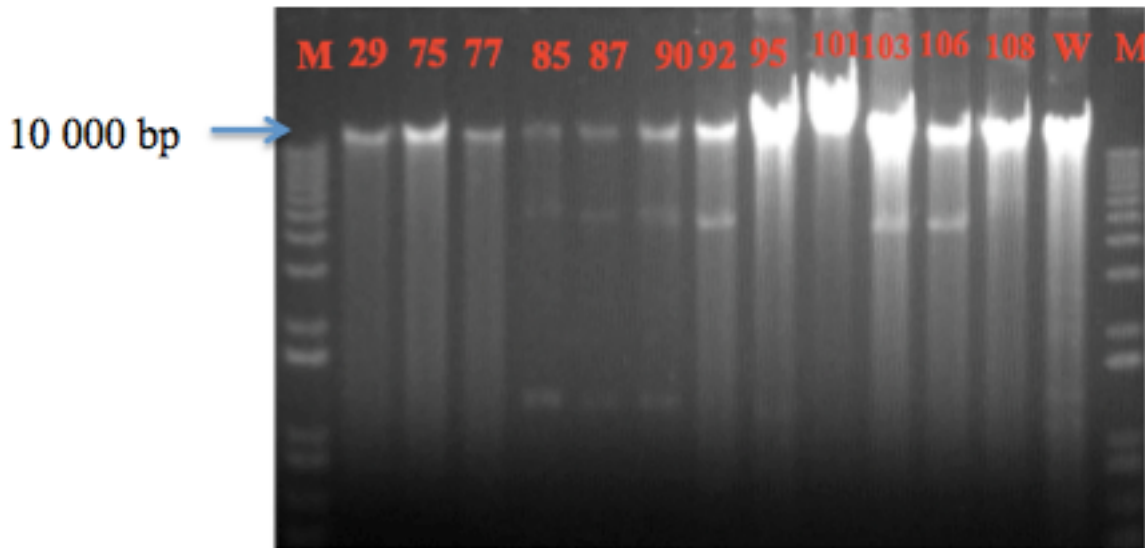
**Figur V5-1. Gel bildet visualiserer isolert genomisk DNA av *L. kunkeei* stammer(nummerert med tall). Båndet ved 10,000 bp, viser en vellykket isolering av genomisk DNA.**



Figur V5-2. Gel bilde visualiserer vellykket isolering av genomisk DNA ved 10 000 bp, fra ulike *L. kunkeei* stammer fra september og tidlig oktober. Bildet viser også andre fragmenter, mellom 500-10 000 bp.



Figur V5-3. Gel bildet visualiserer isolert genomisk DNA av *L. kunkeei* stammer (nummerert med tall). Båndet ved 10,000 bp, viser en vellykket isolering av genomisk DNA.



Figur V5-4. Gel bildet visualiserer isolert genomisk DNA av *L.kunkeei* stammer (nummerert med tall) og en *L.plantarum*, WCFSI (W). Båndet ved 10,000 bp, viser en vellykket isolering av genomisk DNA.

### Cox F-test av pilotforsøk med behandling av sukkerløsning

I tabellen nedenfor viser resultatet fra Cox F-test, utført på pilotforsøket. Disse viser hvilke av bakteriestammene som ga signifikant effekt i hvert av replikantene, markert med røde stjerner. Det er ulikheter mellom replikantene i forhold til hvor det foreligger signifikant effekt.

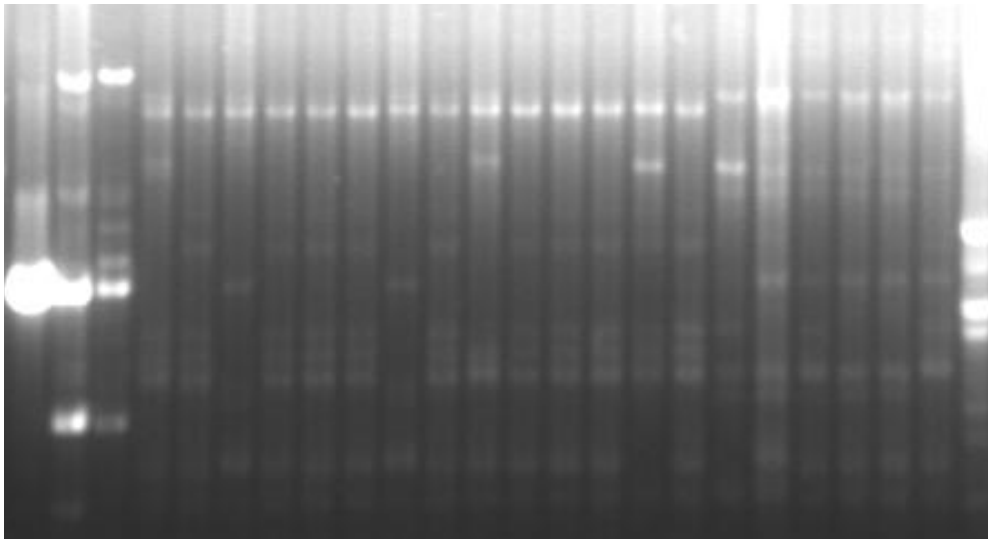
Tabell V5-2. Viser p-verdiene for de tre separate replikantene fra pilotforsøket.

Stamme	AH 28	AH47	AH59	AH114	WCFSI
Replikant 1	0,054	0,081	**	**	0,119
Replikant 2	0,444	*	*	0,052	***
Replikant 3	0,395	0,077	0,349	0,237	**

p-verdi: 0,05\* 0,01\*\* 0,001

### Rep-PCR produkt fra gel elektroforese med (GTG)<sub>5</sub> primer

Vist i figur V5-5 viser et utsnitt av det fullstendige gel bilde fra elektroforese av rep-PCR med (GTG)<sub>5</sub> primer. Dette er for å vise båndene enkelte bånd som ikke er like tydelige på det fullstendige gel bilde, figur 3.10



Figur V5-5. Utsnitt av den fullstendige bilde, figur 3.10. Dette viser tydeligere enkelte bånd som er tilstede.



## Vedlegg 6. Protokoll

### Sigma Aldrich GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit

#### Product Description

Sigma's GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit provides a simple and convenient way to isolate pure DNA from a variety of cultured bacteria. The kit contains all of the reagents needed to isolate and purify genomic DNA from gram-negative bacteria. For most gram-positive bacteria, the kit must be used in conjunction with the optional lysozyme (**L4919**), to effectively lyse the thick peptidoglycan cell walls. A Gram-Positive Lysis Solution is provided as a diluent for preparing the lysozyme stock solutions.

The GenElute kit combines the advantages of a silica-based system with a microspin format and eliminates the need for expensive resins, alcohol precipitation, and hazardous organic compounds such as phenol and chloroform. The bacteria are lysed in a chaotropic salt-containing solution to ensure the thorough denaturation of macromolecules. The addition of ethanol causes the DNA to bind when the lysate is spun through a silica membrane into a microcentrifuge tube. After washing to remove the contaminants, the DNA is eluted in 200 µL of a Tris-EDTA solution.

The expected yield of genomic DNA will vary depending on the cell density of the bacterial culture and the bacterial species and strain used. Appendix 2 lists the typical yield of genomic DNA purified from some gram-negative and gram-positive bacteria. DNA purified with the GenElute kit has an  $A_{260}/A_{280}$  ratio between 1.6 and 1.9 and can be up to 50 kb in length. This DNA is ready for downstream applications such as restriction endonuclease digestions, PCR, and Southern blots.

Reagents Provided	Cat. No.	NA2100 10 Preps	NA2110 70 Preps	NA2120 350 Preps
Gram-Positive Lysis Solution	<b>L7539</b>	3 mL	20 mL	90 mL
Lysis Solution T	<b>B6678</b>	2.5 mL	20 mL	90 mL
Lysis Solution C	<b>B8803</b>	2.5 mL	20 mL	90 mL
Wash Solution 1	<b>W0263</b>	7 mL	50 mL	225 mL
Wash Solution Concentrate	<b>B6553</b>	2.5 mL	20 mL	90 mL
Elution Solution (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0)	<b>B6803</b>	5 mL	35 mL	180 mL
Column Preparation Solution	<b>C2112</b>	7 mL	60 mL	225 mL
Proteinase K	<b>P2308</b>	1 × 5 mg	3 × 10 mg	2 × 100 mg
RNase A Solution	<b>R6148</b>	0.25 mL	1.7 mL	8 mL
GenElute Nucleic Acid Binding Columns in tube	<b>C9471</b>	10 each	70 each	5 × 70 each
Collection Tubes, 2.0 mL capacity	<b>T5449 or T7813</b>	3 × 10 each	3 × 70 each	15 × 70 each

#### Equipment and Reagents Required But Not Provided

- 37 °C water bath or heating block
- 55 °C water bath or heating block
- Pipette tips (aerosol barrier recommended)
- 1.5 mL microcentrifuge tube for lysis
- Microcentrifuge (2 mL tube, rotor equipped)\*
- Ethanol (95%–100%), Catalog Nos. **E7023**, **E7148**, or **459836**
- Molecular Biology Reagent Water, Catalog No. **W4502**
- Lysozyme, Catalog No. **L4919** (for gram-positives only)
- Mutanolysin, Catalog No. **M9901** (for *Streptococcus* species only)
- Lysostaphin, Catalog No. **L7386** (for *Staphylococcus* only)

\***Note:** To ensure proper fit of all tubes, a 24-place rotor is recommended. If you are using a 36-place rotor, we recommend using every other place for proper tube fit.

## Precautions and Disclaimer

The GenElute Bacterial Genomic DNA Kit is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet (MSDS) for information regarding hazards and safe handling practices.

## Storage and Stability

Store the kit at room temperature. If any kit reagent forms a precipitate, warm at 55–65 °C until the precipitate dissolves and allow to cool to room temperature before use.

## Preparation Instructions

1. **Preheat a water bath or heating block to 55 °C** For use with both gram-positive and gram-negative bacteria.
2. **Preheat a water bath or heating block to 37 °C** For use with gram-positive bacteria only.
3. **Thoroughly Mix Reagents** Examine reagents for precipitation. If any reagent forms a precipitate, warm at 55–65 °C until the precipitate dissolves and cool to room temperature before use.
4. **Dilute Wash Solution Concentrate** Dilute the concentrate with 10 mL (10 prep package), 80 mL (70 prep package), or 360 mL (350 prep package) of 95–100% ethanol. After each use, tightly cap the diluted Wash Solution to prevent the evaporation of the ethanol.
5. **Reconstitute Proteinase K** Dissolve the powder in one bottle of Proteinase K in water to obtain a 20 mg/mL stock solution, according to Table 1. The Proteinase K solution can be stored for several days at 2–8 °C. For longer-term storage, the unused portion of the solution may be stored in aliquots at –20 °C until needed. This product as supplied is stable at room temperature.  
**Note:** The Proteinase K solution must be added directly to each sample every time. Do not combine the Proteinase K Solution and Lysis Solution for storage.

**Table 1. Proteinase K Solution Preparation**

Cat. No.	Proteinase K	Water
NA2100	5 mg	0.25 mL
NA2110	10 mg	0.5 mL
NA2120	100 mg	5.0 mL

- 6. Prepare Lysozyme Solution** *(for gram-positive bacteria only)*
- Prepare a  $2.115 \times 10^6$  unit/mL stock solution of lysozyme (**L4919**) (approximately 45 mg/mL) using the included Gram-Positive Lysis Solution (**L7539**) as the diluent. For example, to make 1 mL of Lysozyme Solution, dissolve  $2.115 \times 10^6$  units of lysozyme in 1 mL of Gram-Positive Lysis Solution.
- Pipette the mixture up and down or vortex to dissolve the lysozyme (see note below). For each DNA preparation to be performed, 200  $\mu$ L of Lysozyme Solution is required. Make extra solution to account for pipetting error. The Lysozyme Solution should be used on the day of preparation.
- Note:** Lysozyme may dissolve more readily by pipetting the mixture up and down as opposed to vortexing. Excessive vortexing may cause foaming. The lysozyme may not dissolve readily, in which case it does not need to be completely dissolved prior to use. Genomic DNA yields will not be affected as the lysozyme will dissolve during the 37 °C incubation.

## Procedure

If minimally sheared genomic DNA is desired in downstream applications, e.g., if using the end product for long amplification PCR, mix with gentle pipetting or inversion until homogeneous instead of vortexing in the procedure that follows.

See Appendix 1 to convert *g*-force to RPM.

### A. Gram-Negative Bacterial Preparation

- 1a. Harvest Cells**
- Pellet 1.5 mL of an overnight bacterial broth culture by centrifuging for 2 minutes at 12,000–16,000  $\times g$ . Remove the culture medium completely and discard.
- Note:** If bacteria are propagated in rich media such as Terrific broth (**T9179**) it will be necessary to reduce the volume of starting material to 0.5 mL of an overnight bacterial broth culture to avoid overloading the GenElute columns. See Appendix 2 for more information.
- 2a. Resuspend Cells**
- Resuspend the pellet thoroughly in 180  $\mu$ L of Lysis Solution T (**B6678**). If residual RNA is not a concern, continue with step 3a.
- Optional RNase A treatment:** If RNA-free genomic DNA is required, add 20  $\mu$ L of RNase A Solution (**R6148**), mix, and incubate for 2 minutes at room temperature, then continue with step 3a.
- 3a. Prepare for Cell Lysis**
- Add 20  $\mu$ L of the Proteinase K solution to the sample. Mix and incubate for 30 minutes at 55 °C.
- 4a. Lyse Cells**
- Add 200  $\mu$ L of Lysis Solution C (**B8803**), vortex thoroughly (about 15 seconds), and incubate at 55 °C for 10 minutes. A homogeneous mixture is essential for efficient lysis. Continue with step 5.


**B. Gram-Positive Bacterial Preparation**

- 1b. Prepare Lysozyme Solution Using Lysozyme from Chicken Egg White (L4919)** Prepare a  $2.115 \times 10^6$  unit/mL stock solution of lysozyme as described under Preparation Instructions. For each DNA preparation to be performed, 200  $\mu$ L of Lysozyme Solution is required. Prepare extra solution to account for pipetting error.  
**Note:** If working with *Staphylococcus* species, supplement the Lysozyme Solution with 200 units/mL of lysostaphin (**L7386**). For *Streptococcus* species, supplement the Lysozyme Solution with 250 units/mL of mutanolysin (**M9901**).
- 2b. Harvest Cells** Pellet 1.5 mL of an overnight bacterial broth culture by centrifuging for 2 minutes at 12,000–16,000  $\times g$ . Remove the culture medium completely and discard.  
**Note:** If bacteria are propagated in rich media such as Terrific broth (**T9179**), it will be necessary to reduce the volume of starting material to 0.5 mL of overnight bacterial broth culture to avoid overloading the GenElute columns. See Appendix 2 for more information.
- 3b. Resuspend Cells** Resuspend the pellet thoroughly in 200  $\mu$ L of Lysozyme Solution (prepared in step 1b) and incubate for 30 minutes at 37 °C.  
**Optional RNase A treatment:** If residual RNA is not a concern, continue with step 4b. If RNA-free genomic DNA is required, add 20  $\mu$ L of RNase A Solution and incubate for 2 minutes at room temperature, then continue with step 4b.
- 4b. Lyse Cells** Add 20  $\mu$ L of the Proteinase K solution to the sample, followed by 200  $\mu$ L of Lysis Solution C (**B8803**). Vortex thoroughly (about 15 seconds) and incubate at 55 °C for 10 minutes. A homogeneous mixture is essential for efficient lysis. Continue with step 5.

**DNA Isolation from Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria**

This is a continuation of the procedure from the lysates prepared in steps 1–4a and/or steps 1–4b.

- 5. Column Preparation** Add 500  $\mu$ L of the Column Preparation Solution to each pre-assembled GenElute Miniprep Binding Column (with a red o-ring, not to be confused with other GenElute kits) seated in a 2 mL collection tube. Centrifuge at 12,000  $\times g$  for 1 minute. Discard the eluate.  
**Note:** The Column Preparation Solution maximizes binding of DNA to the membrane resulting in more consistent yields.
- 6. Prepare for Binding** Add 200  $\mu$ L of ethanol (95–100%) to the lysate and mix thoroughly by vortexing for 5–10 seconds. A homogeneous mixture is essential.

- 7. Load Lysate** Transfer the entire contents of the tube into the binding column. Use a wide bore pipette tip to reduce shearing the DNA when transferring the contents into the column. Centrifuge at  $\geq 6500 \times g$  for 1 minute. Discard the collection tube containing the eluate and place the column in a new 2 mL collection tube.
- 8. First Wash** Add 500  $\mu\text{L}$  of Wash Solution 1 (**W0263**) to the column and centrifuge for 1 minute at  $\geq 6500 \times g$ . Discard the collection tube containing the eluate and place the column in a new 2 mL collection tube.
- 9. Second Wash** Add 500  $\mu\text{L}$  of Wash Solution to the column and centrifuge for 3 minutes at maximum speed (12,000–16,000  $\times g$ ) to dry the column. The column must be free of ethanol before eluting the DNA. Centrifuge the column for an additional 1 minute at maximum speed if residual ethanol is seen. You may empty and re-use the collection tube if you need this additional centrifugation step. Finally, discard the collection tube containing the eluate and place the column in a new 2 mL collection tube.
-  **Important Reminder:** *Verify that ethanol has been added to the bottle of Wash Solution Concentrate.*
- 10. Elute DNA** Pipette 200  $\mu\text{L}$  of the Elution Solution (**B6803**) directly onto the center of the column; centrifuge for 1 minute at  $\geq 6500 \times g$  to elute the DNA. To increase the elution efficiency, incubate for 5 minutes at room temperature after adding the Elution Solution, then centrifuge.
- Optional:** A second elution can be collected by repeating step 10 with an additional 200  $\mu\text{L}$  of Elution Solution and eluting into a new 2 mL collection tube or into the same 2 mL collection tube as used for the first eluate. The yield can be improved by 20–50% when performing a second elution.

The eluate contains pure genomic DNA. For short-term storage of the DNA, 2–8 °C is recommended. For longer-term storage, –20 °C is recommended. Avoid freezing and thawing, which causes breaks in the DNA strand. The Elution Solution will help stabilize the DNA at these temperatures.

## DNA Precipitation (Optional)

The GenElute Bacterial Genomic DNA Kit is designed so the DNA always remains in solution, avoiding resuspension issues. However, if you find it necessary to concentrate the DNA, ethanol precipitation in the presence of sodium acetate is recommended.<sup>1</sup>

### Results

The concentration and quality of the genomic DNA can be determined by spectrophotometric analysis and agarose gel electrophoresis. Dilute the DNA in TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0–8.5) and measure the absorbance at 260 nm, 280 nm, and 320 nm using a quartz microcuvette. The absorbance at 260 nm and 280 nm should be between 0.1 and 1.0 (or within the linear range of your spectrophotometer). The 320 nm absorbance is used to correct for background absorbance. An absorbance of 1.0 at 260 nm corresponds to approximately 50 mg/mL of double-stranded DNA. The  $A_{260}-A_{320}/A_{280}-A_{320}$  ratio should be 1.6–1.9.

The size and quality of the DNA can be determined by agarose gel electrophoresis.<sup>1</sup> A gel containing 0.8% agarose (**A9539**) in 0.5X TBE Buffer (**T6400**) works well for the resolution of genomic DNA. The DNA can be visualized by staining with an intercalating dye such as ethidium bromide (**E1510**) and measured against a known DNA marker such as Lambda DNA *Hind* III digest (**D9780**). The genomic DNA should migrate as a single, high molecular weight band with very little evidence of shearing. A more precise determination of the size of the DNA can be made by pulsed-field gel electrophoresis.<sup>2</sup>

### References

1. Sambrook, J. F., and Russell, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 2001).
2. Birren, B., and Lai, E., *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide* (Academic Press, San Diego, CA, 1993).