

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## Forord

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

Å skrive masteroppgave for Nofima har vært givende. Jeg har lært veldig mye nytt, og føler jeg sitter igjen med mye praktisk og teoretisk erfaring som vil komme godt med i arbeidslivet.

En stor takk rettes til mine veiledere ved Nofima, forsker Trond Møretrø og forsker Solveig Langsrud, for god og stødig veiledning under arbeidet med oppgaven. Takk til laboratorieleder Tove Maugesten for tålmodig hjelp med laboratoriearbeidet. Jeg vil også takke min kjæreste og medstudent gjennom fem år, Espen Arntzen for gode råd under arbeidet med oppgaven.

Til slutt vil jeg takke min hovedveileder ved UMB, professor Helge Holo.

Ås, mai 2013

---

Elisabeth Oust Ledsaak

## Sammendrag

Stafylokokker kan danne biofilm, og det er antatt at biofilmdannelse spiller en viktig rolle for overlevelse av bakterien i næringsmiddelindustrien. Kunnskap om sammensetning av biofilm matriks er nyttig med tanke på metoder for fjerning. Det har etter hvert blitt stort fokus på bakterienes egen evne til å løse opp biofilm, da det antas at disse mekanismene kan benyttes til målrettet bekjempelse av biofilm. Hensikten med denne masteroppgaven var å finne ut om ulike kjemiske forbindelser (D-aminosyrer, norspermidin og enzymer) kan hemme biofilmdannelse hos stafylokokker. Det ble også undersøkt om bakterien selv danner forbindelser som løser opp biofilm.

Biofilm ble dyrket i mikrotiterplater i et glukose- og NaCl-beriket vekstmedium, med tilsatt enzymer/D-aminosyrer/norspermidin, i to dager ved 30 °C. Platene ble deretter vasket, - og farget med krystallfiolett. Farge ble utløst med surgjort etanol. Absorbans ( $OD_{600}$ ) av utløst farge, ble et mål på biofilmdannelse hos hver enkelt stamme. Ved undersøkelse om *Staphylococcus* danner forbindelser som løser opp egen biofilm, ble stammene inkubert i 14 dager i reagensrør ved 30 °C og 150 rpm. Biofilmdannelse ble målt ved farging (som for mikrotitermetode) og absorbans, i tillegg til visuell observasjon. Supernatant fra stammer med nedgang i biofilmdannelse ble deretter testet på et utvalg stammer for å se om den hadde en dispergerende effekt på biofilm.

Det ble vist at de ulike stammene av *Staphylococcus* i dette forsøket, hadde ulik respons ved tilsetning av forskjellige enzymer. Enkelte stammer av *S. cohnii* fikk hemming i biofilmdannelse i nærvær av proteaser. Dette indikerer en biofilm hvor proteiner utgjør en stor del. Biofilm hos enkelte stammer av *S. aureus* og *S. epidermidis* ble hemmet av Dispersin B og DNase, dette indikerer en biofilm sammensatt av store deler ekstracellulært DNA og polysakkarider (PIA). Det ble det vist at *S. cohnii* (MF 1844) og *S. epidermidis* (MF 2601) hadde nedgang i biofilmdannelse etter inkubering i 14 dager. Begge stammene hadde supernatant som ga signifikant hemming i biofilmdannelse på seg selv og hverandre. Det ble vist at *S. cohnii* (MF 1844) dannet supernatant som ikke lot seg inaktivere ved varmebehandling (85 °C i 20 min). Dette indikerer at bakterien danner biofilmhemmende varmemestabile komponenter. I dette arbeidet ble det vist lite hemmende effekt av D-aminosyrer og norspermidin på utvalget av *Staphylococcus*. Ulike stammers respons på enzymer, samt dannelse av komponenter som løser opp biofilm, er kunnskap som kan være nyttig i utarbeidelse av bedre metoder for bekjempelse av biofilm i næringsmiddelindustrien.

## Abstract

Staphylococci have the ability to form biofilms. It is assumed that biofilm formation plays an important role for survival of these bacteria in the food industry. It is increasingly focused on the bacteria's own ability to dissolve biofilm, as it is believed that these mechanisms can be used for targeted control of biofilms. The purpose of this thesis was to investigate whether various chemical compounds (enzymes, D-amino acids and norspermidine), can inhibit biofilm formation of different strains/species of *Staphylococcus*. It was also investigated whether *Staphylococcus* form compounds that dissolves biofilm.

Biofilms were grown in microtiter plates with glucose-and NaCl-enriched growth medium, added enzymes/D-amino acid/norspermidine, for two days at 30 ° C. The plates were then washed and stained with crystal violet. Color was dissolved with acidified ethanol. Absorbance (OD<sub>600</sub>) of dissolved color was a measure of biofilm formation of each strain. Upon investigation whether *Staphylococcus* form substances that solves their own biofilms, the strains were incubated for 14 days in test tubes at 30 ° C and 150 rpm. Biofilm formation was measured by staining (as microtiter method) and absorbance, in addition to visual observation. Supernatant from strains with decrease in biofilm formation, were then tested on a sample of strains to investigate if the supernatant inhibited biofilm formation.

It was shown that biofilm formation of the *Staphylococcus* strains in this experiment was effected by the addition of various enzymes. Certain strains of *S. cohnii* had an inhibition of biofilm formation in the presence of proteases. This indicates a biofilm where proteins constitute a large part. Biofilm in some strains of *S. aureus* and *S. epidermidis* was inhibited by Dispersin B and DNase, indicating a biofilm composed of large parts of extracellular DNA and polysaccharides (PIA). *S. cohnii* (MF 1844) and *S. epidermidis* (MF 2601) had a decrease in biofilm formation after incubation for 14 days. Both bacteria's produced components in their supernatants which gave significant inhibition of biofilm formation when tested on themselves and each other. *S. cohnii* (MF 1844) formed a supernatant that did not seem to be inactivated by heat treatment (85 ° C for 20 min). This indicates that the bacteria formed heat stable biofilm inhibiting components. In this work it was demonstrated little inhibitory effect of D-amino acids and norspermidine on the selection of staphylococci.

The response to various enzymes by different strains of staphylococci, and formation of components that dissolve biofilm, is knowledge that can be useful in the improvement of methods for control of biofilms in the food processing industry.

# Innholdsfortegnelse

<b>1 Innledning .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Teori.....</b>	<b>3</b>
2.1 Biofilm .....	3
2.2 Biofilmens syklus – løsning av biofilm.....	4
2.3 Biofilm i næringsmiddelindustrien.....	6
2.3.1 Forebygging av biofilm .....	7
2.3.2 Fjerning av biofilm.....	7
2.3.3 Desinfeksjon og enzymatisk fjerning .....	8
2.4 <i>Staphylococcus</i> spp. ....	9
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
2.4.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> og andre koagulase negative <i>Staphylococcus</i> .....	11
2.5 Biofilmdannelse hos <i>Staphylococcus</i> spp. ....	12
2.5.1 Intercellulær adhesin (PIA) .....	13
2.5.2 Proteinbasert biofilm .....	14
2.5.3 Ekstracellulært DNA .....	15
2.5.4 Teikoidsyre.....	15
2.6 Løsning av biofilm hos <i>Staphylococcus</i> spp. ....	16
2.6.1 Regulering av biofilmoppløsning; <i>agr</i> -systemet .....	16
2.6.2 D- aminosyrer og norsperimidin .....	17
2.6.3 Enzymer og oppløsning av biofilm .....	19
<b>3 Materialer og metoder .....</b>	<b>21</b>
3.1 Bakteriestammer.....	21
3.2 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer .....	22
3.3 Medier .....	22
3.4 Løsninger.....	22
3.5 Forsøksoppsett.....	23
3.6 Innledende forsøk, valg av vekstmedium for biofilmstudier .....	25
3.6.1 Biofilmdannelse i mikrotiterplater med ulike vekstmedier .....	26
3.6.2 Biofilmdannelse i reagensrør med ulike vekstmedier .....	26
3.7 Mikrotitermetode; biofilm i mikrotiterplater.....	27

3.7.1 Effekt av D-aminosyrer, norspermidin og enzymer på biofilmdannelse i mikrotiterplater..	27
3.8 Rørmetode; biofilm i glassrør .....	29
3.8.1 Oppløsning av biofilm over lengre tids inkubering i reagensrør .....	29
3.8.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse .....	30
3.9 Statistiske metoder .....	30
<b>4 Resultater .....</b>	<b>31</b>
4.1 Innledende forsøk, valg av vekstmedium for biofilmstudier .....	31
4.2 Mikrotitermetode; biofilm i mikrotiterplater.....	33
4.2.1 Kartlegging av effekt av D-aminosyrer, norspermidin og enzymer på biofilmdannelse.....	33
4.2.2 Effekt av enzymer.....	36
4.2.3 Effekt av D-aminosyrer og norspermidin.....	37
4.2.4 Utvelgelse av stammer til videre forsøk.....	37
4.3 Biofilmens sammensetning, forsøk med enzymer .....	38
4.4 Forsøk med D-aminosyrer.....	41
4.4.1 Hemming av biofilmdannelse ved 2 mM konsentrasjon .....	41
4.4.2 Forsøk med L-aminosyrer .....	44
4.5 Rørmetode; biofilm i glassrør .....	47
4.5.1 Oppløsning av biofilm over lengre tids inkubering i reagensrør .....	47
4.5.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse .....	49
<b>5 Diskusjon.....</b>	<b>54</b>
5.1 Mikrotitermetode; biofilm i mikrotiterbrett .....	54
5.2 Rørmetode; biofilm i glassrør .....	58
5.3 Valg av vekstmedium til biofilmstudier.....	60
5.4 Evaluering av metode.....	60
5.5 Relevans av resultater for kontroll av biofilm i næringsmiddelindustrien.....	62
<b>6 Konklusjon.....</b>	<b>63</b>
<b>7 Forslag til videre arbeid.....</b>	<b>64</b>
<b>8 Referanser .....</b>	<b>65</b>
<b>9 Vedleggsliste.....</b>	<b>70</b>

# 1 Innledning

Dannelse av biofilm utgjør et stort problem innen næringsmiddelindustrien. Det er kjent at flere stammer av *Staphylococcus* danner biofilm, og det antas at overlevelse innen næringsmiddelindustrien skyldes bakteriene evne til å feste seg til overflater og dannelse av ekstracellulær matriks (Langsrud 2009).

*Staphylococcus aureus* danner toksiner i mat, det antas at *S. aureus* er en av de vanligste årsakene til matbåren sykdom i verden (Jørgensen 2005). Majoriteten av forskning på biofilmdannelse av *Staphylococcus* er gjort på kliniske stammer. *Staphylococcus aureus* og *Staphylococcus epidermidis* er blant de vanligste bakteriene som isoleres fra infeksjoner hos mennesker og bakteriene danner store problem innen human medisin, hvor de blant annet danner biofilm på implantater (Izano et al. 2007). Mindre forskning er gjort på biofilmdannelse av *Staphylococcus* innen næringsmiddelindustrien.

Sammensetningen av *Staphylococcus* biofilm kan variere. Tidligere har man trodd at *Staphylococcus* biofilm stort sett er bygd opp av polysakkarid intercellulær adhesin (PIA). Nyere forskning viser imidlertid at biofilm av *Staphylococcus* også kan bestå av proteiner, ekstracellulært DNA og teikoidsyrer (Izano et al. 2007; Kogan et al. 2005). Det er vist at biofilm hos *Staphylococcus* lar seg påvirke av dyrkingsforhold. Komponenter som er vanlige innen næringsmiddelindustrien slik som glukose og NaCl, kan øke dannelsen av biofilm (Rode et al. 2007). Nyere forskning viser at *S. aureus* kan danne svært stabile proteiner ved bestemte forhold (Schwartz et al. 2012).

Biofilmdannelse er en dynamisk prosess, som også innebærer oppløsning og dispergering av planktoniske celler til nye områder. Oppløsning av biofilm er nødvendig for at mikroorganismer skal overleve ved mangel på næringsstoff (Kaplan 2010). For å finne egnede metoder for fjerning av biofilm er det viktig å ha kunnskap om sammensetningen av biofilmen. Løselighet av biofilm til ulike enzymer kan si noe om hva biofilmen er bygd opp av (Chaignon et al. 2007). Det er etterhvert blitt stor oppmerksomhet rundt bakterienes egenmedierte oppløsning av biofilm. Ved å studere bakterienes egne system for oppløsning av biofilm, øynes muligheten til bekjempelse av biofilm innen næringsmiddelindustrien ved å benytte mikroorgansimenes egne mekanismer.

Denne oppgaven inngår som en del av et basisprogram ved Nofima ved navn "Mattrygghet, matkvalitet og helseeffekter – kontroll med mikrofloraen". Prosjektet tar sikte på å gi ny kunnskap og kompetanse for å forstå hvordan mikroorganismer etablerer seg, overlever og vokser i mat og matproduksjonsmiljøer. Prosjektet er finansiert av fondet for forskningsavgift på landbruksprodukter (FFL).

Hensikten med denne masteroppgaven er å se om ulike kjemiske forbindelser (D-aminosyrer, norspermidin og enzymer) har effekt på biofilmdannelse hos ulike arter/stammer av *Staphylococcus*. Kunnskap om hvilke typer forbindelser som hemmer biofilm, kan gi indikasjoner på sammensetning av biofilm matriks. Det skal også undersøkes om *Staphylococcus* danner forbindelser som løser opp biofilm. Forsøkene skal gi bakgrunnsinformasjon for målrettet bekjempelse av biofilm av *Staphylococcus* innen næringsmiddelindustrien.



## 2 Teori

### 2.1 Biofilm

Tradisjonelt har det vært vanlig å betegne bakterier som fritt flytende enkeltceller. I virkeligheten opptrer mikroorganismer sjelden i en planktonisk tilstand. Det er estimert at 99 % av alle bakterier i naturlige omgivelser eksisterer som biofilm (Prakash 2003).

En biofilm defineres som bakterier som er irreversibelt festet til en overflate, og som er innkapslet i en matriks av ekstracellulært materiale de har produsert selv. Biofilmen skaper en trygg koloni for bakteriene i miljøet. Dette gjør at mikroorganismene kan vokse uten å bli påvirket av omgivelsene i nevneverdig grad (Prakash 2003). Biofilmens sammensetning vil variere fra bakterie til bakterie. Generelt vil mikrokolonier være innesluttet av en ekstracellulær matriks, som kan bestå av ekstracellulære polysakkarider (EPS), ekstracellulært DNA (eDNA), og proteiner. Den ekstracellulære matriksen beskytter sine innbyggere mot lyserende bakteriofager, protozoer og kjemiske toksiner slik som biocider og antibiotikum. Biofilmen sørger for at næringsstoff og oksygen slippes inn i strukturen, mens avfall, nitrogenoksid og signaler fraktes ut (McDougald et al., 2012). En biofilm kan bestå av en monokultur eller som et kollektiv med en rekke forskjellige stammer. Det er for eksempel antatt at belegget på tenner kan inneholde over 500 forskjellige stammer (Mah & O'Toole 2001).

Biofilmen utgjør et unikt miljø for dens innbyggere. Foruten å beskytte for ytre påkjenninger, vil bakteriene også dra nytte av hverandres egenskaper. En mikroorganismes død vil gi næring, aminosyrer og andre vekstfaktorer til felleskapet. Innbyggerne ruller på ulike livsviktige molekyler som gir energi ved hjelp av redoksreaksjoner, slik som karbon, svovel og nitrogen (Donlan 2002). Overføring av genetiske egenskaper skjer lettere i en biofilm. For eksempel kan plasmider som koder for biofilmdannelse, overføres til stammer som i utgangspunktet ikke har denne egenskapen, ved hjelp av konjugasjon (Hausner & Wuertz 1999). Denne mekanismen kan også benyttes til å overføre andre egenskaper slik som resistens mot ulike antimikrobielle midler og antibiotika. Det har blitt vist at stammer med konjugasjonsplasmid lettere utvikler biofilm (Donlan 2002). Selv om bakteriene i en biofilm er organisert slik at de utnytter alle tilgjengelige næringsstoffer, vil bakteriene også konkurrere om disse. Det vil derfor være en utveksling av bakteriociner, bakteriofager og

andre antimikrobielle komponenter fra de ulike bakteriecellene innad i biofilmen (Sutherland 2001).

Dannelse av biofilm kan skje overalt, så lenge det er fukt og næringsstoff til stede. Visse overflateegenskaper vil likevel gi lettere biofilmdannelse enn andre. Det er vist at ru overflater gir lettere biofilmdannelse enn glatte, og at mikroorganismer vil feste seg lettere til hydrofobe overflater. Generelt vil en økning av væsketemperatur og oppkonsentrering av næringsstoff, bidra til økt binding av bakteriene (Prakash 2003). Typiske steder hvor biofilm dannes, er overflater, vannrør, medisinske implantater, og områder hvor det er vanskelig å komme til ved rengjøring (Prakash 2003). Enkelte stammer, for eksempel *Staphylococcus epidermidis*, kan også gi biofilmdannelse i sår (Brackman et al. 2013). Biofilm kan dannes på biotiske og abiotiske overflater. Dette skaper utfordringer innen kliniske felt, så vel som næringsmiddelindustrien (Yarwood et al. 2007).

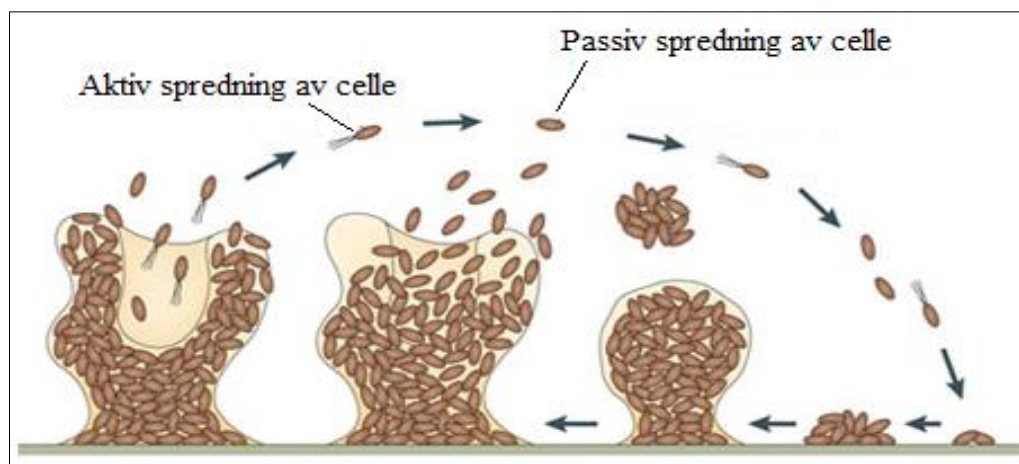
## 2.2 Biofilmens syklus – løsning av biofilm

Biofilm utvikler seg i forskjellige trinn. Dette er en dynamisk prosess som ofte deles inn i binding til overflater, dannelse av mikrokolonier, dannelse av ekstracellulære komponenter og til slutt løsning av biofilm og dispergering av planktoniske celler til miljøet (McDougald et al. 2012).

Binding av mikroorganismer til en overflate skjer i to trinn; en reversibel og en irreversibel binding. De innledende svake bindingene mellom mikroorganismen og overflaten, omtales som de reversible bindingene. Dette innebærer krefter slik som van der Waals-bindinger, elektrostatiske bindinger og hydrofobe interaksjoner. Så lenge mikroorganismen er festet med disse kreftene har den fremdeles Brownske bevegelser, og vil fjernes ved vanlig vannskylning (Ganesh Kumar & Anad 1998). En irreversibel festing av mikroorganismen involverer bindinger slik som dipol-dipolbindinger, hydrogenbindinger, ionebindinger og kovalente bindinger. Ved irreversibel binding vil biofilmen være vanskelig å fjerne, og det kan være nødvendig å benytte mekaniske metoder (Ganesh Kumar & Anad 1998).

Dersom forholdene ligger til rette (næring, temperatur, fuktighet), vil det etter binding til overflater, dannes mikrokolonier som etter hvert omslutes av en ekstracellulær matriks. Oppbygningen av matriks vil være forskjellige fra stamme til stamme. Enkelte

mikroorganismer danner sopp, eller tårnlignende biofilmstrukturer, andre stammer danner kun et enkelt lag innkapslet i ekstracellulær matriks (McDougald et al. 2012). Etter hvert som biofilmen vokser og utvikler seg vil det skje en opphopning av avfallsstoffer, og det blir mangel på viktige næringsstoff innad i strukturen. På dette stadiet kan det være fordelaktig for bakteriene å gå tilbake til en planktonisk tilstand, og biofilmen løses opp. Oppløsningen gir bakteriene mulighet til å overleve og kolonisere på nye steder (Kolodkin-Gal et al. 2010). Oppløsningen av biofilm er en kompleks prosess som involverer en rekke signaler og effektorer (Kaplan 2010). Oppløsningen kan deles inn i passive og aktive mekanismer. Dette illustreres i Figur 2.1. Med aktiv oppløsning refereres det til mekanismer som initieres av mikroorganismene selv. En passiv oppløsning skjer ved eksterne krefter, slik som kollisjon av faste partikler i biofilmen som følge av vannstrømninger, eller menneskelig innblanding (Kaplan 2010). Det er beskrevet tre forskjellige mekanismer for oppløsning av biofilm; erosjon, oppstyking eller utsåing (erosion, sloughing og seeding). Erosjoner er en kontinuerlig frigjøring av enkeltceller, eller små kolonier til miljøet. Ved oppstyking faller det av større biter med biofilm, mens det med utsåing refereres til en frigjøring av et stort antall enkeltceller ut i miljøet. Erosjon og oppstyking er som regel passive mekanismer, mens utsåing alltid er en aktiv oppløsning av biofilm (Kaplan 2010).



**Figur 2.1** Biofilmens syklus fra planktoniske celler til etablert biofilm. Biofilmen har aktiv og passiv dispergering av planktoniske celler til miljøet (McDougald et al. 2012).

Cellelysis spiller en viktig rolle for oppløsning og dispergering av celler fra en biofilm. En subpopulasjon av celler vil undergå en lysis, noe som gir næring til dispergerende celler. Hos de dispergerende cellene er gener som er karakteristiske for biofilmdannelse, slik som exopolysakkarider og fimbrier regulert ned, mens gener som er viktige for planktoniske, frie celler, blir oppregulert. Dette er egenskaper slik som flageller og proteiner involvert i

kjemotaksis (McDougald et al. 2012). Miljøet har en stor innvirkning på dispergering av celler fra en biofilm. Mangel på næringsstoff (karbonforbindelser), mangel på oksygen, forandringer i temperatur, høye og lave nivå av jern, eller tilstedeværelse av små mengder nitrogenoksid (NO) er alle faktorer som trigger en oppløsning av biofilm. I tillegg kan bakteriene danne flere signaler og stoffer som induserer en oppløsning, eller bryter opp allerede eksisterende biofilmer. Dette kan være alt fra celle til celle-autoinduserende peptider (AIP), diffusjon av fettsyrer, D-aminosyrer og ulike enzymer (McDougald et al. 2012).

### 2.3 Biofilm i næringsmiddelindustrien

Biofilm utgjør et stort problem innen næringsmiddelindustrien. En etablert biofilm vil kunne smitte over på produktet, og dette kan gi en forringelse av kvalitet og mattrygghet. Biofilm kan også føre til økonomiske konsekvenser ved tetting av rør samt ødeleggelse og slitasje av produksjonsutstyr (Simões et al. 2009).

Bakterier med evne til å danne biofilm har andre egenskaper enn sine planktoniske brødre. Mikroorganismer i en biofilm har blant annet en annerledes vekstkurve og sammensetning, og de kan ha en høyere resistens mot biocider, antibiotika og antistoffer. Det er vist at mikroorganismer som befinner seg i en biofilm kan være 10-1000 ganger mer resistent mot desinfeksjonsmidler enn hva tilfellet er for de planktoniske cellene (Mah & O'Toole 2001). Et eksempel på dette er *S. aureus*. Stammen har ikke resistens mot mange antimikrobielle midler i planktonisk tilstand. Imidlertid har bakterien vist seg å være svært motstandsdyktig når den befinner seg i en biofilm (Langsrud 2009). Biofilmen vil beskytte sine innbyggere mot antimikrobielle midler ved å virke som en fysisk barriere, eller ved å binde direkte til de antimikrobielle komponentene og dermed forhindre adgang til bakteriecellene. Siden biofilm som regel er en heterogen blanding av ulike mikroorganismer, utgjør de forskjellige mekanismene en cocktaileffekt med multiple egenskaper, hvor alle utgjør en viss form for resistens mot antimikrobielle komponenter (Mah & O'Toole 2001).

Hvilke mikroorganismer som danner biofilm er avhengig av ulike faktorer som er til stede i produksjonsmiljøet slik som fuktighet, temperaturer og hygieniske kår (Simões et al. 2009). Det er vist at tilsetning av NaCl, glukose og etanol bidrar til en sterkere biofilmdannelse hos *Staphylococcus* (O'Gara 2007). Dette bekreftes av en studie utført av Rode et al. (2007). Studien så nærmere på biofilmdannelsen hos *S. aureus* ved å dyrke den under ulike

vekstforhold som alle er relevante til næringsmiddelindustrien. Studien viste også at biofilmdannelsen var størst ved forhold suboptimale for vekst.

### 2.3.1 Forebygging av biofilm

Rengjøring er ofte den beste metoden for å hindre at mikroorganismer fester seg til overflater. Biofilmdannelse forebygges derfor ved å rengjøre og desinfisere utstyr og overflater jevnlig (Grinstead 2009). Smuss bidrar til kondisjonering av overflater, og dette kan føre til at mikroorganismene fester seg lettere. Det er derfor viktig å sørge for begrenset tilgang på næringsstoff, og det er en fordel å holde produksjonslokalet og utstyret så tørt som mulig utenom produksjon (Simões et al. 2009). Temperaturer i produksjonslokalet kan ha noe å si for adhering av bakterier til overflater. Mye av forskning som er gjort på biofilmdannelse hos *Staphylococcus* er utført ved temperaturer rundt 37 °C. Dette er temperaturer som er aktuelle innen kliniske felt, men som ikke er like relevante innen næringsmiddelindustrien (Langsrud 2009). Det er likevel vist *S. aureus* danner biofilm ned mot 12 °C. Dette bekreftes av et forsøk av Pompermayer og Gaylarde (2000), hvor det ble vist at *S. aureus* fester seg bedre på polypropylen ved 12 °C enn ved 30 °C. Dette indikerer at lavere temperaturer i produksjonslokalet ikke er nok for å hindre biofilmdannelse hos bakterien.

### 2.3.2 Fjerning av biofilm

Innen industrien er det vanlig å benytte en kombinasjon av alkaliske midler og mekaniske krefter ved fjerning av biofilm (Simões et al. 2009). En rekke faktorer spiller inn på hvor effektiv rengjøringen er. Dette kan være hvilke overflatematerialer som skal rengjøres, næringsstoffer til stede, vannkvalitet og andre miljøbestemte faktorer. Visse faktorer er det imidlertid mulig å kontrollere. Dette er tid, mekaniske krefter, kjemikalier og temperaturer (Grinstead 2009). Generelt vil overflater bli renere med en lengre rengjøringsprosess og kontakttid av kjemikalier. Høyere temperaturer gir som regel bedre rengjøring, og innen meieriindustrien er tommelfingerregelen at effekt av rengjøringen fordobles ved hver 10 °C økning i temperatur. Det er imidlertid en grense. For høye temperaturer vil kunne denaturere proteiner, og brenne fast partikler til overflater, noe som gjør partiklene vanskeligere å fjerne (Grinstead 2009). Mekanisk fjerning er effektivt og vil fjerne så mye som 90 % eller mer av biofilmen. Fysiske metoder slik som skrubbing eller høytrykksspyling, gir likevel en risiko for at mikroorganismene blir spredt utover lokalet, og det skal ikke mer til enn overlevelse av kun 1 % av den opprinnelige populasjonen, for at biofilmen kan etableres på nytt (Simões et al.

2009). Valg av rengjøringsmidler har stor betydning. Rengjøringsmidler er ofte designet for ulike formål. Tensidbaserte rengjøringsmidler og alkaliske stoffer er effektive ovenfor fett. Ved fjerning av mineralske forbindelser, benyttes ofte syrer. Oksiderende forbindelser, slik som kloralkali benyttes ofte til å løse opp proteinfilmer. Klor har også desinfiserende egenskaper. Det må imidlertid være fritt klor til stede for at klor skal ha en desinfiserende effekt. I bekjempelse av biofilm har klor derfor en rolle som rengjøringsmiddel, for fjerning av biofilm (Stanga 2010). Kombinasjonen av tid, mekanisk fjerning, valg av kjemikalier og temperaturer vil som regel gi tilfredsstillende resultat ved fjerning av biofilm (Grinstead 2009).

### 2.3.3 Desinfeksjon og enzymatisk fjerning

Rengjøring etterfølges vanligvis av desinfisering. Anvendte desinfeksjonsmidler innen næringsmiddelindustrien kan deles inn i tensidbaserte, oksidative og alkoholbaserte desinfeksjonsmidler. Eksempler på aktive stoffer i desinfeksjonsmidler som benyttes i næringsmiddelindustrien, er kvartære ammoniumsforbindelser, amfotære tensider, pereddiksyre, hypokloritt, ozon, hydrogenperoksid og etanol (Forsker Solveig Langsrud 2013, personlig meddelelse). Felles for disse stoffene er at de har vist god effekt mot planktoniske bakterieceller i en løsning, men har som regel en lavere effekt på bakterier i biofilm (Simões et al. 2009). Det er vist at *S. aureus* i likhet med andre gram positive bakterier kan være mer følsom for tensidbaserte desinfeksjonsmidler enn hva som er tilfellet hos gram negative bakterier (Langsrud 2009). Faktorer som bestemmer virkningen av det aktuelle desinfeksjonsmidlet, er konsentrasjon, temperatur, pH, kontakt-tid, kjemiske inhibitorer og organisk smuss. Siden desinfeksjonsmidler fungerer dårligere ved tilstedeværelse av organiske materialer, er det vanlig å vaske før desinfeksjon i matindustrien. Det er ingen desinfeksjonsmidler som har en absolutt effekt på biofilm, det benyttes derfor ofte forskjellige antimikrobielle stoffer i en og samme prosess for å få en tilfredsstillende virkning (Simões et al. 2009). På grunn av biofilmens resistens mot konvensjonelle desinfeksjonsmidler er det forsket mye på alternative måter å få bukt med den uønskede bakterieveksten på.

Kommersiell DNaseI fra storfe benyttes ofte for hemming av biofilmdannelse innen human medisin (Nijland et al. 2010) Bruk av enzymbaserte vaskemidler kan også være en løsning for biofilmdannelse innen næringsmiddelindustrien, selv om dette ikke er utbredt. Enzymer flest vil inaktiveres ved høye temperaturer, og vil derfor være uegnet i produksjonsmiljø for mat (Simões et al. 2009). Fjerning av biofilm med enzymer en kompleks teknikk på grunn av

enzymenes spesifisitet. Det er derfor viktig med kunnskap om sammensetningen av biofilm for å finne egnede enzym for fjerning av biofilm (Chaignon et al. 2007).

Slik nevnt ovenfor er en viktig del av biofilmsyklusen oppløsning og spredning av enkeltceller til nye områder. Ved å studere de ulike mekanismene bak biofilmens oppløsning, er håpet å finne nye metoder for forebygging og fjerning, som er anvendelig for et bredt spekter av stammer (Hochbaum et al. 2011).

## **2.4 *Staphylococcus* spp.**

Overlevelse av *Staphylococcus* innen næringsmiddelindustrien er et problem. Det antas at overlevelse i miljøet skyldes bakterienes evne til å danne biofilm. Flere av stammene tilhørende *Staphylococcus* har denne evnen. *S. aureus* og *S. epidermidis* er begge stammer som er kjente for sin dannelse av ekstracellulær matriks (Izano et al. 2007).

Slekten *Staphylococcus* tilhører familien *Micrococcaceae*. Denne familien inneholder *Staphylococcus*, *Micrococcus* og *Planococcus* (Holt et al. 1994). Det er identifisert over 30 forskjellige arter av *Staphylococcus* (Lindsay 2011). Bakteriene som tilhører arten er gram positive, ubevegelige, ikke sporedannende kokker med en omkrets på 0,5 til 1,5  $\mu\text{m}$  i diameter. De opptrer enten alene eller i klynger av varierende størrelse. *Staphylococcus* er fakultativt anaerobe, kjemoorganotrofe og har både respirasjon og fermentativ metabolisme. De er som regel katalase-positive og oksidase-negative og koloniene er ofte kremfargede eller gule/oransje. Vanlig vekstoptimum for bakteriene er 30-37 °C. Bakteriene er svært salttolerante og kan vokse ved 10 % NaCl (Holt et al. 1994).

*Staphylococcus* finnes naturlig på hud og slimhinner hos pattedyr - ofte i forbindelse med sårddannelser. Om lag et dusin av artene isoleres hyppig fra mennesker. Dette er arter som *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus cohnii* og *Staphylococcus warneri*. Ulike egenskaper for stammene er gitt i Tabell 2.1. Felles for disse er at de kan skape sykdom hos mennesker, hvorav *S. aureus* peker seg ut som den mest aggressive patogene bakterien (Lindsay 2011).

**Tabell 2.1** Ulike egenskaper hos stammer av *Staphylococcus* (Holt et al. 1994).

Egenskap	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>
<b>Gulaktige kolonier</b>	+	-	(+)	-	-	(+)	-	(+)
<b>Vekst ved 10 % NaCl-agar</b>	+	-	+	+	+	-	+	+
<b>Vekst ved 15 % NaCl-agar</b>	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-
<b>Vekst ved 15 °C</b>	+	-	-	+	+	-	-	(+)
<b>Vekst ved 45 °C</b>	+	+	+	(+)	+	+	+	+
<b>Koagulase (kanin-plasma)</b>	+	-	-	-	-	-	-	-

\* + => 90 % av stammene er positive

\* - => 90 % av stammene er negative

\* (+) = 11-89 % av stammene er positive

#### 2.4.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* er en koagulase positiv bakterie. Slik det kommer frem av Tabell 2.1 kan bakterien vokse ved saltkonsentrasjoner opp mot 15 %, ved temperaturer ned mot 15 °C og opp til 45 °C (Holt et al. 1994). Matforgiftning som følge av *S. aureus* er regnet for å være en av de hyppigste årsakene til gastroenteritt på verdensbasis (Jørgensen 2005). *S. aureus* koloniserer slimhinner og svelg hos mennesker og varmblodige dyr og bakterien kan være årsak til et bredt spekter av lidelser; fra hudinfeksjoner og bakteriemi til matforgiftning og toksisk sjokksyndrom (Izano et al. 2007; Rørvik & Granum 2007). Selv om hovedreservoaret for *S. aureus* er dyr og mennesker, kan bakterien overleve og formere seg i miljø og næringsmidler ved riktige vekstbetingelser. Næringsmidler kontaminert av mennesker, er den største årsaken til en intoksikasjon av bakterien (Rørvik & Granum 2007). Matforgiftningen regnes som en intoksikasjon siden vekst i verten ikke er nødvendig for å gi sykdom (Jablonski & Bohach 1997). Selve sykdomsforløpet er kort og innebærer symptomer som kvalme, oppkast og diare. Mennesker og dyr kan være friske bærere av bakterien og det regnes med at ca. 20-50 % av mennesker er friske bærere. Det er mulig å skille mellom patogene, apatogene eller mindre patogene genus av bakterien ved å se på evnen til koagulaseproduksjon (Rørvik & Granum 2007). *Staphylococcus aureus* er tilpasningsdyktig og overlever ved svært tørre



forhold ( $\leq 0,86$  aw) (Rørvik & Granum 2007). Bakterien er imidlertid lite kompetitiv, og vil kun vokse der normal flora er inhibert eller ødelagt. Vekst av bakterien i næringsmidler skyldes derfor ofte rekontaminering eller dårlig kontroll på temperaturer (Rode et al. 2007). Flere arter av *Staphylococcus* kan produsere enterotoksin (SE). Dette gjelder både koagulase positive og negative stammer. Selv om flere arter har fått påvist denne aktiviteten, kan nesten alle tilfeller av matforgiftning av SE spores tilbake til *S. aureus*. Dette viser at det er en høyere forekomst av isolater som produserer SE blant *S. aureus*, enn hva tilfellet er hos andre arter. *S. aureus* regnes derfor som den viktigste matforgiftningsbakterien blant stafylokokkene (Jablonski & Bohach 1997). For at det skal dannes enterotoksin må forholdene ligge til rette. Generelt krever bakterien en temperatur rundt 15-18 °C i tre timer, for å danne nok enterotoksin til å forårsake sykdom. pH og vannaktivitet spiller også en viktig rolle for utviklingen av toksinet. *Staphylococcus aureus* er følsom for temperaturforskjeller og vil normalt inaktiveres ved vanlig pasteurisering. SE er derimot varmestabilt, og vil ikke inaktiveres av varme. Dette er årsaken til at kontaminert næringsmiddel vil gi en intoksikasjon selv om all mikrobiologisk aktivitet er inaktivert (Rørvik & Granum 2007).

#### **2.4.2 *Staphylococcus epidermidis* og andre koagulase negative *Staphylococcus***

*Staphylococcus epidermidis* er sammen med *Staphylococcus aureus* regnet som en av de vanligste bakteriene som isoleres fra infeksjoner hos mennesker (Izano et al. 2007). Bakterien er koagulase negativ, - og er en del av den naturlige mikrofloraen på huden hos mennesker. Slik det kommer frem av Tabell 2.1 vokser ikke *S. epidermidis* ved lave temperaturer eller med mye salt til stede. *Staphylococcus epidermidis* er sjelden patogen, men utgjør likevel et problem innen kliniske felt, da den ofte står for infeksjoner på implantater og lignende. De som rammes av slike infeksjoner er ofte pasienter med nedsatt immunforsvar (Holt et al. 1994; Queck & Otto 2008).

*Staphylococcus haemolyticus* er en koagulase negativ bakterie, som har en relativt lik genetisk organisering i kromosomet som *S. aureus* og *S. epidermidis* (Queck & Otto 2008). Bakterien kan vokse ved høye saltkonsentrasjoner, og temperaturer opp mot 45 °C. Tabell 2.1 viser at bakterien ikke vokser ved lave temperaturer (Holt et al. 1994). *Staphylococcus haemolyticus* kan forårsake infeksjoner som er typiske for koagulase negative *Staphylococcus*, slik som endokarditt, sepsis, infeksjoner i sår, implantater og urinveisinfeksjoner. I motsetning til *S. aureus* og *S. epidermidis*, er *S. haemolyticus* bedre egnet til overlevelse i næringsfattige omgivelser (Queck & Otto 2008).

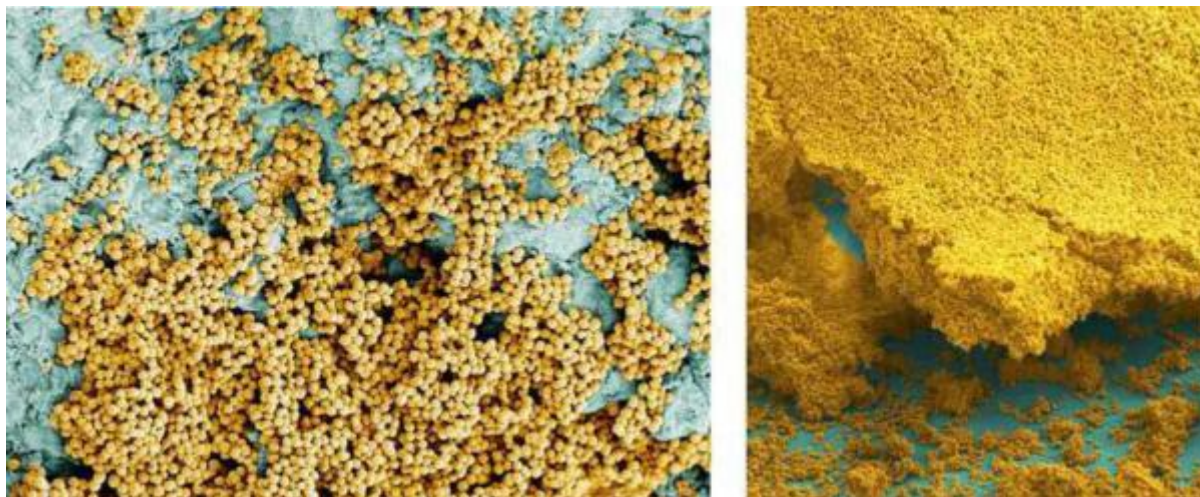
*Staphylococcus cohnii* er en koagulase negativ bakterie som hovedsakelig koloniserer på huden hos mennesker. Bakterien er også identifisert i sykehusomgivelser og næringsmiddelindustrien (Vinh et al. 2006). *Staphylococcus cohnii* kan vokse ved saltkonsentrasjoner opp mot 15 %, og ved temperaturer ned mot 15 °C og opp mot 45 °C slik vist i Tabell 2.1. Bakterien kan være bærer av plasmid som kan skape resistens til flere andre antibiotikum, blant annet novobiocin (Holt et al. 1994). *Staphylococcus cohnii* er i likhet med andre koagulase-negative bakterier, sjelden patogene (Vinh et al. 2006). Noen tilfeller har likevel vist at *S. cohnii* kan være delaktig i alvorlige lidelser, slik som hjerneabscess (Queck & Otto 2008).

*Staphylococcus simulans* er en koagulase negativ bakterie som kan være årsak til infeksjoner hos både dyr og mennesker (Queck & Otto 2008). Bakterien vokser ved 10 % salt, og temperaturer ned mot 15 °C og opp mot 45 °C (Holt et al. 1994). *Staphylococcus simulans* er ofte årsak til urinveisinfeksjoner, sepsis, sår - og ledd-infeksjoner, og er tillegg bærer av *S. aureus* Bap (biofilm assosiert protein) – genet, noe som tilsier at bakterien kan danne biofilm (Queck & Otto 2008).

*Staphylococcus capitis* blir også assosiert med urinveisinfeksjoner og sepsis. Bakterien er koagulase negativ og vokser ved temperaturer opp mot 45 °C. Bakterien vokser ikke ved lave temperaturer, slik vist i Tabell 2.1. Koagulase negative *Staphylococcus hominis* har generelt lav virulens (Queck & Otto 2008).

## **2.5 Biofilmdannelse hos *Staphylococcus* spp.**

Mekanismer som inngår i biofilmdannelse og oppløsning, er ikke ensartet hos alle bakterier. For å forstå de ulike metodene for oppløsning av biofilm hos *Staphylococcus*, er det nødvendig å se nærmere på sammensetningen av biofilmen. *Staphylococcus* biofilm består hovedsakelig av polysakkarid intercellulær adhesin (PIA), overflate-proteiner, teikoidsyre og ekstracellulært DNA. Sammensetningen av biofilmen vil variere fra stamme til stamme, og hvilke miljø den dannes i (Boles & Horswill 2011). Figur 2.2 viser et typisk eksempel på hvordan biofilm hos klinisk *S. aureus* kan se ut.



**Figur 2.2** Illustrasjon av klinisk *S. aureus* biofilm. Biofilmdannelse hos *S. aureus* utgjør store problem innen kliniske felt, og kan også være en årsak til overlevelse av bakterien innen næringsmiddelindustrien (Boles & Horswill 2011).

### 2.5.1 Intercellulær adhesin (PIA)

Flere *Staphylococcus* syntetiserer polysakkarid intercellulær adhesin (PIA). Denne biofilm-mekanismen er av de mest studerte hos *Staphylococcus* (O'Gara 2007). Hos *Staphylococcus aureus* er produksjon av PIA kodet av gener i *icaADBC*-operonet. Transkripsjonsrepressoren *icaR*, er plassert oppstrøms for *icaADBC*. Lignende operon er også blitt identifisert hos andre stafylokokker slik som *S. caprae*, *S. capitis* og *S. cohnii*, selv om dannelse av PIA ikke er blitt bekreftet hos disse stammene (Izano et al. 2007).

PIA er satt i sammenheng med egenskaper slik som abiotisk binding til overflater, intercellulær adhesjon, biofilmdannelse, resistens mot antibiotika og vaskemidler, og binding til epitelceller (Izano et al. 2007). Uttrykket av *ica*-operonet reguleres av omgivelsene og variasjoner mellom stammene. Det har blitt vist at modifisering av omgivelsene ved tilsetning av NaCl eller etanol til vekstmediet har en effekt på transkripsjonsrepressoren *icaR*. En slik tilsetning kan aktivere operonet og dermed bidra uttrykk av PIA (O'Gara 2007). Rode et al. (2007) viste at forhold relevante til næringsmiddelindustrien øker dannelsen av biofilm slik som temperatur, NaCl, glukose og etanol. Studien viste at en kombinert tilstedeværelse av NaCl og glukose øker dannelsen av biofilm og at både osmolaritet og temperaturer har en innvirkning på biofilm-assosierte gener slik som *icaA* og *rbf*. Rollen *ica* har for dannelse av biofilm varierer noe. Det er store variasjoner mellom stammer, og det er vist at uttrykk av operonet avhenger av vekstbetingelser (Crampton et al. 1999). Biofilm kan også dannes ved

hjelp av er *ica*-uavhengige mekanismer. Det er for eksempel påvist at enkelte MRSA-stammer danner PIA uavhengig av operonet (Fitzpatrick et al. 2005).

PIA har vært ansett som den viktigste biofilmkomponenten hos *Staphylococcus*. Nyere forskning viser imidlertid at PIA spiller en mindre rolle i *S. aureus* enn tidligere antatt. PIA-uavhengige biofilm-mekanismer kan ha en stor betydning for flere stammer (Boles & Horswill 2008).

### 2.5.2 Proteinbasert biofilm

For PIA-uavhengige biofilmer spiller adhesive proteiner en viktig rolle. Hos *S. epidermidis* har akkumulering-assosiert protein, Aap, vist seg å være en viktig faktor for PIA-uavhengig biofilmdannelse (Rohde et al. 2005). Aap er et 220 kD protein som må klyves til 140 kD for å ha en effekt på biofilmdannelse (Otto 2008). Hos *S. aureus* har overflateproteinet SasG en lignende funksjon. Begge proteinene befinner seg på overflaten til bakterien og danner en fibrill-lignende struktur som bidrar til celle til celle-interaksjoner og aggregering (Gruszkaa et al. 2012).

Hos mastittisolater av *S. aureus* har et cellevegg-bundet overflateprotein ved navn biofilm assosiert protein (Bap), vist seg å være involvert i festing til polystyrene overflater, celle til celle-interaksjoner og biofilmdannelse (Otto 2008). Et lignende protein, Bhp, er isolert fra humane stammer av *S. epidermidis*. Bap-lignende protein er også isolert fra andre bakterier, noe som indikerer at Bap overflateprotein har en utspredd rolle for biofilmdannelse. I likhet med Aap og SasG, kan Bap kompensere for andre biofilm-dannende mekanismer, slik som uttrykk av *ica* (Langsrud 2009).

B-toksin er et protein som har en strukturell rolle i *S. aureus*. Det antas at proteinet danner kovalente kryssbindinger mellom seg selv og eDNA. Denne bindingen vil være løselig ved proteinase. Det er imidlertid flere *S. aureus* som ikke har  $\beta$ -toksin. Hos disse stammene er det antagelig andre ukjente mekanismer som binder eDNA.

Nyere forskning har vist at *Staphylococcus aureus* danner en ekstracellulær fibrillstruktur, ved vekst i rike medier slik som PNG (pepton-NaCl-glukose). Disse fibrene har vist seg å være lik funksjonelle bakterielle amyloider, slik som TasA i *Bacillus subtilis* biofilm, og curli i *Escherichia coli*. Schwartz et al. (2012) viste i sin studie at denne proteinstrukturen er svært

stabil mot mekanisk stress og enzymatisk behandling. Ved biokjemiske og genetiske analyser ble det klart at fibrillstrukturen er bygget opp av små peptider ved navn «phenol soluble modulins» (PSMs). Tidligere studier har vist at PSM er en viktig virulensfaktor for MRSA-stammer og fører blant annet til oppløsning av biofilm (Schwartz et al. 2012). Studien viste at en aggregering av PSM-peptider til amyloid-like fibre opphevet PSMs biofilmløsende aktivitet.

### 2.5.3 Ekstracellulært DNA

Ekstracellulært DNA (eDNA) ble først oppdaget som en komponent i biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Deretter har flere studier viser at ekstracellulært DNA spiller en viktig rolle som biofilmkomponent hos en rekke stammer (Mann et al. 2009). eDNA er en utbredt del av organisk materiale. eDNA finnes også i vevskulturer og blod hos pattedyr, antagelig som følge av cellelysis, eller frigjøring av vesikler. Det finner flere mekanismer for frigjøring av eDNA. Hos *S. aureus* antas det at celledød og lysis kontrolleres av *cid* og *lgr*-operoner. Det har vært vist at en mutasjon i disse genene gir en svakere biofilmdannelse hos *S. aureus*. Dette viser at eDNA utgjør en viktig komponent i biofilm hos *S. aureus* (Mann et al. 2009). Tilstedeværelse av eDNA bidrar til initierende binding av bakterien til overflater celle til celle-interaksjoner hos *Staphylococcus* (Harmsen et al. 2010). Izano et al. (2007) viste i sin studie at eDNA er en strukturell komponent som er viktig i biofilmdannelse hos både *S. aureus* og *S. epidermidis*, selv om komponenten antagelig utgjør en større del av biofilmen hos *S. aureus*.

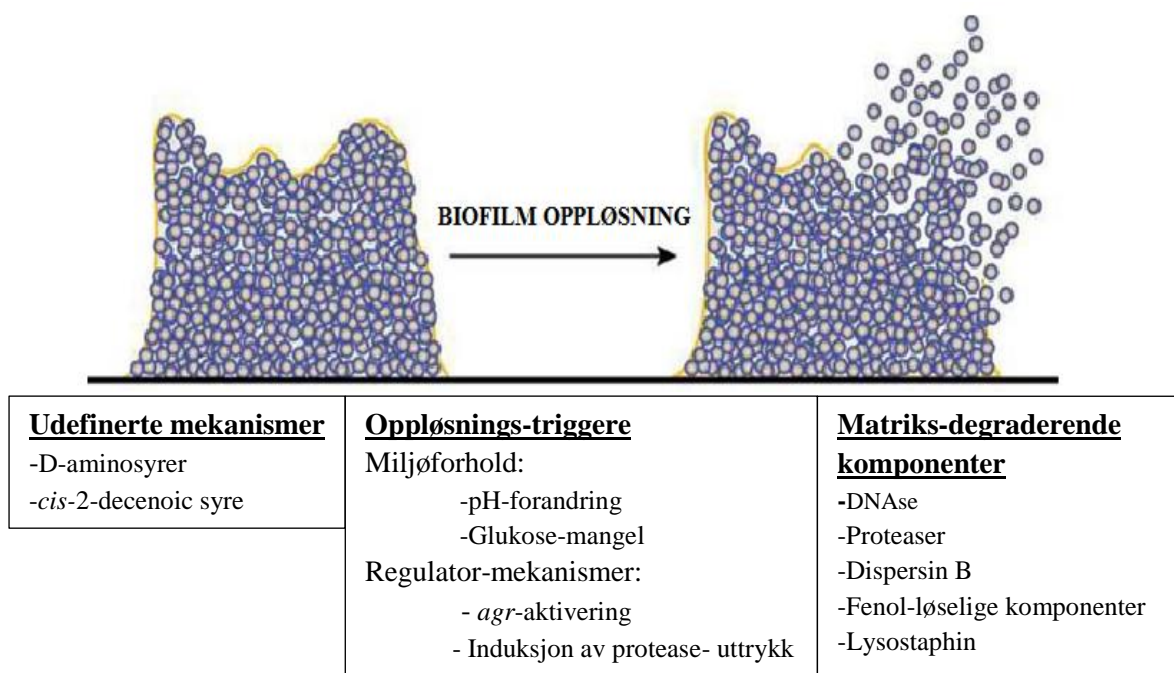
### 2.5.4 Teikoidsyre

Teikoidsyrer finne i både *S. aureus* og *S. epidermidis*, og i mange andre gram positive bakterier. Teikoidsyrene kan være inkorporert i celleveggen eller de kan være forankret til cellemembranen, festet med lipider. Komponentene spiller en viktig rolle i initierende binding til overflater (Otto 2008). Teikoidssyrer i *S. aureus* er satt sammen av alternerende fosfat, ribitol eller glyserolgrupper som erstattes med D-alanin og N-acetylglukosamin. I utgangspunktet er celleoverflaten hos *S. aureus* negativt ladet på grunn av færre positivt ladede D-alanin enn negativt ladede fosfat-grupper. Det er vist at en økt mengde D-alanin i teikoidsyrer er nødvendig for dannelse av biofilm hos *S. aureus*, da de forandrer nettoladningen på overflaten til bakterien som igjen gir en økt kapasitet til å feste seg til overflater (Gross et al. 2001). Stammer med en mutasjon i *dlt*-operonet, som er ansvarlig for inkorporeringen av D-alanin inn i teikoidsyrene, har en større negativ ladning på overflaten.

Dette gjør at stammen ikke kan kolonisere glass eller polystyren, selv om den er i stand til å produsere PIA (Gross et al. 2001).

## 2.6 Løsning av biofilm hos *Staphylococcus* spp.

Ulike reguleringsmekanismer og komponenter inngår i oppløsning av biofilm hos *Staphylococcus* (figur 2.3). Molekylære mekanismer trigger oppløsning av biofilm ved produksjon av ekstracellulære enzymer, tensider og lignende (Boles & Horswill 2011). Nyere forskning viser også at D-aminosyrer og norspermidin kan ha en oppløsende effekt på *S. aureus* biofilm (Kolodkin-Gal et al. 2010). Det antas at miljøfaktorer har mye å si for aktivering av ulike mekanismer. Per i dag er imidlertid mangel på glukose i vekstmediet, den eneste kjente miljøfaktoren som har en direkte innvirkning på oppløsning av biofilm (Boles & Horswill 2011).



**Figur 2.3** Modell av kjente triggere og mekanismer for oppløsning av biofilm hos *Staphylococcus* (Boles & Horswill 2011).

### 2.6.1 Regulering av biofilmoppløsning; *agr*-systemet

En viktig del av bakterielle biofilmer er evne til kommunikasjon mellom cellene ved hjelp av quorum sensing-system (O'Gara 2007). Dette er intercellulær kommunikasjon hvor cellene sørger for kontakt mellom hverandre. Kommunikasjonen kan ved enkelte tilfeller skje uavhengig av slektstilhørighet. Slik kan cellene regulere og samordne en rekke fysiologiske aktiviteter slik som symbiose, virulens og biofilmproduksjon (Miller & Bassler 2001).

Quorum sensing skjer ved hjelp av signalmolekyler (auto-indusere, - AIP) som konstant frigjøres fra cellene. Når celletettheten og konsentrasjon av AIP blir for høyt, vil det være et signal til cellene om å undergå ett nytt genetisk program, som vil være det beste for populasjonen som helhet (Geisinger 2008). AIP finnes som en rekke kjemiske sammensetninger. Generelt vil en AIP hos gram negative bakterier være acetyleret homoserine laktoner, mens gram positive bakterier benytter ofte oligo-peptider til å kommunisere (Miller & Bassler 2001).

Systemet for kommunikasjon som er mest beskrevet hos *Staphylococcus*, er accessory genregulator (*agr*) systemet (Miller & Bassler 2001). Mens Quorum sensing system er nødvendig for dannelse av en robust biofilm hos en rekke bakterier, er det motsatte tilfellet for *S. aureus* (Boles & Horswill 2008). Celle-til-celle kommunikasjon hos *S. aureus* er mest assosiert med oppløsning av biofilm. *agr* koder for proteinet  $\delta$ -toksin med overflateegenskaper som i en kombinasjon med nedregulering av overflate-adhesin, antas å ha en betydning for oppløsningen av biofilmen (Yarwood et al. 2007). I en studie av Yarwood et al. (2004) ble det vist at *S. aureus* som spres fra en biofilm har en høy *agr*-aktivitet, mens bakterieceller som blir værende i en biofilm har undertrykte *agr*-system. Dette bekrefter forskning som peker på at stammer med utilstrekkelige *agr*-system danner mer robuste biofilmer (Boles & Horswill 2008). Miljøforhold spiller en rolle for *agr* sin innvirkning på biofilmens utvikling. For eksempel vil tilsetning av faktorer som hemmer uttrykket av *agr* føre til økt biofilmdannelse. Det er vist at glukose hindrer uttrykk av *agr*. Dette ble vist ved at TSB medium tilsatt 0,2 % glukose (TSBg), førte til en økning i dannelse av biofilm hos *S. aureus*. Dette forklarer også hvorfor glukose i vekstmediet øker dannelse av biofilm. Avhengig av miljøfaktorer, vil *agr* fungere som en av og på-knapp mellom biofilmdannelse og planktonisk tilstand hos *S. aureus* (Boles & Horswill 2008).

### 2.6.2 D- aminosyrer og norsperimidin

Det er kjent at enkelte bakterier syntetiserer D-aminosyrer. Disse akkumuleres i millimolare konsentrasjoner i superantanten når bakteriene befinner seg i den stasjonære fasen (Lam et al. 2009). D-aminosyrer genereres av racemacer som katalyserer en isomerisering fra L til D-aminosyrer (Kolodkin-Gal et al. 2010). D-aminosyrer kan bidra til å forhindre dannelse av biofilm. Kolodkin-Gal et al. (2010) viste i sin studie at *Bacillus subtilis* produserer en faktor som forhindrer dannelse av biofilm, og som også virker oppløsende på allerede eksisterende biofilmer. Denne faktoren har vist seg å være en sammensetning av D-leucin, D-methionin,

D-tyrosin og D-tryptofan. L-isomerer av aminosyrene, samt D-alanin og D-fenylalanin hadde ingen effekt. Studien undersøkte om hver D-aminosyre hadde en effekt mot biofilm alene. Forsøket viste at de ulike D-aminosyrene hadde varierende effekt. D-tyrosin med en konsentrasjon på 3  $\mu$ M, hadde en større effekt på oppløsning av biofilm enn D-methionin (2 mM), D-tryptofan (5 mM) og D-leucin (8,5 mM). En kombinasjon av D-aminosyrene hadde likevel best effekt, noe som indikerer at D-aminosyrene har en synergisk effekt på hverandre (Kolodkin-Gal et al. 2010). Forsøk med *S. aureus* har vist at en blanding av D-tyrosin, D-prolin og D-fenylalanin er mer effektiv i hemming av biofilmdannelse enn D-aminosyrene som løste opp biofilm hos *B. subtilis*. Dette indikerer at det er forskjeller i hvordan D-aminosyrer inkorporeres i celleveggen, eller forskjell i respons på inkorporering av unormale D-aminosyrer hos *B. subtilis* og *S. aureus*.

*Bacillus subtilis*-biofilm består av eksopolysakkarider og amyloide fibre satt sammen av proteinet TasA. TasA er festet til celleveggen hos *B. subtilis*. D-aminosyrene løser opp biofilm ved at de erstatter terminalt D-alanin i sidekjedene på peptidoglykanet. Dette løser opp TasA sin forankring til celleveggen, og fører til at de amyloide fibre blir frigjort fra cellene (Kolodkin-Gal et al. 2010). Hochbaum et al. (2011) viser i sin studie at D-aminosyrene antagelig har lik effekt hos *S. aureus*. Det er vist at D-aminosyrer ikke har en innvirkning på polysakkarid-komponentene i *S. aureus* biofilm. D-aminosyrene har ingen effekt på bakterienes evne til å feste seg til overflater, men hindrer dannelse av større celleansamlinger (Hochbaum et al. 2011).

I motsetning til D-aminosyrer har tilsvarende L-aminosyrene ingen effekt på løsning av *Staphylococcus* biofilm, og effekten av biofilmløsende D-aminosyrer kan bli forhindret ved tilsetning av D-alanin (Hochbaum et al. 2011). Dette bekrefter teorien om at D-aminosyrer blokkerer biofilmdannelse ved å ta plassen til D-alanin i peptidkjeden (Kolodkin-Gal et al. 2010). Siden mange bakterier produserer D-aminosyrer er det antatt at de inngår som en del av bakterienes mekanisme for å løse opp biofilm (Kolodkin-Gal et al. 2010).

I tillegg til D-aminosyrer produserer *Bacillus subtilis* en annen faktor som også har en oppløsende effekt på biofilm-matriks; norspermidin. Forsøk viser at norspermidin har en direkte interaksjon med EPS, hvor den i samarbeid med D-aminosyrer bryter ned allerede eksisterende biofilmer. Kolodkin-Gal et al. (2012) viste at mutanter som har blokkert produksjon av D-aminosyrer og norspermidin, danner pellickel som ikke blir løst opp over tid



(Kolodkin-Gal et al. 2012). Forsøket viste at norspermidin og D-aminosyrer har ulike mekanismer for oppløsning av biofilm. Mens D-aminosyrer har en effekt på amyloide fibre bygd opp av proteiner, virker norspermidin direkte på eksopolysakkaridene. Nært beslektede polyaminer, slik som spermidin har liten effekt på hemming av biofilm (Kolodkin-Gal et al. 2012). Samme forsøk viste at norspermidin også hindrer biofilmdannelse hos *E. coli* og *S. aureus*. Mekanismene bak bakterienes produksjon av norspermidin og D-aminosyrer, og hvorfor det ikke skjer før sent i biofilmsyklusen, er ennå ikke fullt forstått (Kolodkin-Gal et al. 2012).

### 2.6.3 Enzymer og oppløsning av biofilm

De mest kjente mekanismene for oppløsning av biofilm hos *Staphylococcus*, er dannelsen av ekstracellulære enzymer og tensider som degraderer og løser opp adhesive komponenter i biofilmen. Disse faktorene reguleres ofte *agr*-systemet (Boles & Horswill 2011). Kjente matriks-degraderende enzym er glykosidaser, proteaser og deoksyribonukleaser (Kaplan 2010). Flere *Staphylococcus* kan danne proteaser og DNase (Boles & Horswill 2011; Nijland et al. 2010). Munnbakterien *Actinobacillus actinomycetemcomitans* er en stamme som danner Dispersin B ved egenmediert oppløsning av biofilm. Dispersin B er en  $\beta$ -hexosaminidase som hydrolyserer de glykosidiske bindingene i PIA (Boles & Horswill 2011). Ingen stammer tilhørende *Staphylococcus* har vist evne til å danne det PIA-degraderende enzymet (Chaignon et al. 2007).

Tidligere studier har analysert den kjemiske sammensetningen av biofilm hos implantatrelaterte *Staphylococcus* og kommet frem til at *Staphylococcus* hovedsakelig kan deles inn i to grupper; *Staphylococcus* som danner biofilm basert på PIA, og *Staphylococcus* som danner biofilm der PIA ikke inngår som en viktig komponent. Slik biofilm er som regel bygd opp av ulike proteiner, ekstracellulært DNA og teikoidsyrer (Chaignon et al. 2007; Kogan et al. 2005). Det er kjent at biofilmer som lar seg bryte ned av proteinase og trypsin er bygd opp av en stor bestanddel av proteiner. Stammer med biofilm som brytes ned ved hjelp av DNase har eDNA som en betydelig del av sin biofilm, mens biofilm som degraderes av dispersin B vil være sammensatt av polysakkarider slik som PIA (Izano et al. 2007). Enzymatisk oppløsning av biofilm er derfor knyttet til den kjemiske sammensetningen av biofilmen.

Det er vist PIA fungerer forskjellig hos *S. aureus* og *S. epidermidis*. Izano et al. (2007) viste i sin studie at dispersin B, løste opp biofilmer dannet av *S. epidermidis*, mens enzymet hadde liten effekt på biofilmer laget av *S. aureus*. Dette er en indikasjon på at PIA utgjør en stor del av biofilm hos *S. epidermidis*, men en mindre komponent av biofilmer dannet av *S. aureus*. Izanos studie undersøkte også rollen til eDNA hos *S. aureus* og *S. epidermidis*, og konkluderte med at ekstracellulært DNA utgjør en viktig del av biofilmen hos begge stammene. Studien pekte likevel på at eDNA antagelig utgjør en større del av biofilmen hos stammer av *S. aureus* (Izano et al. 2007). Chaignon et al. (2007) undersøkte effekten av ulike enzym på biofilmdannelse hos ulike kliniske stammer av *Staphylococcus*. I forsøket ble blant annet proteinase K, trypsin og dispersin B benyttet, sammensetningen av biofilmen hos de ulike stammene var kjent på forhånd. Forsøket viste at dispersin B har en oppløsende effekt på PIA og at enzymet ikke er like effektivt ovenfor stammer som ikke produserer PIA.

Proteinase K og trypsin er proteolytiske enzym med ulik substratsspesifisitet. Proteinase K klyver peptidbånd hos alifatiske, aromatiske og hydrofobiske aminosyrer, mens trypsin er spesifikk for peptidbåndene hos lysin og arginin (Chaignon et al. 2007). I Chaignons forsøk hadde ingen av proteasene effekt på oppløsning av PIA-rike biofilmer, som er vanlig for *S. epidermidis*. Enzymene hadde imidlertid en effekt på enkelte stammer av *S. aureus*, noe som indikerer en biofilm satt sammen av proteinkomponenter. Forsøket viste også at de to proteasene har noe ulik effekt på forskjellige stammer. Dette gir en indikasjon på at ulike stammer av *Staphylococcus* har ulik sammensetning og komposisjon av biofilmen (Chaignon et al. 2007). Hos *S. aureus* har det vært vist at en fjerning av gener som koder for proteaser, har ført til økt dannelse av biofilmdannelse, og mindre løsning av biofilm, selv ved aktivering av *agr*. Videre er det vist at protease-inhibitorer øker biofilmdannelse hos *S. aureus* under forhold som vanligvis favoriserer oppløsning av biofilm (Boles & Horswill 2011).

*agr* kan mediere oppløsning av biofilm ved å oppregulere extracellulære proteaser hos *S. aureus*. En aktivering av *agr* quorum sensing-systemet vil også regulere ned en del overflateproteiner. Hensikten bak *agr*-mediert frigjøring av proteaser er noe uklar. Antagelig er hensikten å angripe overflate-adhesin som befinner seg i ulike overflateprotein slik som Bap, Atl og SasG som alle er involvert i dannelse av biofilm (Boles & Horswill 2008).

### 3 Materialer og metoder

#### 3.1 Bakteriestammer

Bakteriestammene benyttet i dette forsøket var ulike arter av *Staphylococcus*. Flere av stammene ble valgt på grunn av evne til biofilmdannelse i tidligere forsøk. Stammene hadde ulikt opphav. Noen stammer var isolert fra næringsmiddelindustrien, mens andre er kjente laboratoriestammer. Oversikt og opphav til de ulike stammene er gitt i Tabell 3.1

**Tabell 3.1** Oversikt over ulike stammer av *Staphylococcus* brukt i oppgaven

Nofima stamnummer (MF)	Art	Opphav
1890	<i>S. aureus</i>	RN4220
3230	<i>S. aureus</i>	NCTC8325
1813	<i>S. aureus</i>	Fjørfe-bedrift
1784	<i>S. aureus</i>	Fjørfe-bedrift
3675	<i>S. aureus</i>	Rømme, utbrudd
3674	<i>S. aureus</i>	MRSA sykehusinfeksjon
3715	<i>S. aureus</i>	Geitost
3714	<i>S. aureus</i>	Pizza, utbrudd
2009	<i>S. aureus</i>	ATCC6538
3672	<i>S. aureus</i>	Røkt ørret
3671	<i>S. aureus</i>	Frossen hake nuggets (fisk)
1981	<i>S. aureus</i>	ATCC12600
4698	<i>S. saprophyticus</i>	Fiskeførfabrikk
1904	<i>S. saprophyticus</i>	Rødt kjøtt anlegg
2065	<i>S. saprophyticus</i>	Fjærkre foredlingsanlegg
1886	<i>S. saprophyticus</i>	ATCC15305
GB II-83-03	<i>S. saprophyticus</i>	Kjøttbedrift
1789	<i>S. epidermidis</i>	Fjærkre foredlingsanlegg
2601	<i>S. epidermidis</i>	ATCC35894
0812-15-8	<i>S. piscifermentans</i>	Fôrfabrikk
4713	<i>S. piscifermentans</i>	Fiskeførfabrikk
3723	<i>S. equorum</i>	Småskala osteprodusent G
2321	<i>S. equorum</i>	Gulv, påleggsavdeling kyllingbedrift
3788	<i>S. equorum</i>	Småskala osteprodusent DK
3722	<i>S. equorum</i>	Småskala osteprodusent D
1844	<i>S. cohnii</i>	Fjærkre foredlingsanlegg
1834	<i>S. cohnii</i>	Fjærkre foredlingsanlegg
1891	<i>S. cohnii</i>	NCTC11041
3624	<i>S. cohnii</i>	Slakteri rødt kjøtt
1872	<i>S. capitis</i>	Fjærkre foredlingsanlegg
1871	<i>S. capitis</i>	Baguett
2613	<i>S. simulans</i>	ATCC27848
3625	<i>S. simulans</i>	Slakteri rødt kjøtt
3287	<i>S. warneri</i>	Svaber fra fotbad med klor, meieri
1862	<i>S. lentus</i>	Fjærkre foredlingsanlegg
4658	<i>Staphylococcus sp.</i>	Kjøttbedrift, påleggsmaskin

### 3.2 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer

Alle stammene ble oppbevart ved - 80 °C, i eppendorfrør med vekstmedium og 20 % glycerol. Ved bruk ble stammene strøket ut på Trypton Soya Agar (TSA) og inkubert i 24 timer ved 30 °C. TSA-skålene med oppdyrket kultur ble oppbevart ved 4 °C. Det ble dannet en overnatkultur ved å plukke enkeltkolonier som ble inokulert i Trypton Soya Buljong (TSB) i ca. 24 timer ved 30 °C.

### 3.3 Medier

Alle mediene ble sterilisert ved autoklaving i 15 min ved 121 °C. Flaskene med buljong ble lagret i romtemperatur, mens agarskålene ble oppbevart ved 4 °C. I denne oppgaven ble følgende medier benyttet:

- Tryptone soya agar (TSA)
- Tryptone Soya Broth (TSB)
- Tryptone Soya Broth + 2 % glukose + 0,5 % NaCl (TSBNG2)
- Tryptone Soya Broth + 0,33 % glukose + 0,26 % NaCl (TSBNG)
- Tryptone Soya Broth + 2 % glukose + 2 % NaCl (TSBind)

TSA og TSB er fra Oxoid Ltd., Hampshire, England. D-glukose monohydrat og NaCl er fra Merck, Darmstadt, Tyskland. Tilberedning av medier er beskrevet i vedlegg 1.

### 3.4 Løsninger

Alle stamløsningene av aminosyrer, norsperimidin og enzymer ble sterilfiltrert (0,2 µm Steril Syringe filter, VWR, International). Løsningene av aminosyrene ble oppbevart i ved 4 °C. Norsperimidin ble oppbevart ved romtemperatur. Løsninger med enzymer ble oppbevart ved - 18 °C. Følgende løsninger ble benyttet i oppgaven;

#### Stamløsning for løsning av biofilm i mikrotiterplater

- D og L-Fenylalanin
- D og L-Leucin
- D og L-Tyrosin
- D og L-Methionin

- D og L-Tryptofan
- D-Prolin
- D-Alanin
- Norsperimidin
- DNase
- Dispersin B
- Proteinase K

D og L-aminosyrer, norsperimidin, DNase, proteinase og trypsin er fra Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Dispersin B er fra Kane Biotec Inc. USA. Oversikt over konsentrasjon på stamløsninger og løsningsmiddel er gitt i vedlegg 2.

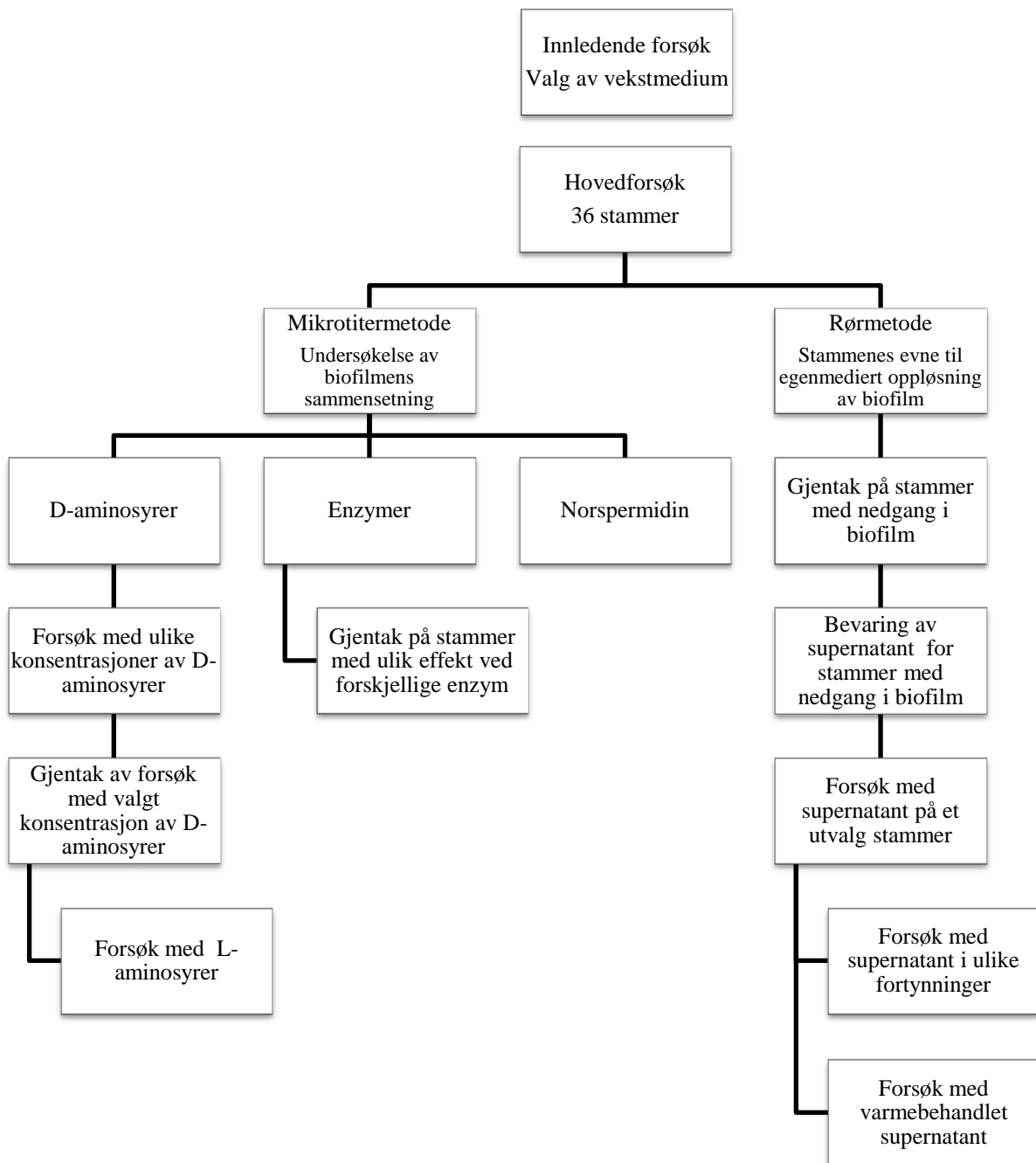
#### Farging og oppløsning av biofilm

- Krystallviolett 0,1 % (0,5 g i 500 ml dH<sub>2</sub>O)
- Surgjort etanol 0,2 % HCl (2 ml 37 % HCl i 1000 ml etanol)

Krystallviolett og 37 % HCl er fra Merck, Darmstadt, Tyskland. Etanol er fra Kemytol, Norge.

### **3.5 Forsøksoppsett**

Figur 3.1 viser et flytskjema av forsøksoppsett for denne oppgaven. I utgangspunktet ble det gjort forsøk på 36 stammer av *Staphylococcus*. Hensikten var å se på effekt av enzymer, D-aminosyrer og norsperimidin på biofilmdannelse hos de ulike stammene, og om stammene hadde egenmediert oppløsning av biofilm. Stammer med lite biofilmdannelse ble derfor utelatt fra forsøket. Stammer som hadde en interessant effekt ved de ulike metodene ble testet videre i forsøket.



**Figur 3.1** Figuren gir en oversikt over forsøk som ble utført i denne oppgaven.

### 3.6 Innledende forsøk, valg av vekstmedium for biofilmstudier

Tidligere forsøk har vist økende biofilmdannelse med NaCl og glukose i vekstmediet. Det er kjent at en slik modifisering av vekstmediet vil kunne aktivere *ica*-operonet, noe som øker syntetiseringen av PIA hos *Staphylococcus* (O'Gara 2007; Rode et al. 2007).

Et utvalg stammer ble derfor podet i fire forskjellige vekstmedium, med ulik anrikning av glukose og NaCl. Hensikten var å se hvilket medium som ga best biofilmdannelse hos de fleste stammene. Rode et al. (2007) benyttet en rekke ulike konsentrasjoner av glukose og NaCl i sin studie. I dette forsøket ble lignende sammensetninger av vekstmedier benyttet.

Følgende konsentrasjoner ble tilsatt i TSB; 0,33 % glukose og 0,26 % NaCl (TSBNG), 2 % glukose og 0,5 % NaCl (TSBNG2) og 2 % glukose og 2 % NaCl (TSBind). TSBind har tidligere vært benyttet i en studie av Møretrø et al. (2003). Disse konsentrasjonene kom i tillegg til 0,25 % glukose og 0,5 % NaCl som vanlig TSB inneholder.

Det ble sett på biofilmdannelse i mikrotiterbrett og reagensrør. Med bakgrunn i dette forsøket, ble det valgt ett medium til hovedforsøket. Følgende stammer ble benyttet i innledende forsøk;

- MF 3714 - *S. aureus*, isolert fra matbårent utbrudd
- MF 3675 - *S. aureus*, isolert fra matbårent utbrudd
- MF 1844 - *S. cohnii*, isolert fra fjærkre foredlingsanlegg
- MF 1813 – *S. aureus*, isolert fra fjærkre foredlingsanlegg
- MF 1890 – *S. aureus*, labstamme, ofte benyttet i biofilmstudier

Stammene ble sjekket for renhet, dyrket opp på TSA, og podet over til reagensrør med 3 ml TSB. Inokulerte rør ble inkubert ved 30 °C og 150 rpm risting til neste dag. Kulturen ble deretter benyttet til forsøk i reagensrør og mikrotiterbrett.

### 3.6.1 Biofilmdannelse i mikrotiterplater med ulike vekstmedier

Det ble tilsatt 100 µl medium til hver brønn i et polystyren mikrotiterbrett, 96 brønner (BD Falcon™, USA). I kontrollprøven ble det tilsatt 200 µl.

Det ble lagt opp 3 parallelle brønner for hver stamme og medium. Deretter ble det tilsatt 100 µl av 1:100-fortynning av overnatkkulturen.

Mikrotiterbrettet ble inkubert ved 30 °C. Etter 2 dager ble det målt OD<sub>600nm</sub> (SpectroStar Nano, BMG Labtec, Tyskland) som mål på total vekst. Kulturen ble helt av og brettet ble vasket med dH<sub>2</sub>O med en platevasker (Wellwash AC, Thermo Electron Corporation, USA). Programmet ble innstilt på to vasketrinn ved fjerning av kultur. Det ble deretter tilsatt 200 µl 0,1 % krystallviolett. Brettene ble farget i fire minutter før de igjen ble vasket med platevasker, for å få bort overflødig farge. Ved fjerning av krystallviolett ble vaskeprogrammet innstilt på tre vasketrinn.

Det ble tilsatt 200 µl surgjort etanol for å løse ut fargestoff. Brettene ble behandlet med surgjort etanol i to minutter, ved risting. (Vari-shaker, Dynatec, Askim, Norge) for å forsikre at all fargen ble løst ut. 100 µl av utvasket farge ble overført til et nytt mikrotiterbrett og det ble målt OD<sub>600nm</sub> som et mål på biofilmdannelse.

### 3.6.2 Biofilmdannelse i reagensrør med ulike vekstmedier

30 µl av overnatkkulturen ble podet til nye reagensrør med tre ml av de forskjellige vekstmediene. Det ble tatt med rør som ikke ble inokulert som kontroll. Blank ble et mål på OD<sub>600</sub>-verdien av vekstmediet. Denne verdien ble trukket fra OD<sub>600</sub> for biofilmdannelse.

Rørene ble inkubert ved 30 °C ved 150 rpm risting. Etter to dager ble mediet helt av. Det ble observert og notert eventuelle synlige spor av biofilm. Rørene ble deretter vasket tre ganger med destillert vann.

De vaskede reagensrørene ble tilsatt fire ml 0,1 % krystallviolett i fire minutt. Fargeløsningen ble helt av og biofilmen ble observert. Det ble deretter vasket fire ganger med destillert vann til all løs farge var borte. Fargestoffet ble løst opp ved å tilsette fire ml surgjort etanol. Det utløste fargestoffet ble overført til en kyvette og det ble målt OD<sub>600</sub> nm i et spektrofotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotec, USA)



## 3.7 Mikrotitermetode; biofilm i mikrotiterplater

### 3.7.1 Effekt av D-aminosyrer, norspermidin og enzymer på biofilmdannelse i mikrotiterplater

Det er kjent at den kjemiske sammensetningen av biofilm hos *Staphylococcus* har en innvirkning på hvordan biofilmen reagerer på ulike enzymer (Chaignon et al., 2007). På bakgrunn av dette ble ulike enzymer testet på alle stammene. Det er også vist at enkelte D-aminosyrer hemmer biofilmdannelse hos *S. aureus* (Chaignon et al. 2007; Kolodkin-Gal et al. 2010). Det ble derfor undersøkt om D-aminosyrer har effekt på andre stammer av *Staphylococcus*. Nyere forskning viser at *B. subtilis* danner den biofilmoppløsende komponenten norspermidin, og at denne komponenten har en oppløsende effekt på biofilm hos *S. aureus* (Kolodkin-Gal et al. 2012). Norspermidin ble også testet i denne oppgaven.

Det ble testet effekt av D-aminosyrer, norsperimidin og enzymer på biofilm i mikrotiterbrett. Undersøkelser av biofilmløsning i mikrotiterbrett er en metode som er benyttet i flere studier. I de fleste studiene behandles biofilmen med enzymer etter endt inkubering (Izano et al. 2007; Kaplan et al. 2004). Ved forsøk med D-aminosyrer har det i tidligere forsøk blitt tilsatt D-aminosyrer i vekstmediet før inkubering (Hochbaum et al. 2011). I dette forsøket ble alle biofilmhemmende komponenter tilsatt i vekstmediet før inkubering.

Forsøket ble utført med samme metode slik beskrevet i kapittel 3.6.1. Vekstmedium og stamløsning ble blandet før pipettering over i mikrotiterplate. Blandingen stammeløsning og vekstmedium ble laget 10 % sterkere enn ønsket sluttkonsentrasjon. 180 µl av denne blandingen ble pipettert over i mikrotiterplater før tilsetning av 20 µl 1:100-fortynning av overnattekulturen av hver enkelt stamme ble tilsatt. Det ble laget to paralleller for hver stamme. Hvert Brett hadde blanke brønner, uten tilsatt bakteriestammer. Blank ble et mål på OD<sub>600</sub>-verdien av vekstmedium. Denne verdien ble trukket fra OD<sub>600</sub> for biofilmdannelse.

Innledningsvis ble alle stammene testet ved denne metoden. Utvalgte stammer med god biofilmdannelse ble valgt ut videre i forsøket. Det ble sett nærmere på hvilke stoffer som hindret biofilmdannelse, og i hvilken grad biofilmdannelse ble hindret. Oversikt over stoff og konsentrasjon er gitt i Tabell 3.2.

**Tabell 3.2** Oversikt over stoffer og konsentrasjon under inkubering

<b>Stoff</b>	<b>Konsentrasjon under inkubering</b>	<b>Kommentar</b>
<b>D-prolin</b>	0,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. aureus</i> (Hochbaum et al. 2011)
<b>D-fenylalanin</b>	0,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. aureus</i> (Hochbaum et al. 2011)
<b>D-tryptofan</b>	5,0 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. aureus</i> (Hochbaum et al. 2011)
<b>D-leucin</b>	8,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>B. subtilis</i> (Kolodkin-Gal et al., 2010)
<b>D-methionin</b>	2,0 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>B. subtilis</i> (Kolodkin-Gal et al. 2010)
<b>D-tyrosin</b>	0,5 mM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. aureus</i> (Hochbaum et al. 2011)
<b>DNase</b>	100 µg/ml	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. epidermidis</i> og <i>S. aureus</i> , (Harmsen et al. 2010)
<b>Dispersin B</b>	50 µg/ml	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. epidermidis</i> , (Itoh et al. 2004)
<b>Proteinase</b>	100 µg/ml	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. lugdunensis</i> og <i>S. warneri</i> (Kogan et al. 2005)
<b>Trypsin</b>	100 µg/ml	1 mg/ml konsentrasjon benyttet med <i>S. aureus</i> og <i>S. lugdunensis</i> (Chaignon et al. 2007)
<b>Norsperimidin</b>	200 µM	Konsentrasjon tidligere benyttet med <i>S. aureus</i> (Kolodkin-Gal et al. 2010)

### *Ulike konsentrasjoner av aminosyrer*

De ulike D-aminosyrene ble testet i forskjellige konsentrasjoner. Formålet var å undersøke om D-aminosyrene hadde en hemmende effekt på biofilmdannelse, uten å hemme vekst av bakterien. Forsøket ble utført med samme prosedyre som beskrevet ovenfor. Valgt konsentrasjon fra dette forsøket ble benyttet ved gjentak av forsøk, og forsøk med L-aminosyrer og D-alanin.

### ***Effekt av D-alanin og L-aminosyrer***

D-alanin finnes naturlig i celleveggen hos flere bakterier. Om D-aminosyrer erstatter D-alanin i celleveggen vil dette føre til en oppløsning av biofilm. Kolodkin-Gal et al. (2010) viste i sitt forsøk at tilsetning av D-alanin til en bakteriekultur, forhindret effekten av D-aminosyrene. Det ble undersøkt om D-alanin hadde en effekt på biofilmdannelse eller oppløsning, ved å tilsette D-alanin i en konsentrasjon på 2,0 mM, til kulturer i en polystyren mikrotiterplate, slik beskrevet ovenfor. Konsentrasjonen ble valgt på bakgrunn av forsøk med ulike konsentrasjoner.

Kolodkin-Gal et al. (2010) viste i sin studie at L-aminosyrer ikke har samme effekt på oppløsning av biofilm, som D-aminosyrer. Konsentrasjoner av L-aminosyrer ble valgt på bakgrunn av forsøk med ulike konsentrasjoner (beskrevet ovenfor). Det ble valgt en konsentrasjon på 2,0 mM ved forsøk med D-alanin og L-aminosyrer. D og L-aminosyrer ble testet parallelt ved denne konsentrasjonen. Resultatene for forsøk med D-aminosyre og L-aminosyrer ble deretter sammenlignet.

## **3.8 Rørmetode; biofilm i glassrør**

### **3.8.1 Oppløsning av biofilm over lengre tids inkubering i reagensrør**

Flere studier peker på ulike stammers evne til å danne biofilmoppløsende komponenter. (Hochbaum et al. 2011; Kolodkin-Gal et al. 2012). Biofilmdannelse i reagensrør ble undersøkt for alle stammene. Formålet var å se på de ulike stammenes evne til biofilmdannelse, og om enkelte stammer fikk nedgang i biofilm over tid som følge av egenproduserte komponenter.

Det ble laget overnattkulturer av alle stammene. 30 µl av overnattkulturen ble inokulert til nye rør med 3 ml TSBNG. Rørene ble deretter inkubert ved 30 °C og 150 rpm risting. Biofilm ble farget og målt etter 1, 2, 6, 10 og 14 dager. Biofilmdannelse og utvikling ble observert og notert ned i ett skjema. Følgende faktorer ble observert:

- Antall dager for dannelse av en tykk og synlig biofilm.
- Antall dager før biofilmen løsnet
- Hvilken form biofilmen dannet, for eksempel en ring, pellickel, biofilm på vegg eller biofilm på bunn.

Alle observasjoner ble notert og tatt bilde av. Det ble dyrket opp flere paralleller av stammer der det ble påvist nedgang i biofilm. Kulturene ble helt over i sentrifugerør og sentrifugert (Sorwall RC5C plus, Thermo Scientific, USA) ved 4200 rpm og 22 °C i 20 minutt. Supernatanten ble pipettert av og sterilfiltrert (0,2 µm), før den ble frosset ned ved - 18 °C. Før bruk ble supernatant tinet ved romtemperatur. Vasking og farging av reagensrør ble utført slik forklart i kapittel 3.6.2.

### **3.8.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse**

Det var ønskelig å se om supernatant fra ulike kulturer der biofilmen løsnet, også hadde en hemmende effekt på biofilmdannelse ved inkubering av nye stammer. Supernatant ble derfor testet i 50 % styrke på et utvalg stammer.

Forsøket ble utført på samme måte som beskrevet i kapittel 3.8.1. Det ble laget et konsentrert vekstmedium av to ganger styrke. Mediet ble autoklavert og oppbevart på lik linje med andre vekstmedium. Reagensrør ble tilført 1,5 ml supernatant og 1,5 ml forsterket medium. Kontroll-rør ble tilsatt 1,5 ml sterilt vann og 1,5 ml forsterket medium. Det ble også kjørt kontroll-rør med vanlig vekstmedium, for å kontrollere om stammene oppførte seg likt i vanlig medium som i fortynnet konsentrert medium. Det ble tilsatt 30 µl av overnattkultur til hvert enkelt rør. Rørene ble inkubert ved 30 °C og 150 rpm i 48 timer.

#### ***Forskjellige konsentrasjoner av supernatant***

Supernatant ble testet i 1:10, 1:100 og 1:1000 konsentrasjoner i vekstmedium. Dette ble utført for å se om virkestoffene i supernatanten virket i små konsentrasjoner.

#### ***Varmebehandlet supernatant***

Supernatant ble varmebehandlet ved 85 °C i 20 min i vannbad. Forsøket ble deretter utført slik beskrevet ovenfor. Dette ble utført for å inaktivere eventuell enzymaktivitet.

## **3.9 Statistiske metoder**

Microsoft Excel 2010 ble benyttet til behandling av rådata, beregning av gjennomsnitt og standardfeil. MINITAB<sup>TM</sup> ble benyttet til Tukeys test og beregning av t-tester. Signifikansnivået ble satt til 5 % ( $p < 0,05$ ). Resultat av statistiske metoder er gitt i vedlegg 10.

## 4 Resultater

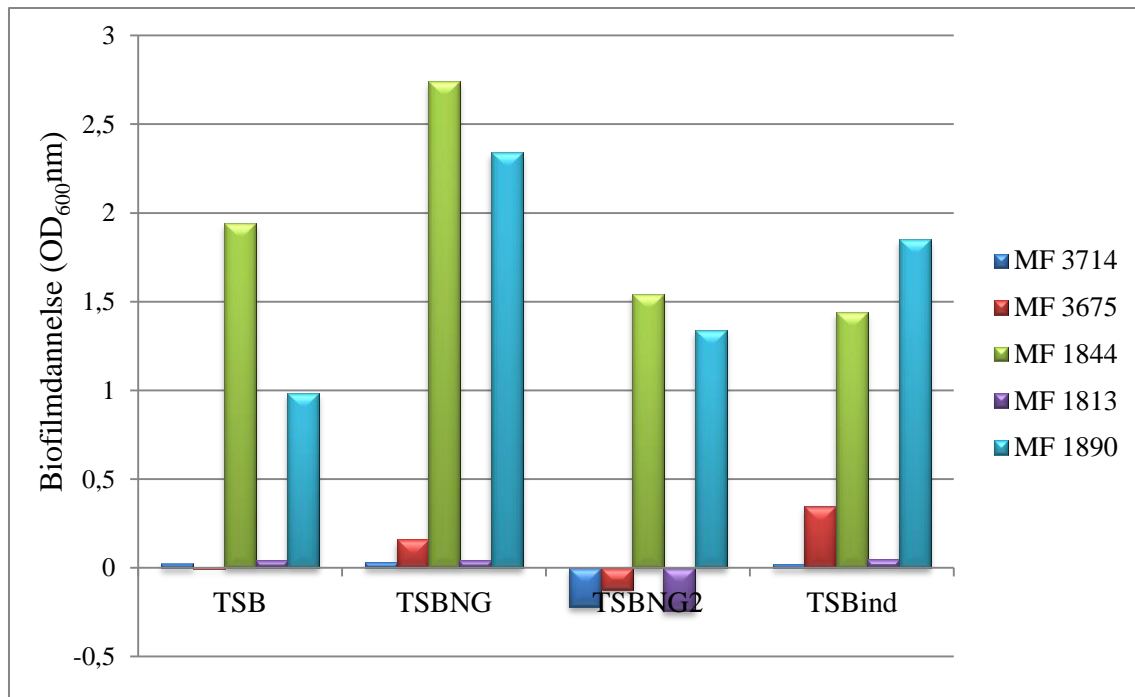
### 4.1 Innledende forsøk, valg av vekstmedium for biofilmstudier

Biofilmdannelse ble testet ut i forskjellige vekstmedier for et utvalg på seks stammer. Det ble utført forsøk i mikrotiterplater og rør. Formålet var å finne et egnet vekstmedium til bruk i videre forsøk.

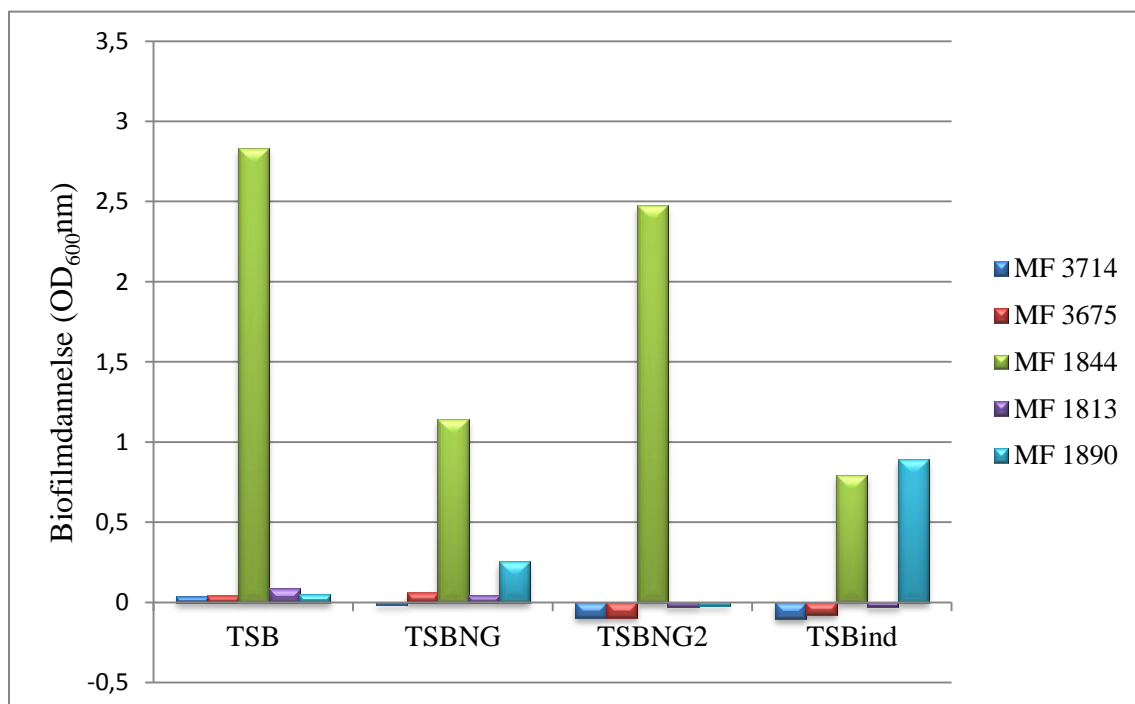
Figur 4.1 viser dannelse av biofilm hos stammene med forskjellige vekstmedium til stede, forsøket ble utført i mikrotiterplater. Figuren viser at TSBNG ga størst biofilmdannelse hos *S. aureus* MF 1890 og *S. cohnii* MF 1844. TSBind ga størst biofilmdannelse hos *S. aureus* MF 3675. *S. aureus* MF 3714 og MF 1813 hadde lite biofilmdannelse uavhengig av vekstmedium.

Figur 4.2 viser dannelse av biofilm i reagensrør. TSB ga god biofilmdannelse hos *S. aureus* MF 1844, men lite dannelse av biofilm hos de andre stammene. TSBNG ga biofilmdannelse hos *S. aureus* MF 1844 og MF 1890. Dette mediet hadde også det laveste nivået av tilsatt glukose og NaCl. *S. aureus* MF 3714, MF 3675 og MF 1813 hadde lite biofilmdannelse uavhengig av vekstmedium.

På grunn av usikkerhet om hvorvidt høye nivå av glukose og NaCl ville forhindre aktivitet av enzymer som skulle testes i senere forsøk, ble TSBNG valgt som vekstmedium til videre forsøk.



**Figur 4.1:** Biofilmdannelse i mikrotiterplater for utvalgte stammer i forskjellige vekstmedier, ved inkubering i 2 dager ved 30 °C. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



**Figur 4.2:** Biofilmdannelse i reagensrør for utvalgte stammer i forskjellige vekstmedier, ved inkubering i 2 dager ved 30 °C og 150 rpm risting. Blank (målt OD<sub>600</sub> av rør kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.

## 4.2 Mikrotitermetode; biofilm i mikrotiterplater

### 4.2.1 Kartlegging av effekt av D-aminosyrer, norspermidin og enzymer på biofilmdannelse

36 stammer ble dyrket i mikrotiterplater med D-aminosyrer, norspermidin, og enzymer. Av disse stammene, var det kun 13 stammer som dannet biofilm etter to dagers inkubering. Stammene ble derfor delt inn i raske og langsomme biofilmdannere, hvor stammer med en biofilmdannelse ( $OD_{600}$ ) under 0,2 etter to dagers inkubering, ble rangert som langsomme stammer. Forsøket ble deretter utført en gang til, med ulik inkubasjonstid. Raske stammer ble inkubert i to dager slik utført i første forsøk. Langsomme stammer fikk en inkubasjonstid på 10 dager. Etter andre forsøk ble det gjort en utvelgelse av hvilke stammer som var interessante å ta med i videre forsøk, se kapittel 4.2.4.

Tabell 4.1 og 4.2 gir en oversikt de ulike stoffenes innvirkning på stammene. Tabell 4.1 viser de raske stammene. Disse stammene hadde god biofilmdannelse i første og andre forsøk, tabellen er derfor basert på gjennomsnittet av to forsøk. Tabell 4.2 viser ulike stoffers effekt på de langsomme stammene. Denne tabellen er kun basert på ett forsøk, da ingen av stammene dannet biofilm i første forsøk. Rådata bak begge tabellene er gitt i vedlegg 3. Det ble regnet prosent hemming ved å se på biofilmdannelse i hver enkelt brønn sammenlignet med biofilmdannelse i kontroll (TSBNG og bakterier).

Vekst av bakteriene ble målt før mikrotiterplatene ble vasket og farget. Vekst i hver enkelt brønn ble sammenlignet med kontroll for å finne ut om de tilsatte stoffene hemmet bakterievekst. For å konkludere at et stoff hemmet biofilm spesifikt ble det satt en grense på mindre enn 30 % reduksjon av total bakterievekst.

I første forsøk var bakterieveksten hos enkelte stammer hemmet, spesielt ved tilsetning av dispersin B. Om bakterieveksten ble hemmet i kun ett forsøk av forsøkene, er dette markert i tabell med stjerne. Enkelte stammer hadde noe reduksjon i biofilmdannelse, men også litt reduksjon i vekst (< 30 %). Slike tilfeller er markert med to stjerner.

**Tabell 4.1** Oversikt over effekt av D-aminosyrer, norspermidin og enzymer på biofilmdannelse av raske stammer av *Staphylococcus*, etter to dagers inkubasjon. Tabellen er basert på to forsøk, og viser prosentvis reduksjon av biofilmdannelse, sammenlignet med kontroll. Tabellen er inndelt etter følgende fargekoder:  = Ingen reduksjon av biofilm.  = Lite reduksjon av biofilm: 0 - 40 % hemming.  = Mye reduksjon av biofilm: 40-80 % hemming.  = Sterk reduksjon av biofilm: 80-100 % hemming.

MF/stamme	Dispersin 50 µg/ml	DNAse 100µg/ml	Proteinase 100 µg/ml	Trypsin 100 µg/ml	Norsp. <sup>1</sup> 200 µm	Leu. 8,5 mM	Phe. 0,5 mM	Met. 2,0 mM	Tyr. 0,5 mM	Trp. 5,0 mM	Pro. 0,5 mM
1890, <i>S. aureus</i>	*										
3230, <i>S. aureus</i>											
1981, <i>S. aureus</i>	> 30 %								**		
3674, <i>S. aureus</i>	*										
1871, <i>S. capitis</i>	> 30 %										
1872, <i>S. capitis</i>	*		**								
1844, <i>S. cohnii</i>	*		*	*							
1834, <i>S. cohnii</i>	*		*	*							
1891, <i>S. cohnii</i>											
2601, <i>S. epidermidis</i>	> 30 %										
1789, <i>S. epidermidis</i>	*		**								
2613, <i>S. simulans</i>	*	> 30 %	> 30 %	> 30 %	*	*				*	
1862, <i>S. lentus</i>	**		*	*							

<sup>1</sup>Norspermidin

\* > 30 % hemming i første forsøk.

\*\* Høy hemming i forhold til målt biofilmdannelse



**Tabell 4.2** Oversikt over effekt av D-aminosyrer, norspermidin og enzymer på biofilmdannelse av langsomme stammer av *Staphylococcus*, etter ti dagers inkubasjon. Tabellen er basert på ett forsøk, og viser prosentvis reduksjon av biofilmdannelse, sammenlignet med kontroll. Tabellen er inndelt etter følgende fargekoder:  = Ingen reduksjon av biofilm.  = Lite reduksjon av biofilm: 0 - 40 % hemming.  = Mye reduksjon av biofilm: 40-80 % hemming.  = Sterk reduksjon av biofilm: 80-100 % hemming.

MF/ stamme	Dispersin 50 µg/ml	DNase 100µg/ml	Proteinase 100 µg/ml	Trypsin 100 µg/ml	Norsp. <sup>1</sup> 200 µm	Leu. 8,5 mM	Phe. 0,5 mM	Met. 2,0 mM	Tyr. 0,5 mM	Trp. 5,0 mM	Pro. 0,5 mM
3675, <i>S. aureus</i>	> 30 %	> 30 %			> 30 %					> 30 %	
3714, <i>S. aureus</i>											
3715, <i>S. aureus</i>		**									
3722, <i>S. equorum</i>	> 30 %	**	> 30 %								
1904, <i>S. saprophyticus</i>		> 30 %		> 30 %							
1886, <i>S. saprophyticus</i>		> 30 %									
4698, <i>S. saprophyticus</i>											

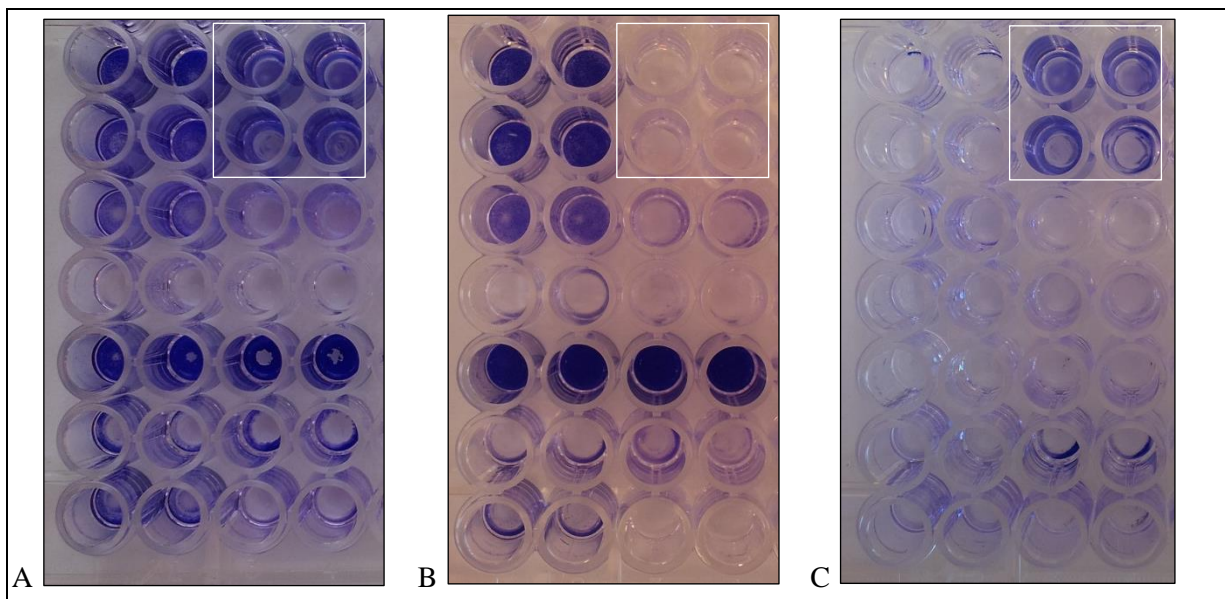
<sup>1</sup>Norspermidin

\* > 30 % hemming i første forsøk.

\*\* Høy hemming i forhold til målt biofilmdannelse

#### 4.2.2 Effekt av enzymer

Kartleggingen av stammene viste at enzym hadde ulik effekt på forskjellige stammer. De fleste bakteriene fikk en reduksjon av biofilm med Dispersin B og DNase til stede, mens proteinase og trypsin hadde forholdsvis liten effekt. Noen stammer hadde et motsatt mønster (Tabell 4.1). Biofilmdannelse hos *S. cohnii* (MF 1844 og MF 1834) ble ikke hemmet av DNase og dispersin B i like stor grad som de øvrige stammene. Biofilm hos MF 1844 og MF 1834 ble imidlertid hemmet av proteinase og trypsin. Dette mønsteret kom klart frem etter farging av mikrotiterplatene, slik vist i Figur 4.3. Figuren viser biofilmdannelse av et utvalg stammer med proteinase og DNase. Slik det kommer frem av figuren hadde *S. cohnii*, MF 1844 og MF 1834 (markert med firkant), et motsatt mønster enn de resterende stammene på brettet. Figur 4.3 A viser kontroll, hvor stammene kun vokser i TSBNG. Figur 4.3 B viser stammer dannelse av biofilm med proteinase til stede. Figur 4.3 C viser dannelse av biofilm med DNase til stede.



**Figur 4.3** Bildene viser biofilmdannelse av et utvalg stammer i mikrotiterbrett etter inkubering i to dager, ved 30 °C, tilsatt ulike komponenter. Figur A viser kontrollbrettet hvor stammene kun vokser i TSBNG. Figur B viser et brett tilsatt proteinase, mens Figur C viser brett tilsatt DNase. Bildet er tatt før avfarging med surgjort etanol. Brønnene som er markert med firkant, er to parallelle brønner hver av stammene MF 1844 og MF 1834. Begge stammene er *S. cohnii*.

### 4.2.3 Effekt av D-aminosyrer og norspermidin

D-aminosyrene hadde begrenset effekt på biofilmdannelse for de fleste stammene. Dette kommer frem av Tabell 4.1 som viser at de fleste stammene tilsatt D-aminosyrer, fikk en hemming av biofilm mellom 0-40 %. D-tryptofan hadde sterkere effekt på enkelte stammer. *S. aureus* (MF 1890, MF 1981 og MF 3674) utgjorde størsteparten av stammene som fikk redusert biofilmdannelse av komponenten. I tillegg ble biofilm hos *S. lentus* (MF 1862) og *S. epidermidis* (MF 1789) også redusert av D-aminosyren. Blant de langsomme stammene hadde D-tryptofan god effekt på *S. aureus*, og både MF 3714 og MF 3715 hadde over 80 % hemming (Tabell 4.2).

Noen stammer pekte seg ut som mer følsomme for tilsats av aminosyrer. Et eksempel på dette er *S. simulans* (MF 2613), som hadde en nedgang i biofilmdannelse for alle tilsatte stoffer. Stammen hadde imidlertid en reduksjon av vekst over 30 % i flere av tilfellene. Også blant de langsomme stammene var det stammer som pekte seg ut som følsomme for et bredt spekter av komponenter. Langsomme stammer av *S. aureus* (MF 3675, MF 3714 og MF 3715) fikk alle en klar reduksjon av biofilmdannelse etter ti dager inkubering med ulike D-aminosyrer. Spesielt hadde D-fenylalanin, D-methionin, D-tyrosin og D-tryptofan effekt på disse stammene.

Norspermidin ga lite hemming av biofilm, og det kan se ut til at der biofilm har blitt redusert noe, har det også vært en reduksjon i vekst. Unntaket er de langsomme stammene av *S. aureus*. Tabell 4.2 viser at norspermidin hemmet biofilmdannelse hos MF 3714 og MF 3715.

Det var nødvendig å kutte ned på faktorer i videre forsøk. Det ble derfor besluttet å ikke gå videre med norspermidin og D-prolin, som hadde begrenset effekt på biofilmdannelse.

### 4.2.4 Utvelgelse av stammer til videre forsøk

Formålet med kartleggingen var å vurdere biofilmdannelse hos de ulike stammene, og se hvilken effekt de ulike stoffene hadde på hver enkelt. Det var nødvendig å kutte ned på antall stammer til videre forsøk. Stammer med biofilmdannelse ( $OD_{600}$ ) under 0,2 ble derfor utelatt fra videre forsøk, se vedlegg 4. Blant stammene med lav biofilmdannelse var det flere *S. aureus*, noen *S. piscifermentans*, *S. equorum*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* og *S. simulans*. De fleste stammene som ble utelatt fra videre forsøk, er isolert fra

næringsmiddelindustrien eller i forbindelse med utbrudd. De langsomme stammene ble også utelatt fra forsøket. Det var flere interessante stammer blant disse, men siden de krevde en inkubasjonstid på ti dager, ble det besluttet å fokusere på de raske biofilm-dannende bakteriene.

Det var stor forskjell i mengde biofilm hver stamme produserte. Ved videre arbeid ble det benyttet stammer med god biofilmdannelse. Det ble fokusert på stammer hvor ulike stoffer hadde klar effekt på dannelsen av biofilm. Stammer som skilte seg ut med et annerledes mønster av hvilke stoffer som hemmet biofilm, ble ansett som interessante. Det ble forsøkt å benytte et bredt utvalg av stammer, med ulik herkomst.

### 4.3 Biofilmens sammensetning, forsøk med enzymer

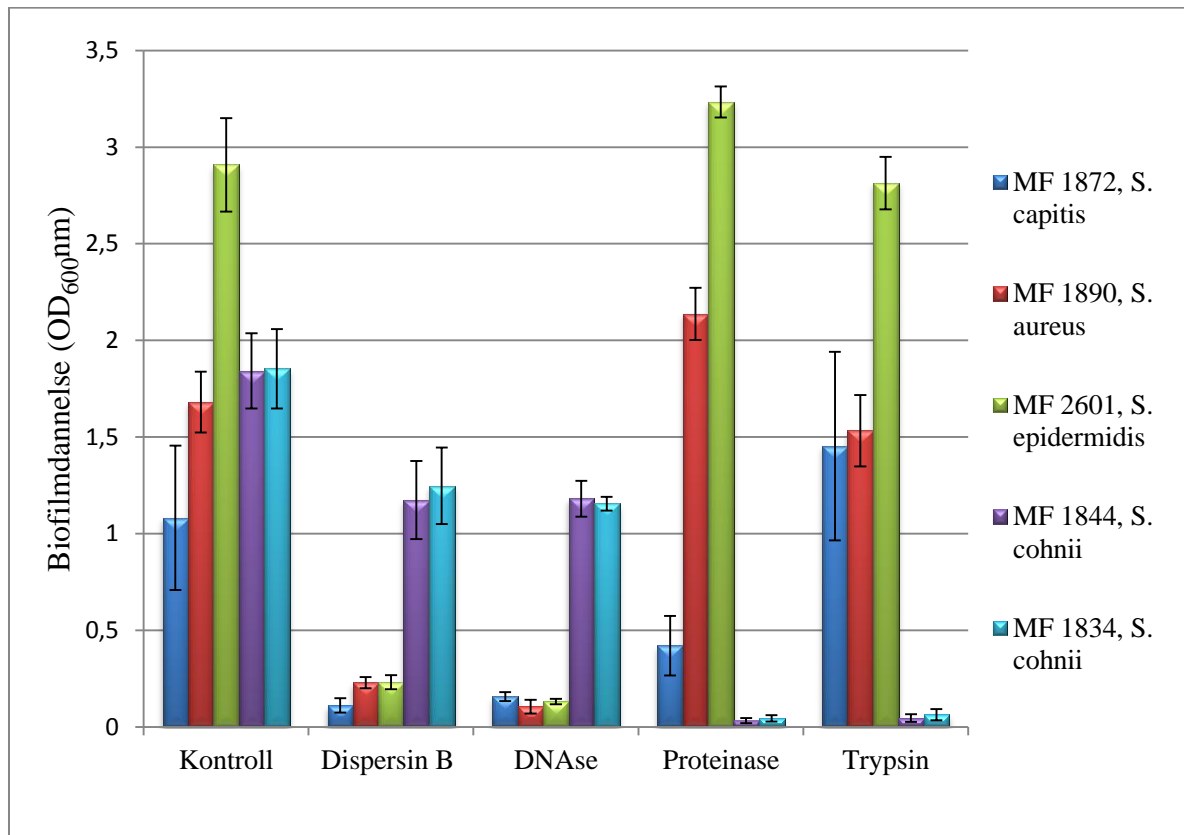
Ut fra kartleggingen av stammene ved ulike stoffer, ble fem stammer valgt ut for videre forsøk med enzymer. Rådata for forsøket er gitt i vedlegg 5, statistiske data er gitt i vedlegg 10. Følgende stammer ble valgt:

- MF 1872 - *S. capitis* isolert fra fjærkre foredlingsanlegg
- MF 1890 - *S. aureus*, labstamme ofte benyttet i biofilmstudier
- MF 2601 - *S. epidermidis*, en ATCC-stamme
- MF 1844 - *S. cohnii*, isolert fra fjærkre foredlingsanlegg
- MF 1834 - *S. cohnii*, isolert fra fjærkre foredlingsanlegg

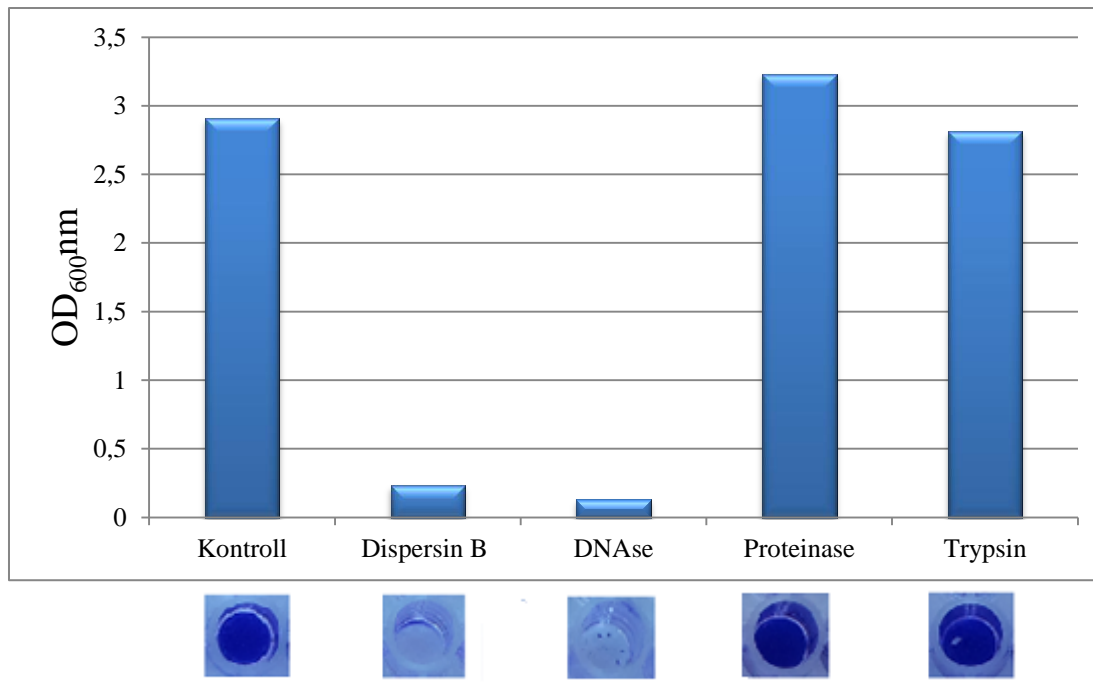
For *S. cohnii* (MF 1844 og MF 1834) var det signifikant mindre biofilmdannelse i nærvær av trypsin og proteinase ( $p < 0,05$ ), sammenlignet med kontroll. Dette kommer også frem av Figur 4.4 som viser gjennomsnitt og standardfeil av tre forsøk med ulike enzymer. DNase og dispersin B hadde mindre effekt på *S. cohnii* sin biofilmdannelse.

*S. aureus* (MF 1890) og *S. epidermidis* (MF 2601) hadde signifikant mindre biofilmdannelse ved tilsatt dispersin B og DNase ( $p < 0,05$ ), sammenlignet med kontroll. Stammene lot seg ikke hemme av proteinase og trypsin. Figur 4.4 viser at det var lite variasjon mellom forsøkene, med unntak av MF 1872 (*S. capitis*). Resultatene indikerte at biofilmdannelse av *S. capitis* ble hemmet av dispersin B og DNase, resultatene var imidlertid ikke signifikante.

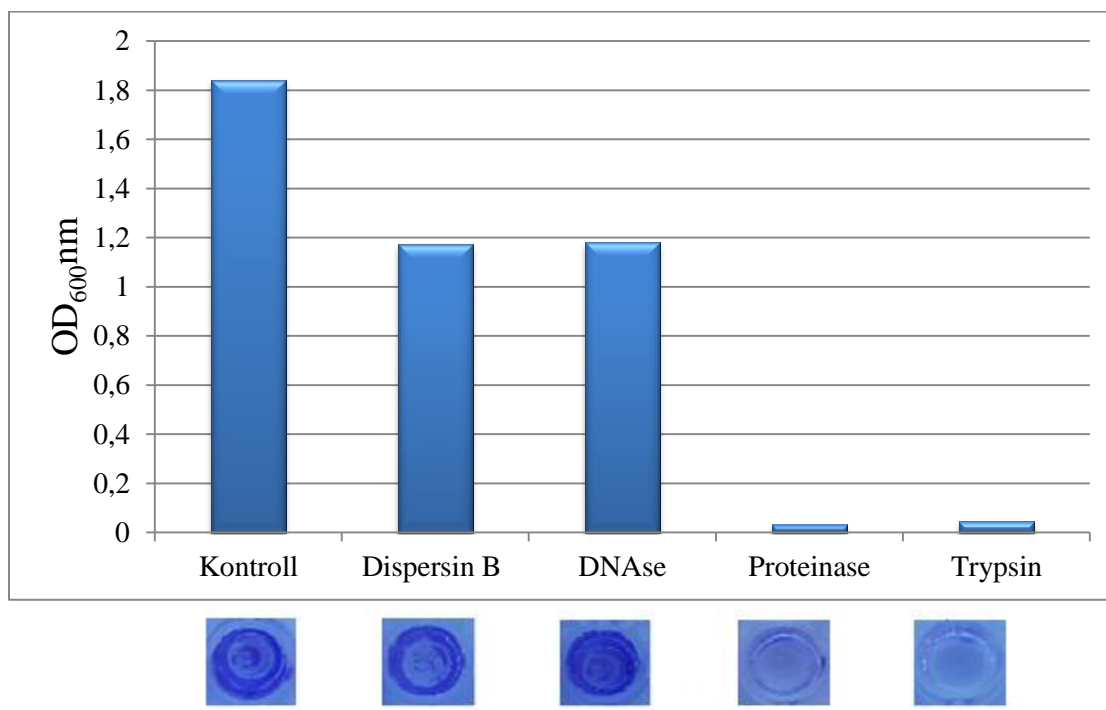
Figur 4.5 og 4.6 illustrerer effekten av ulike enzym og biofilmdannelse i mikrotiterplaten for stammene MF 2601 og MF 1844.



**Figur 4.4** Effekt av enzymer på biofilmdannelse for et utvalg stammer etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av tre målinger. Standardfeil er markert med feilfelt. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



**Figur 4.5** Effekt av ulike enzym på biofilmdannelse av *S. epidermidis* MF 2601, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av tre målinger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen. Bildene av brønner illustrerer biofilmdannelsen i mikrotiterplaten før avfarging med surgjort etanol.



**Figur 4.6** Effekt av ulike enzym på biofilmdannelse av *S. cohnii* MF 1844, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av tre målinger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen. Bildene av brønner illustrerer biofilmdannelsen i mikrotiterplaten før avfarging med surgjort etanol.

## 4.4 Forsøk med D-aminosyrer

D-aminosyrene hadde liten effekt i den inneledende kartleggingen av stammene. I disse forsøkene ble D-aminosyrene testet med ulike konsentrasjoner. Siden D-aminosyrene hadde liten effekt ble det utført et forsøk med forskjellige konsentrasjoner for å se hvilken konsentrasjon som ga best hemming, uten å ha innvirkning på vekst (vedlegg 6). Forsøket viste at konsentrasjoner på 5,0 mM og 20 mM av samtlige D-aminosyrer ga en reduksjon av vekst. Det ble derfor valgt en konsentrasjon på 2 mM for alle aminosyrer i videre forsøk med D og L-aminosyrer. Følgende stammer ble valgt ut for videre forsøk med aminosyrer:

- MF 1872 - *S. capitis* isolert fra fjærkre foredlingsanlegg
- MF 1890 - *S. aureus*, labstamme ofte benyttet i biofilmstudier
- MF 2601 - *S. epidermidis*, en ATCC-stamme
- MF 1844 - *S. cohnii*, isolert fra fjærkre foredlingsanlegg

Stammene ble valgt som følge av god biofilmdannelse i innledende forsøk, og på grunn av ulik bakgrunn.

### 4.4.1 Hemming av biofilmdannelse ved 2 mM konsentrasjon

Figur 4.7 til 4.10 viser effekt av D-aminosyrer med en konsentrasjon på 2 mM. Hvert forsøk ble utført tre ganger, med unntak av MF 2601 hvor forsøket ble utført to ganger på grunn av feil i siste gjentak. Rådata for forsøket er gitt i vedlegg 7.

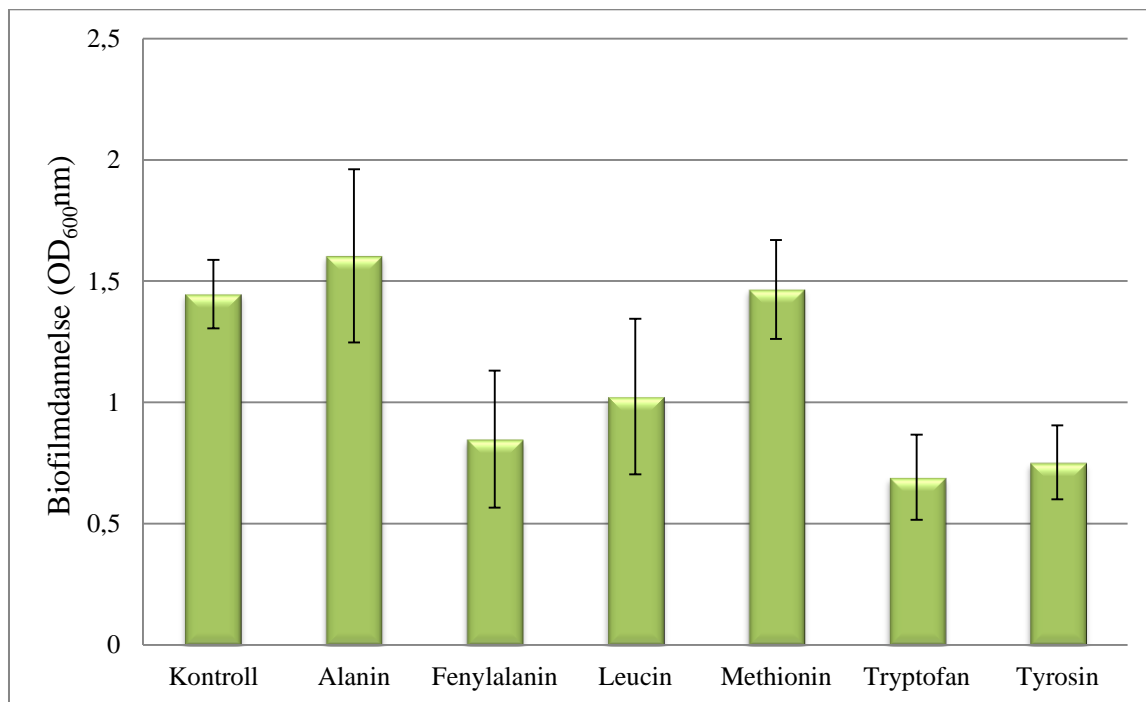
Figur 4.7 viser effekt av D-aminosyrene på *S. capitis* (MF 1872). Figuren viser at D-fenylalanin, D-leucin, D-tryptofan og D-tyrosin hadde en hemmende effekt på biofilmdannelsen hos stammen. Standardfeil for forsøkene er imidlertid stort. Biofilmdannelsen hos MF 1872 varierte mye i hvert forsøk, uavhengig om prøvene var tilsatt stoff eller ikke.

Figur 4.8 viser at *S. aureus* (MF 1890) hadde noe nedgang i biofilm med D-tryptofan, D-tyrosin og D-fenylalanin til stede. Standardfeil viste at det var lite variasjon mellom forsøkene.

Figur 4.9 viser biofilmdannelse hos *S. cohnii* (MF 1844) i vekstmedium tilsatt D-aminosyrer. Markert standardfeil viser at det var lite variasjon mellom forsøkene. Det var liten forskjell

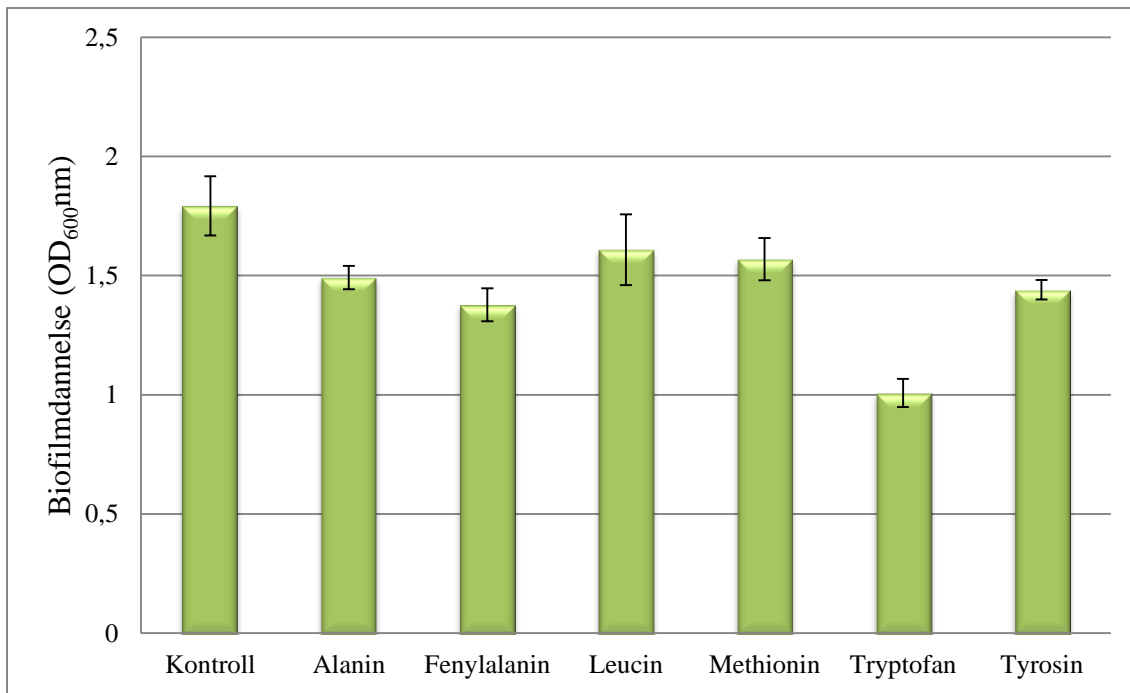
mellom kontroll og prøver tilsatt stoff. Figuren viser at D-leucin og D-tryptofan reduserte biofilmdannelse.

Figur 4.10 viser at methionin hadde størst effekt på løsning av biofilm hos *S. epidermidis* (MF 2601). Figuren viser imidlertid store standardfeil, noe som indikerer stor variasjon mellom forsøkene.

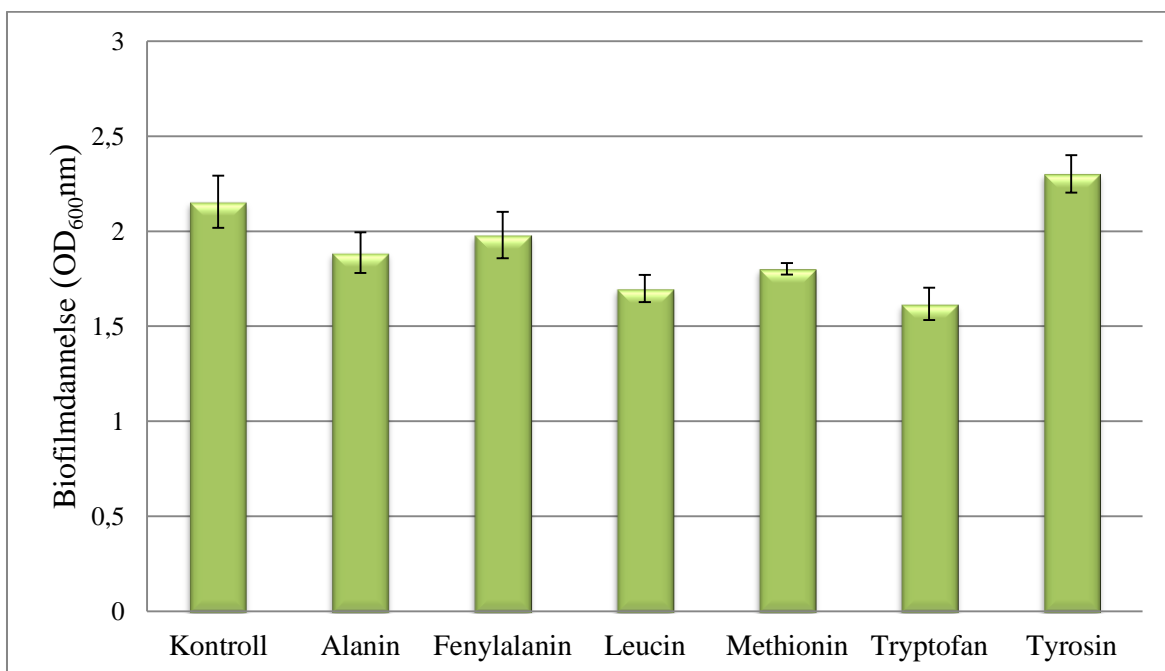


**Figur 4.7** Effekt av D-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. capitis* MF 1872, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av tre målinger. Standardfeil er markert med feilfelt. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.

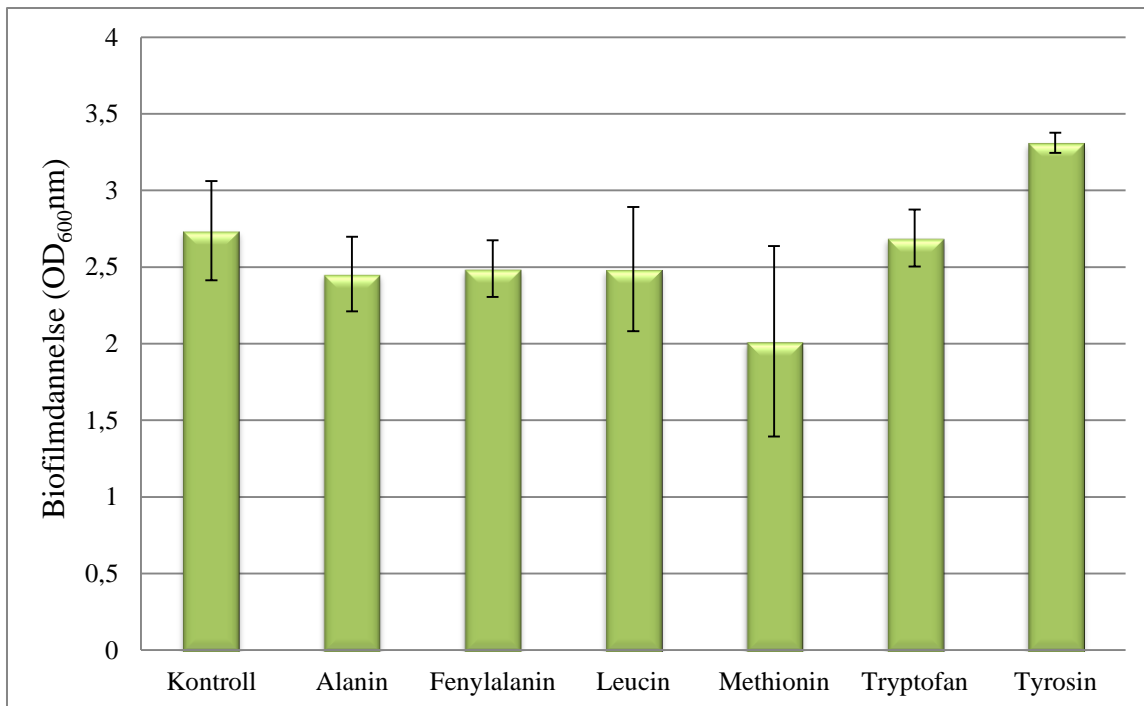




**Figur 4.8** Effekt av D-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. aureus* MF 1890, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av tre målinger. Standardfeil er markert med feilfelt. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



**Figur 4.9** Effekt av D-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. cohnii* MF 1844, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av tre målinger. Standardfeil er markert med feilfelt. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



**Figur 4.10** Effekt av D-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. epidermidis* MF 2601, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser gjennomsnitt av to målinger. Standardfeil er markert med feilfelt. Blank (målt OD<sub>600</sub> av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.

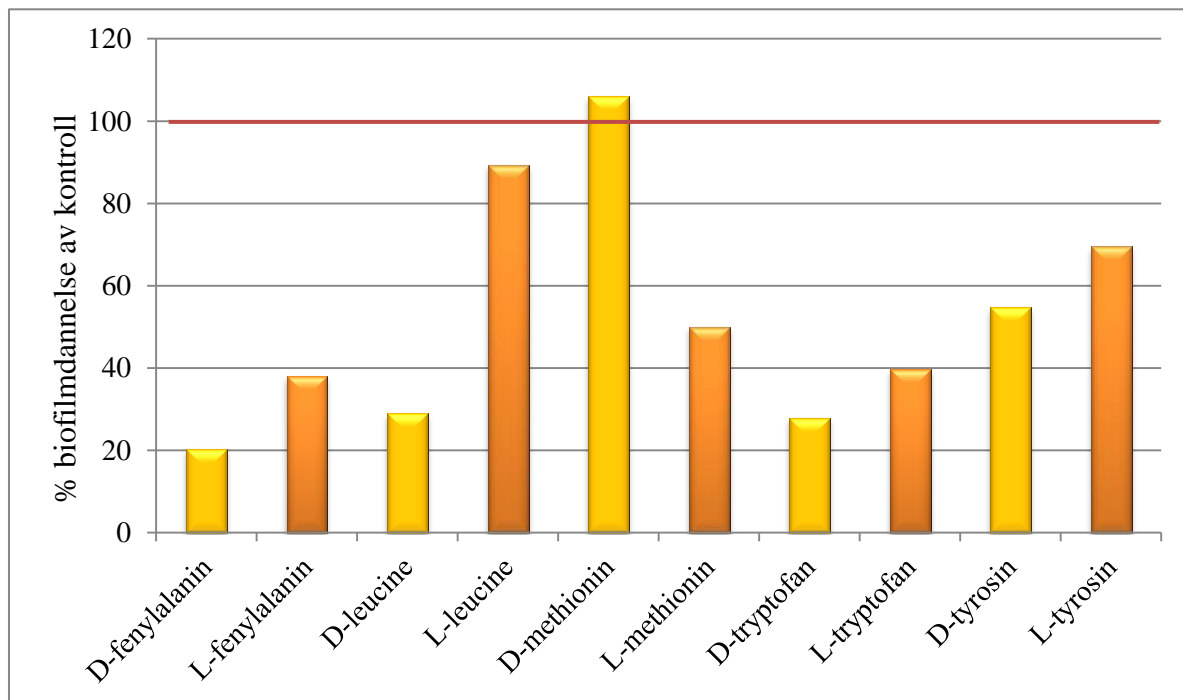
#### 4.4.2 Forsøk med L-aminosyrer

Det ble utført et kontrollforsøk med testing av L-aminosyrer med en konsentrasjon på 2 mM. Figur 4.11 til 4.13 viser effekten av L-aminosyrer på biofilmdannelse. D-aminosyrer ble testet parallelt i samme konsentrasjon. Figurene viser prosent biofilmdannelse i forhold til kontroll.

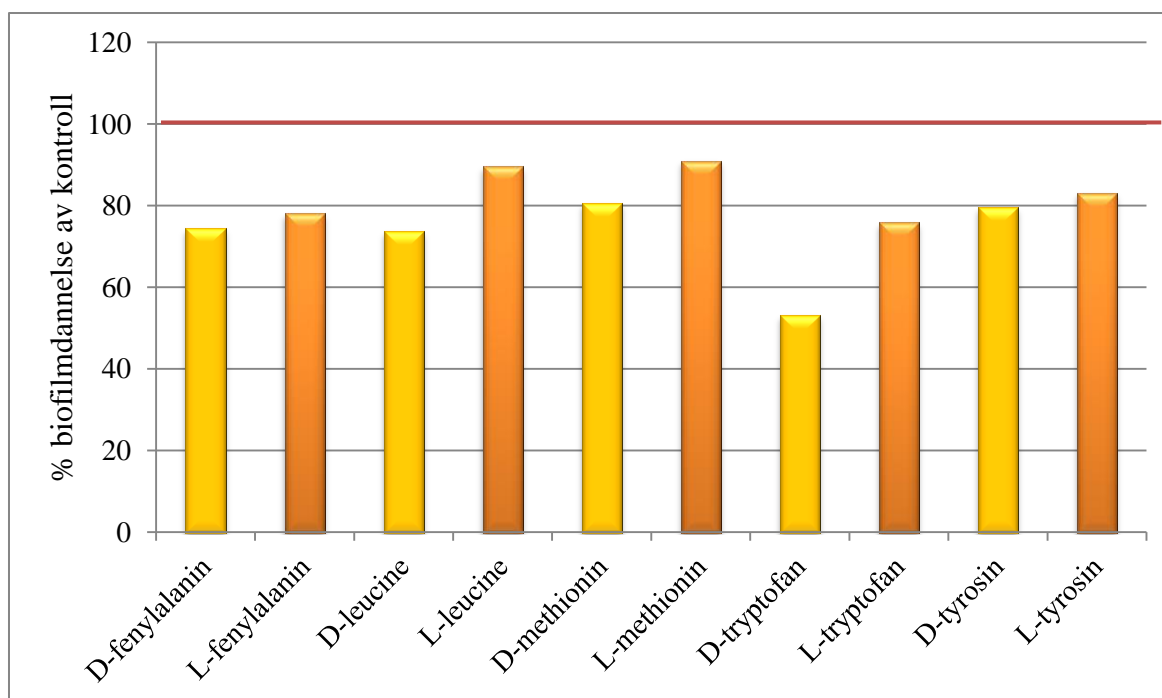
Resultat fra MF 2601, som har vært en god biofilmdanner i tidligere forsøk, er ikke presentert i dette forsøket, siden den hverken produserte biofilm i kontroll eller ved tilsatte aminosyrer. Figur 4.11 viser effekt av D og L-aminosyrer på biofilmdannelse av *S. capitis* (MF 1872). Figuren viser at både D og L-aminosyrene hadde stor effekt. D og L-enantiomerer av tryptofan, tyrosin og fenylalanin hadde hemmende effekt på biofilmdannelsen. D-leucin hadde en hemmende effekt, mens L-leucin hadde lite effekt biofilmdannelsen.

Figur 4.12 viser biofilmdannelse hos *S. aureus* (MF 1890) ved D og L-aminosyrer. Figuren antyder at L-aminosyrene hadde mindre hemmende effekt på biofilmdannelse enn D-aminosyrene. Både D og L-aminosyrene hadde imidlertid noe hemmende effekt på biofilmdannelsen hos MF 1890.

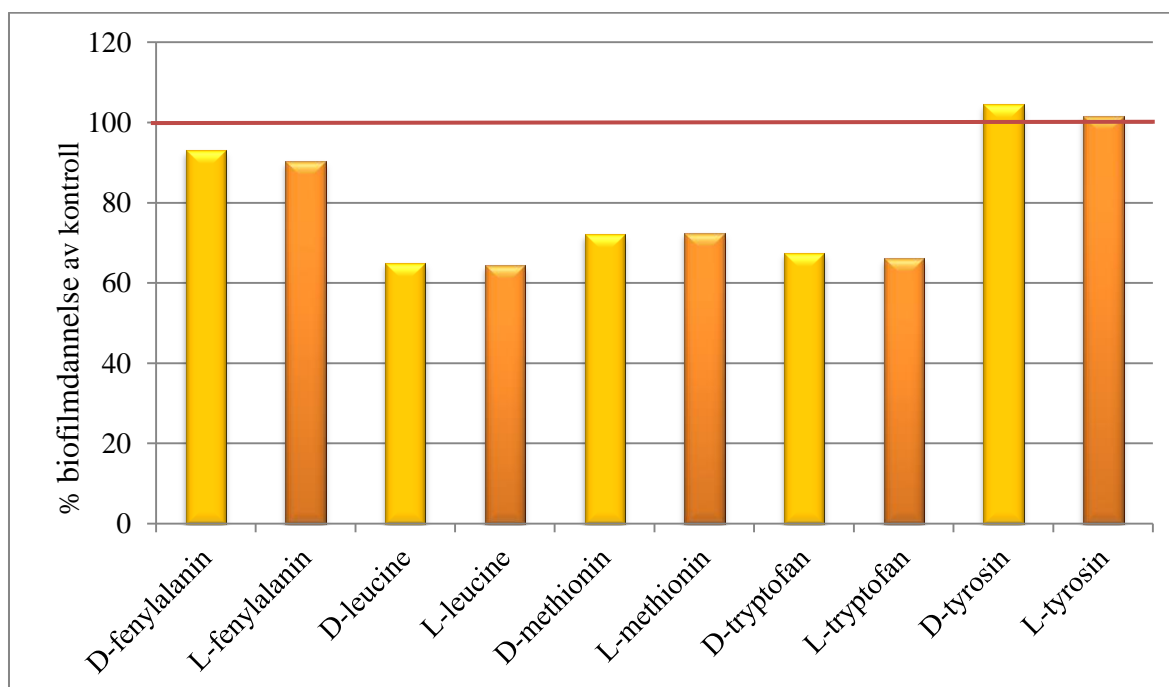
Figur 4.13 viser effekt av D og L-aminosyrer på *S. cohnii* (MF 1844). Både D og L-enantiomer av tryptofan, methionin og leucin hadde en hemmende effekt på stammen. Figuren viser at det var liten forskjell mellom D og L-aminosyrer. Motsatt hadde L-methionin en sterk hemmende effekt, mens D-methionin hadde liten effekt. Det understrekes at dette forsøket kun ble utført en gang.



**Figur 4.11** Effekt av D og L-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. capitis* MF 1872, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser prosent biofilmdannelse i forhold til kontroll. Kontroll er markert med rød strek.



**Figur 4.12** Effekt av D og L-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. aureus* MF 1890, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser prosent biofilmdannelse i forhold til kontroll. Kontroll er markert med rød strek.



**Figur 4.13** Effekt av D og L-aminosyrer (2 mM) på biofilmdannelse av *S. cohnii* MF 1844, etter to dagers inkubering i mikrotiterplater ved 30 °C. Figuren viser prosent biofilmdannelse i forhold til kontroll. Kontroll er markert med rød strek.

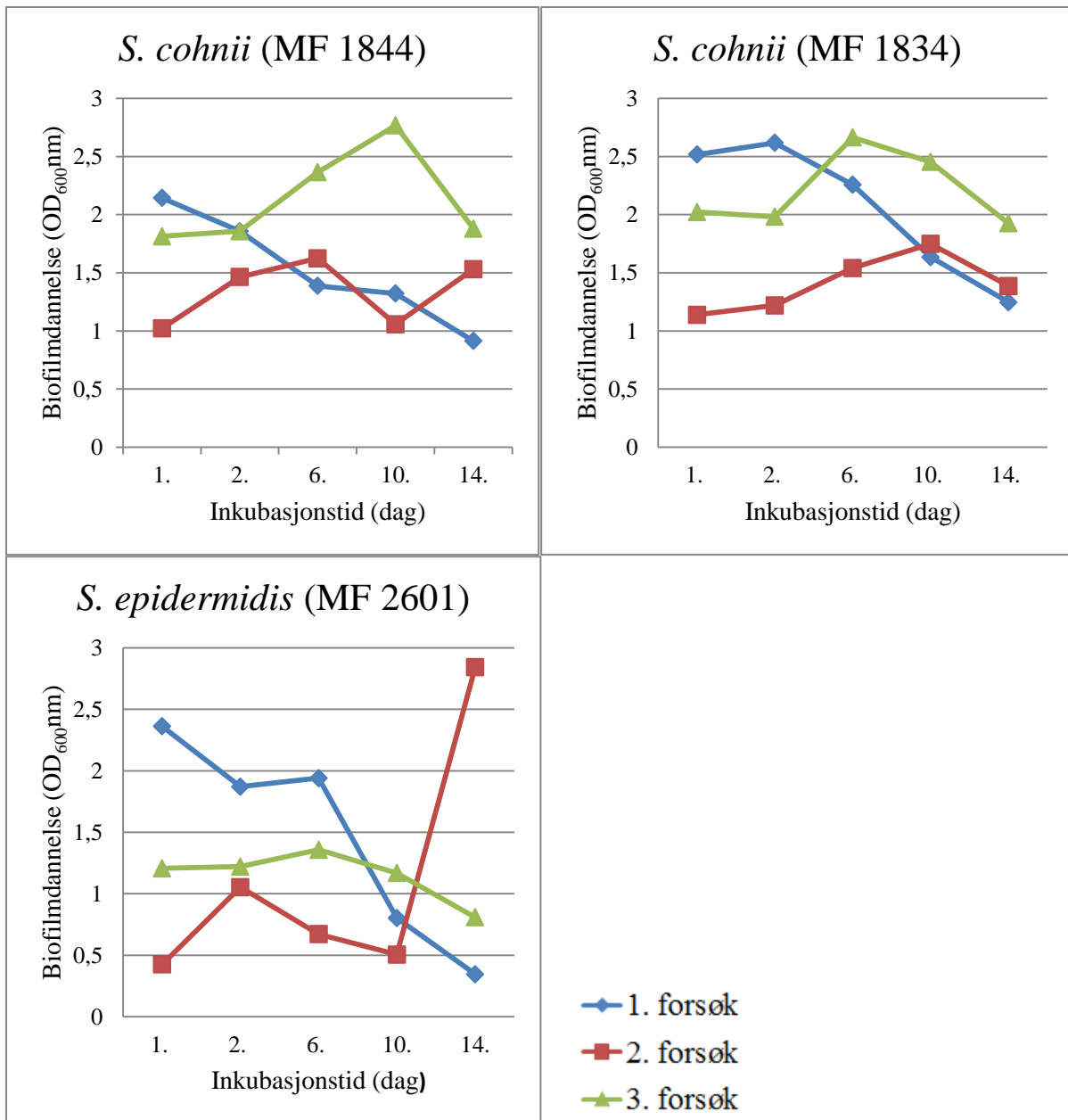
## 4.5 Rørmetode; biofilm i glassrør

### 4.5.1 Oppløsning av biofilm over lengre tids inkubering i reagensrør

Alle de 36 stammene ble inkubert i 14 dager i reagensrør hvor formålet var å se om stammene dannet biofilm, og om biofilmen løste seg opp i løpet av inkuberingsperioden. Stammer som hadde klar biofilmdannelse eller en reduksjon av biofilm i løpet av inkuberingsperioden, ble behandlet videre i forsøket. Visuell vurdering av stammene viste at mange stammer dannet biofilm på veggene, og på bunnen av reagensrøret. De fleste stammene dannet også en ring ved overflaten av vekstmediet. De visuelle vurderingene ble tatt med i betraktningen ved utvelgelse av stammer til videre forsøk. Rør kun tilsatt TSBNG (blank), hadde avleiring i bunnen etter endt inkubering. Dette ga utslag ved målt absorbans. Blank ble derfor trukket fra verdiene for biofilmdannelse av de ulike bakteriekulturene. Visuelle vurderinger og målt absorbans er gitt i vedlegg 8.

Av 36 stammer, var det kun tre stammer som hadde nedgang i biofilmdannelse i løpet av 14 dagers inkubering. MF 2601, MF 1844 og MF 1834 hadde alle klar nedgang i første forsøk. Forsøket ble derfor gjentatt tre ganger for disse stammene. Resultatene for de tre forsøkene er vist i Figur 4.15. Forsøket viste at nedgang i biofilm tok lengre tid ved andre og tredje gjentak. Både MF 1844 og MF 2601 hadde økt biofilmdannelse ved 14 dagers inkubering, i ett av gjentakene. Siden MF 1834 og MF 1844 begge er *S. cohnii* og isolert fra samme sted, ble det besluttet å gå videre med kun én av disse stammene.

Det ble også gjort gjentak på *S. aureus* (MF 3674) og *S. cohnii*, (MF 1891). MF 3675 ble valgt som følge av god biofilmdannelse i første forsøk, og fordi det var interessant å se om en *S. aureus* ville få nedgang i biofilmdannelse. MF 1891 ble valgt fordi den tilhører slekten *S. cohnii*. Hensikten var å se om også denne stammen hadde nedgang i biofilmdannelse slik de to andre *S. cohnii* i forsøket. Hverken MF 3675 eller MF 1891 hadde en interessant effekt, og ble derfor utelatt fra forsøket.



**Figur 4.15** Dannelse av biofilm hos *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1834 og MF 1844) ved inkubering i 14 dager ved 30 °C og 150 rpm risting. Forsøket ble utført 3 ganger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av reagensrør kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.

#### 4.5.2 Effekt av supernatant på biofilmdannelse

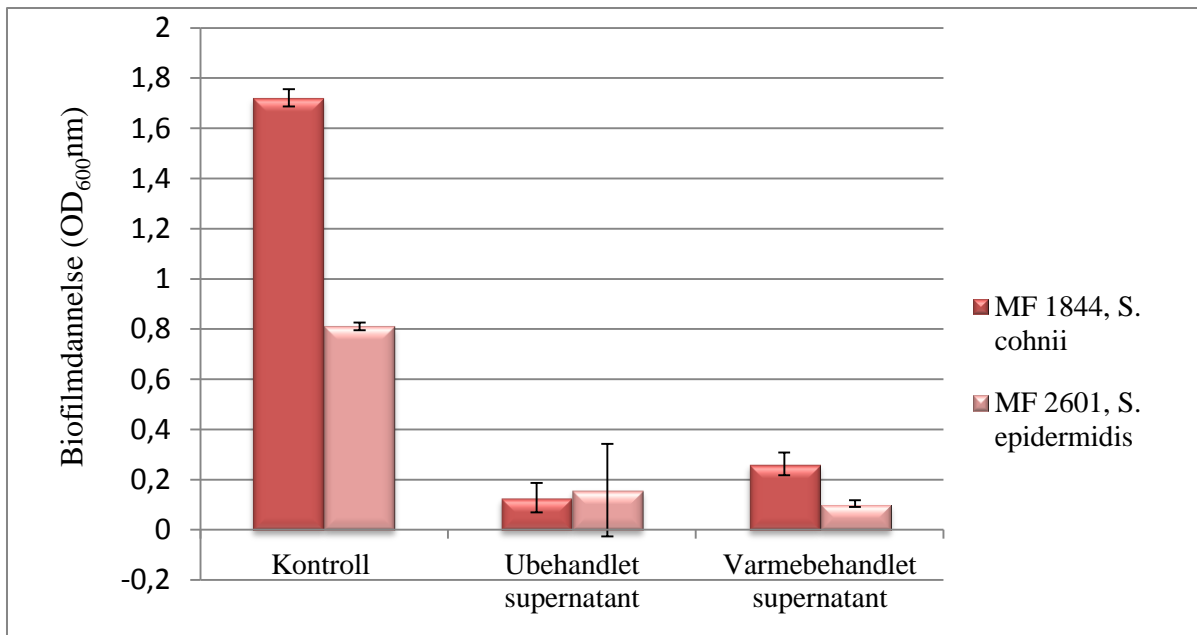
Det ble podet flere reagensrør med *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844), med den hensikt å benytte supernatant til videre forsøk. Stammene ble valgt på bakgrunn av resultater vist i Kapittel 4.4.1. Supernatanten ble sentrifugert av etter fem dagers inkubering, sterilfiltrert og frosset ned. Rådata for forsøk med supernatant er gitt i vedlegg 9, statistiske beregninger er gitt i vedlegg 10. Inkuberingstid ble valgt på bakgrunn av nedgang i biofilmdannelse over tid (Figur 4.15).

Effekten av supernatantene på biofilmdannelse ble testet på bakteriene selv, og på *S. aureus* (MF 1890), *S. capitis* (MF 1872), *S. equorum* (MF 3722). Disse stammene hadde ingen klar nedgang i biofilmdannelse over tid i innledende forsøk, men ble valgt for å få noe variasjon i utvalget, og fordi de hadde en interessant effekt i mikrotitermetode, slik vist i Tabell 4.1 og 4.2. Det viste seg imidlertid at supernatant av MF 2601 og MF 1844, kun hadde effekt på seg selv og hverandre. Videre forsøk ble derfor basert på MF 2601 og MF 1844.

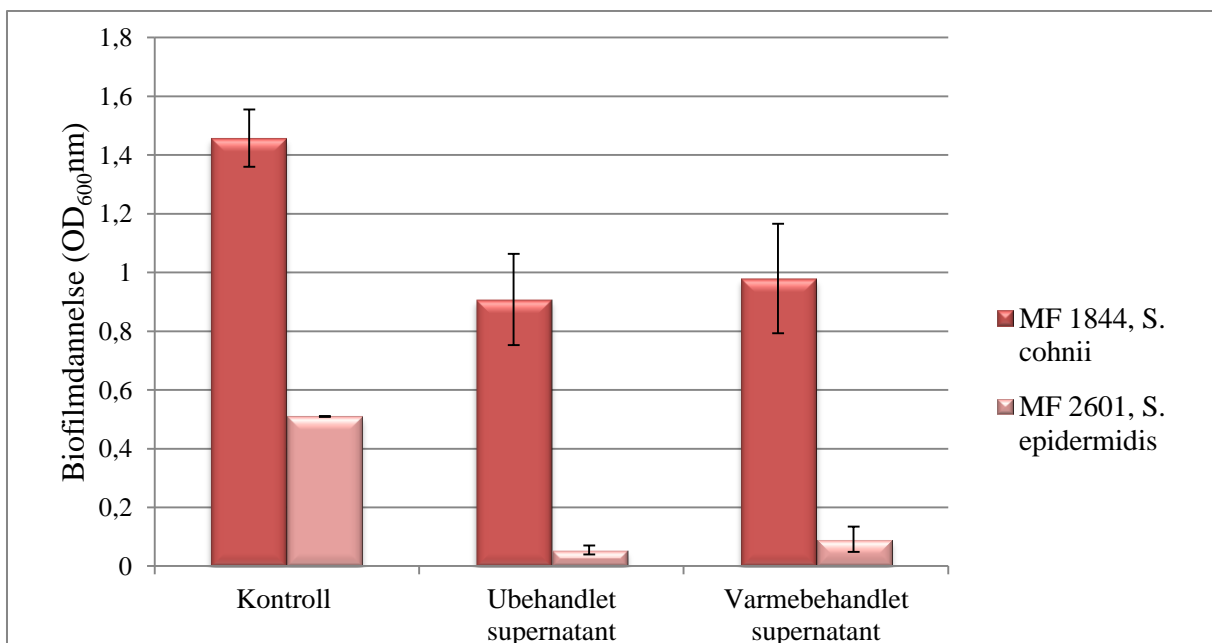
Forsøk med ubehandlet supernatant av MF 2601 og MF 1844 ble utført tre ganger. Forsøk med varmebehandlet supernatant (85 °C i 20 min) ble utført to ganger.

Ubehandlet 1844-supernatant hadde en signifikant hemmende effekt på biofilmdannelse av MF 1844 og MF 2601 ( $p < 0,01$ ), sammenlignet med kontroll. Varmebehandlet 1844-supernatant hadde også signifikant hemmende effekt på biofilmdannelse hos begge stammene ( $p < 0,01$ ). Dette kommer frem av Figur 4.16 som viser effekt av ubehandlet og varmebehandlet 1844-supernatant på biofilmdannelse av MF 1844 og MF 2601. Ved å sammenligne effekt av ubehandlet 1844-supernatant mot varmebehandlet 1844-supernatant, viste det seg at ubehandlet supernatant hadde en signifikant større effekt på hemming av biofilmdannelse på MF 1844, enn den varmehandlede supernatanten ( $p < 0,05$ ).

Ubehandlet 2601-supernatant hadde en signifikant hemmende effekt på biofilmdannelse av MF 1844 ( $p < 0,05$ ) og på MF 2601 ( $p < 0,01$ ) sammenlignet med kontroll. Varmebehandlet 2601-supernatant hadde ikke signifikant hemmende på biofilmdannelse hos noen av stammene. Figur 4.17 viser effekt av ubehandlet og varmebehandlet 2601-supernatant på biofilmdannelse av MF 1844 og MF 2601. Figuren viser at varmebehandlet 2601-supernatant hadde en viss effekt, selv om resultatene ikke er statistisk signifikante.



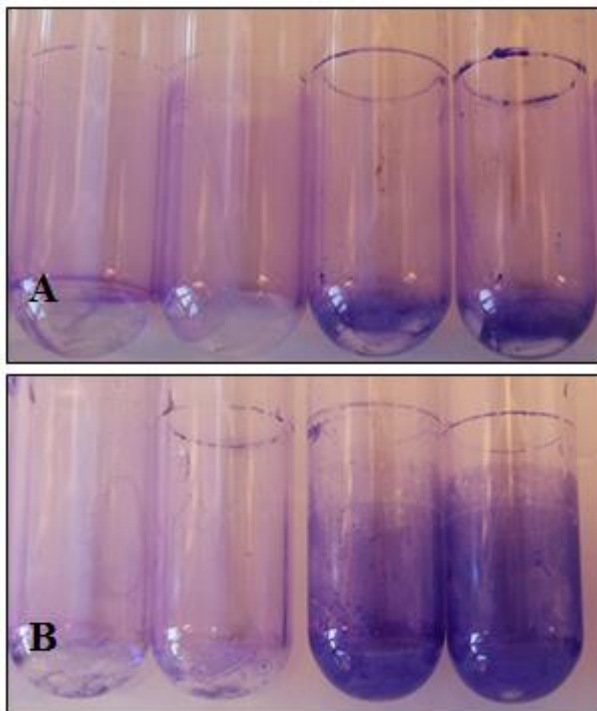
**Figur 4.16** Effekt av 1:1 1844-supernatant og 2x konsentrert TSBNG, på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) ved inkubering i to dager ved 30 ° og 150 rpm. Kontroll er dannelse i biofilm i 1:1, 2 x forsterket medium og vann. Feilfelt markerer standardfeil. Forsøket med ubehandlet supernatant ble utført tre ganger. Forsøk med varmebehandlet supernatant ble utført to ganger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av reagensrør kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



**Figur 4.17** Effekt av 1:1 2601-supernatant og 2x konsentrert TSBNG, på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) ved inkubering i to dager ved 30 °C og 150 rpm. Kontroll er dannelse i biofilm i 1:1, 2 x forsterket medium og vann. Feilfelt markerer standardfeil. Forsøket med ubehandlet supernatant ble utført tre ganger. Forsøk med varmebehandlet supernatant ble utført to ganger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av reagensrør kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



Figur 4.18 illustrerer effekten av supernatant på egne stammer. Figur 4.18 A viser biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF2601) i ubehandlet og varmebehandlet 2601-supernatant. Generelt hadde MF 2601 dårligere biofilmdannelse i fortynnet konsentrert medium, enn hva den hadde i vanlig TSBNG (data ikke presentert). Figuren viser også en sterkere ring av biofilm i vanlig TSBNG enn hva tilfellet er i konsentrert fortynnet TSBNG. Figur 4.18 B viser biofilmdannelse av *S. cohnii* (MF 1844) i ubehandlet og varmebehandlet 1844 supernatant. MF1844 vokste like godt i TSBNG som i konsentrert fortynnet TSBNG.

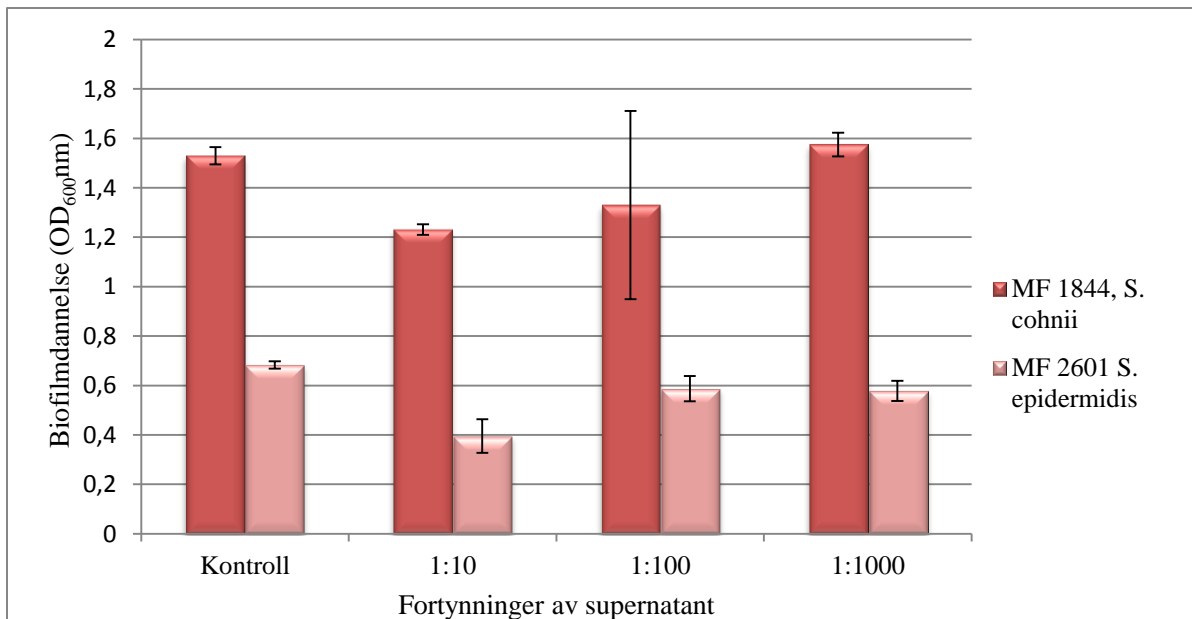


**A** = *S. epidermidis* (MF 2601) tilsatt 2601 supernatant

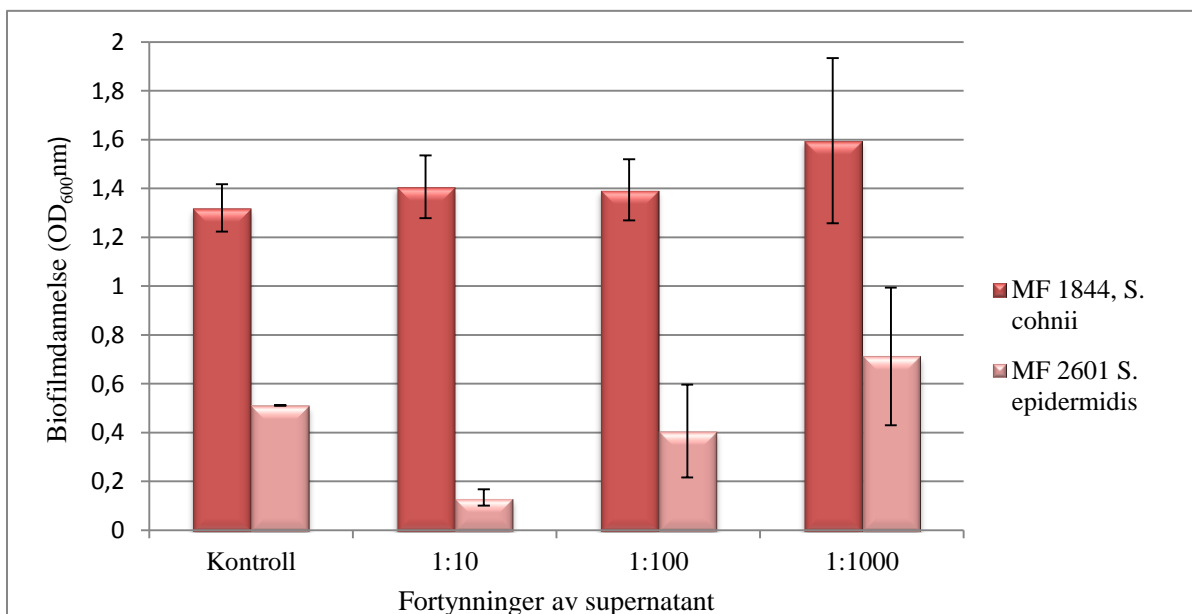
**B** = *S. cohnii* (MF 1844) tilsatt 1844 supernatant

**Figur 4.18** Sammenligning av effekt av varmebehandlet supernatant, ubehandlet supernatant og fortynnet konsentrert TSBNG på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF2601) og *S. cohnii* (MF 1844) etter to dagers inkubering ved 30 °C og 150 rpm. Fra venstre 1:1 ubehandlet supernatant og konsentrert TSBNG, 1:1 varmebehandlet supernatant og konsentrert TSBNG, fortynnet konsentrert TSBNG, og vanlig TSBNG. Bildet er tatt før avfarging med surgjort etanol.

Forsøk med ulike fortynninger av supernatant ble utført to ganger. Figur 4.19 viser at 1:10 fortynning 1844-supernatant hadde effekt på MF 1844. Fortynningene hadde også noe effekt på MF 2601 sin biofilmdannelse. Figur 4.20 viser at 2601-supernatant fortynnet 1:10 hadde noe effekt på biofilmdannelsen hos MF 2601. De ulike fortynningene av 2601-supernatant hadde ikke effekt på MF 1844.

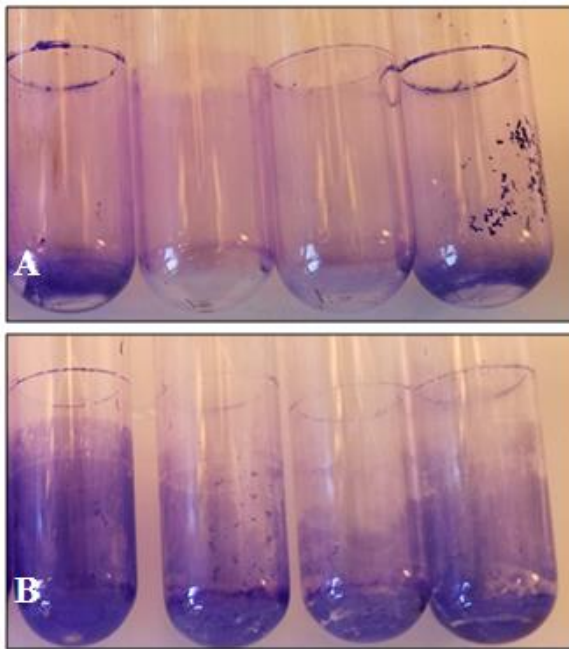


**Figur 4.19** Effekt av ulike fortynninger av 1844-supernatant og 2x konsentrert TSBNG, på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) ved inkubering i to dager ved 30 °C og 150 rpm. Kontroll er dannelse i biofilm i 2 x forsterket medium og vann. Feilfelt markerer standardfeil. Forsøket ble utført to ganger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av reagensrør kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.



**Figur 4.20** Effekt av ulike fortynninger av 2601-supernatant og 2x konsentrert TSBNG, på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) ved inkubering i to dager ved 30 °C og 150 rpm. Kontroll er dannelse i biofilm i 2 x forsterket medium og vann. Feilfelt markerer standardfeil. Forsøket ble utført to ganger. Blank (målt OD<sub>600</sub> av reagensrør kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i grafen.

Figur 4.21 illustrerer effekt av fortynnet supernatant. Figur 4.21 A, viser effekt av ulike fortynninger av 2601-supernatant på biofilmdannelse hos MF 2601. Illustrasjonen viser at biofilmdannelsen er noe hemmet i fortynning 1:10 og 1:100 sammenlignet med kontroll. Figur 4.21 B, viser effekt av ulike fortynninger av 1844-supernatant på biofilmdannelse hos MF 1844. Også her ser biofilmdannelsen noe hemmet ut, sammenlignet med kontroll.



**A** = *S. epidermidis* (MF 2601) tilsatt 2601 supernatant

**B** = *S. cohnii* (MF 1844) tilsatt 1844 supernatant

**Figur 4.21** Effekt av ulike fortynninger av supernatant på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF2601) og *S. cohnii* (MF 1844) etter to dagers inkubering ved 30 °C og 150 rpm. Fra venstre; kontroll, 1:10, 1:100 og 1:1000 fortynninger av supernatant i fortynnet konsentrert TSBNG.

## 5 Diskusjon

Hensikten med dette arbeidet var å se om ulike kjemiske forbindelser hadde effekt på biofilmdannelse hos ulike arter/stammer av *Staphylococcus*. Det ble også undersøkt om *Staphylococcus* dannet forbindelser som løser opp biofilm.

### 5.1 Mikrotitermetode; biofilm i mikrotiterbrett

#### *Enzymer*

Det er kjent at ulike stammer av *Staphylococcus* danner biofilm med ulik sammensetning (Izano et al. 2007). Forsøk med enzymer ga en indikasjon på sammensetningen av biofilm matriks hos de ulike stammene i denne oppgaven.

Dispersin B har vist seg å ha en hemmende effekt på PIA-basert biofilm hos *Staphylococcus* (Boles & Horswill 2011). Ved kartleggende forsøk med enzymer ble det vist en reduksjon på 80-100 % av alle stammer av *S. aureus*, *S. capitis*, *S. simulans* og *S. epidermidis*, i nærvær av dispersin B (50 µg/ml). Dette kommer fram av Tabell 4.1 og 4.2. Resultatene er ikke statistisk signifikante, men de indikerer at PIA kan utgjøre en komponent i biofilmen hos flere *Staphylococcus* i dette forsøket. Ved tre gjentak ble det vist signifikant reduksjon av biofilmdannelse hos *S. aureus* (MF 1890) og *S. epidermidis* (MF 2601) i nærvær av dispersin B. Dette kommer frem av Figur 4.4. Itoh et al. (2004) viste at vekst i nærvær av dispersin B i en konsentrasjon på 50 µg/ml, gir en sterk hemmende effekt av biofilm hos stammer med *ica* ADBC-operon. Studien viste også at enzymet ikke har en effekt på biofilmdannelse hos stammer som mangler *ica*-operonet. På bakgrunn av dette kan det indikeres at stammer som ikke lot seg hemme av dispersin B i denne oppgaven, er *Staphylococcus* uten *ica*-operon, eller stammer hvor *ica*-operonet ikke er avgjørende for biofilmdannelse. Izano et al. (2007) viste i sin studie at PIA antagelig er en større biofilmkomponent hos *S. epidermidis*, enn hva tilfellet er for *S. aureus*. Dette arbeidet indikerer at PIA kan utgjøre en del av MF 1890 (*S. aureus*) biofilm, siden det ble vist signifikant hemming av stammen i nærvær av enzymet.

I likhet med dispersin B, hadde DNase (100 µg/ml) en sterk hemmende effekt på biofilmdannelse hos en rekke stammer. Kartleggingsforsøket viste at biofilmdannelse hos *S. simulans* (MF 2613) og flere *S. aureus* lot seg hemme med 80-100 % i nærvær av enzymet. Ved tre gjentak med et utvalg stammer, ble det bekreftet signifikant mindre biofilmdannelse i

nærvær av DNase, hos *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. aureus* (MF 1890). Dette indikerer en biofilm hvor eDNA spiller en viktig rolle. Forsøk har vist at eDNA er en komponent i biofilm hos både *S. aureus* og *S. epidermidis* (Izano et al. 2007). Det er også vist at bakteriene selv er i stand til å produsere ekstracellulære nukleaser som løser opp strukturen. Disse mekanismene gjør mikroorganismene selv i stand til og kontrollere biofilmaktivitet og dispergering av planktoniske celler (Mann et al. 2009). De fleste stammene som fikk hemming i biofilmdannelse i nærvær av dispersin B, fikk også reduksjon av biofilm i nærvær av DNase i dette forsøket. Dette kan tyde på at eDNA og PIA til sammen utgjør en viktig biofilmkomponent hos flere *Staphylococcus* i denne oppgaven.

Ved kartleggende forsøk var det kun et fåtall stammer som fikk en reduksjon av biofilm i nærvær av proteinase K og trypsin. Stammene som fikk redusert biofilmdannelse var hovedsakelig *S. cohnii*. Ved tre gjentak ble det vist at *S. cohnii* (MF 1834 og MF 1844) hadde signifikant redusert biofilmdannelse i nærvær av proteinase K (100 µg/ml) og trypsin (100 µg/ml). Kogan et al. (2005) viste i sin studie på sammensetning av biofilm hos kliniske stammer av *Staphylococcus*, at enkelte stammer ikke er avhengige av *ica*-operonet og PIA for å danne biofilm. Biofilmen hos disse stammene består hovedsakelig av teikoidsyrer og proteiner, og lar seg ikke løse av meta-periodat, som er en vanlig PIA-degraderende agent. Slik biofilm lar seg imidlertid løse av proteinase K (Boles & Horswill 2011). På bakgrunn av dette kan det indikeres at biofilm av *S. cohnii* (MF 1834 og MF 1844) er bygd opp av en stor del proteiner. Biofilmdannelsen hos MF 1844 og MF 1834 ble ikke hemmet i like stor grad av dispersin B og DNase. Dette indikerer at hverken eDNA eller PIA utgjør en viktig del av oppbygningen av biofilmen hos disse bakteriene. Det vil imidlertid være nødvendig med en kjemisk analyse av matriks for å bekrefte dette. Flere stammer av *Staphylococcus* produserer ekstracellulære proteaser. Det antas at dette er en del av mikroorganismens eget system for å løse opp biofilm og dispergere celler ut i miljøet (Boles & Horswill 2011). Proteinase K og trypsin har ulike substratspesifisitet. De vil derfor ha noe ulike effekt på proteinrike biofilmer, siden biofilm kan være satt sammen av ulike typer proteiner (Chaignon et al. 2007). Kartleggende forsøk viste at proteinase K og trypsin hadde ulike effekt for *S. capitis* (MF 1872) og *S. epidermidis* (MF 1789). Dette kan indikere at deler av biofilm hos de ulike stammene kan ha ulike proteinsammensetning.

Dette forsøket har vist at biofilm fra ulike stammer av *Staphylococcus* lot seg hemme av ulike enzymer. Dette indikerer en forskjellig sammensetning i biofilm matriks hos ulike stammer av

*Staphylococcus* ved inkubering i et NaCl og glukose-beriket vekstmedium ved 30 °C inkubasjonstemperatur. Kartleggingsforsøket på utvalget stammer, viste mest hemming ved dispersin B og DNase til stede hos de fleste stammene. Dette indikerer at størsteparten av stammene i dette forsøket hadde en sammensetning av PIA og eDNA i biofilm matriks. Det er imidlertid vist at sammensetning av biofilm matriks kan variere ved ulike vekstbetingelser. For eksempel danner *S. aureus* spesielt stabile proteiner i biofilm matriks ved vekst i PNG (pepton-NaCl-glukose) vekstmedium (Schwartz et al. 2012). Det er derfor grunn til å tro at andre vekstbetingelser for stammene i denne oppgaven, kunne gi en annen sammensetning av biofilm matriks. Dette ville gi en annen effekt av enzymbehandlingen.

### ***D-aminosyrer og norspermidin***

Kolodkin-Gal et al. (2010) viste i sin studie at D-aminosyrer kan ha en hemmende effekt på biofilm hos *S. aureus*. Kartlegging av effekt av aminosyrer på biofilmdannelsen hos alle stammene i dette forsøket, viste generelt liten effekt av D-aminosyrer og norspermidin på biofilmdannelse av *Staphylococcus*. De fleste stammene fikk 0-40 % hemming av biofilmdannelse i nærvær av de tilsatte komponentene. D-aminosyrene hadde imidlertid større effekt på flere av de langsomme stammene. Et utvalg stammer fra kartleggingen ble valgt ved videre forsøk med D-aminosyrer og L-aminosyrer. På grunn av liten effekt i kartleggingsforsøket ble D-aminosyrer testet i ulike konsentrasjoner, for å finne en konsentrasjon som ga større hemming av bakteriene. Det var også ønskelig å finne egnede konsentrasjoner til testing av L-aminosyrer og D-alanin. 2 mM var høyeste konsentrasjon med aminosyrer som ikke reduserte veksten av bakteriene.

Etter tre gjentak med et utvalg stammer, ble det bekreftet at D-aminosyrer hadde en beskjeden effekt på biofilmdannelse hos stammene. Figur 4.7 viser at D-aminosyrer hadde størst effekt på biofilmdannelse av *S. capitis* (MF 1872), hvor D-tryptofan, D-fenylalanin, D-leucin, og D-tyrosin hadde en hemmende effekt på biofilmdannelsen hos stammen. Generelt viste standardfeil at biofilmdannelsen av MF 1872 varierte mye fra forsøk til forsøk. Det er derfor vanskelig å si om D-aminosyrene hadde en reell effekt på biofilmdannelsen hos stammen, eller om nedgangen i biofilmdannelse skyldes naturlig variasjon. Figur 4.8 viser at *S. aureus* (MF 1890) fikk redusert biofilmdannelse i nærvær av D-tryptofan og D-fenylalanin. D-tyrosin og D-alanin hadde noe effekt på reduksjon av biofilmdannelsen. I teorien skal ikke D-alanin ha en hemmende effekt på biofilmdannelse, da D-alanin inngår som en naturlig komponent i celleveggen hos flere bakterier (Kolodkin-Gal et al. 2010). Figur 4.9 viser at D-tryptofan og

D-leucin var stammene med størst effekt på biofilmdannelsen til *S. cohnii* (MF 1844). Generelt gikk veksten alltid noe ned ( $\pm 10\%$ ) ved tilsetning av D og L-aminosyrer i vekstmediet hos MF 1844 (data ikke presentert). Noe av reduksjonen av biofilmdannelsen er antagelig en følge av dette. Figur 4.10 viser at D-aminosyrene hadde minimal innvirkning på biofilmdannelse av *S. epidermidis* (MF 2601).

Generelt hadde D-tryptofan størst effekt på stammene i denne oppgaven. Hochbaum et al. (2011) viste i sin studie at en blanding av D-fenylalanin, D-prolin og D-tyrosin har størst hemmende effekt på biofilm av *S. aureus*. Ved å teste D-aminosyrene hver for seg i dette forsøket, ble det vist at D-prolin hadde svært liten effekt. D-tyrosin og D-fenylalanin hadde en svak hemmende effekt. Siden D-aminosyrer hindrer en akkumulering av bakterier ved å løsne bindingene til adhesive proteiner, var det forventet at D-aminosyrene ville ha større effekt på antatt proteinrike biofilmer (Hochbaum et al. 2011). Biofilm av *S. cohnii* (MF 1844) lot seg hemme av proteaser i forsøk med enzymer. Stammen hadde imidlertid ingen markant nedgang i biofilmdannelse i nærvær av D-aminosyrer. I dette forsøket ble D-aminosyrene testet enkeltvis. I Kolodkin-Gal et al. (2010) og Hochbaum et al. (2011) sine studier ble D-aminosyrene i utgangspunktet testet i en blanding, i millimolare konsentrasjoner. Studiene viste at ved å teste D-aminosyrene hver for seg, krever større konsentrasjoner for effekt på biofilmdannelse. Dette indikerer at D-aminosyrene har en synergisk effekt på hverandre. Siden D-aminosyrer hadde noe effekt på enkelte stammer, er det fristende å tro at en blanding av D-aminosyrer ville hatt større effekt på hemming av biofilm hos utvalget av *Staphylococcus* i dette forsøket.

Flere av L-aminosyrene hadde sterk hemmende effekt på biofilmdannelse, uten å gi reduksjon av vekst (data ikke presentert). I flere tilfeller ga L-aminosyrene større reduksjon av biofilmdannelse enn D-aminosyrene. Dette stemmer ikke med tidligere forsøk som har vist at L-aminosyrer ikke skal ha en effekt på biofilmdannelse hos *S. aureus* (Kolodkin-Gal et al. 2010). Effekten av L-aminosyrer undergraver derfor effekten av D-aminosyrene i dette tilfellet. Effekten av L-aminosyrene indikerer at hemming av biofilmdannelse som følge av tilsatte aminosyrer, kan skyldes andre, ukjente mekanismer. Det understrekes imidlertid at forsøk med L-aminosyrer kun ble utført en gang. Flere gjentak av dette forsøket ville gitt en bedre indikasjon på om L-aminosyrer har en hemmende effekt, eller om effekten skyldes feil ved forsøket.

## 5.2 Rørmetode; biofilm i glassrør

I innledende forsøk ble alle 36 stammene i forsøket inkubert i 14 dager for å se om stammene dannet biofilm, og om biofilmen løste seg opp over tid. Av 36 stammer var det kun *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844 og MF 1834) som fikk nedgang i biofilmdannelse ved fjorten dagers inkubering (Figur 4.15). Det ble derfor utført flere gjentak med disse stammene. Ved å studere tid før nedgang i biofilmdannelse i ulike gjentak, ble det bestemt at kulturene skulle inkubere i fem dager før nedspinning og bevaring av supernatant.

Ved forsøk med supernatant på et utvalg stammer, ble det klart at supernatant fra *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) kun virket på seg selv og hverandre. Supernatant fra stammene hadde ingen effekt på de andre stammene i utvalget. Nijland et al. (2010) isolerte proteinene i supernatant fra *Bacillus licheniformis* i sitt forsøk med testing av supernatant, før proteinenes effekt på biofilm ble testet på et utvalg stammer. Det kan hende at lignende fremgangsmåte, med en oppkonsentrering av virkestoff, ville ført til større effekt av supernatant på andre stammer i dette forsøket.

Ubehandlet 1844-supernatant hadde en signifikant hemmende effekt på biofilmdannelse hos MF 2601 og MF 1844. Varmebehandlet supernatant (85 °C i 20 min) hadde også signifikant hemmende effekt på begge stammene, dette kommer frem av Figur 4.16. Ved å sammenligne varmebehandlet supernatant mot ubehandlet supernatant ble det klart at ubehandlet 1844-supernatant hadde signifikant bedre effekt på hemming av biofilm hos begge stammene, enn varmebehandlet supernatant. Hensikten med varmebehandling av supernatant, var å se om virkestoffene i supernatanten var varmelabile ekstracellulære enzymer. En varmebehandling ved 85 °C i 20 minutter ville inaktivert enzymaktiviteten, og supernatant ville ha mistet sin effekt. I dette forsøket ble det vist at 1844-supernatant hadde signifikant effekt selv etter varmebehandling. Både *S. aureus* og *S. epidermidis* er i stand til å danne TNase, en varmestabil nuklease som klyver både DNA og RNA (Tveten 2000). Flere mikroorganismer, slik som *Bacillus* spp., danner varmestabile proteaser (Ibrahim et al. 2006). Det er imidlertid usikkert om de mesofile stammene benyttet i dette forsøket danner slike varmestabile enzym. Ut fra forsøk med enzymer, ble det vist at biofilmen hos *S. cohnii* lot seg hemme av proteaser. En mulig forklaring til at 1844-supernatant har noe mindre effekt etter varmebehandling er at en bestanddel i supernatanten består av varmelabile proteaser. Ved å teste ulike fortyninger



av 1844-supernatant ble det klart at den hadde lite effekt i lave konsentrasjoner. Dette gir en indikasjon på at virkestoffene i 1844-supernatant har lite effekt i fortynnet tilstand.

Ubehandlet 2601-supernatant hadde en signifikant hemmende effekt på biofilmdannelse hos *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844), dette kommer frem av Figur 4.17. Varmebehandlet 2601-supernatant hadde ingen signifikant effekt på biofilmdannelse hos noen av stammene. Det ble imidlertid målt og observert noe reduksjon i biofilmdannelse med varmebehandlet 2601-supernatant. Det kan derfor ikke utelukkes at 2601-supernatant kan ha hatt varmestabile forbindelser som hemmet biofilmdannelse. Forsøk med enzymer viste at biofilmdannelse av MF 2601 blant annet ble hemmet av DNase. Det er kjent at *S. aureus* kan danne ekstracellulære nukleotidaser (Boles & Horswill 2011). På bakgrunn av dette kan det tenkes at DNase kan ha vært en viktig bestanddel i 2601-supernatant i dette forsøket. Forsøk med ulike fortynninger av supernatant viste effekt av supernatanten selv ved 10 og 100 ganger fortynning, noe som indikerer at 2601-supernatant er mer potent til fortynning, sammenlignet 1844-supernatant. Dette indikerer at virkestoffene i 2601-supernatant virker ved lave konsentrasjoner. MF 2601 vokste dårligere i fortynnet konsentrert TSBNG, dette kan ha påvirket dannelsen av biofilm hos stammen. Det ble observert at det konsentrerte vekstmediet fikk en langt mørkere farge etter autoklaving. En karamellisering av sukkeret i vekstmediet kan ha hemmet veksten hos bakterien. I videre forsøk anbefales det derfor å gi mediet en lett varmebehandling, med en påfølgende sterilfiltrering, i stedet for full autoklaving.

Forsøk med effekt av supernatant har tidligere avdekket en rekke mekanismer for hemming av biofilm hos ulike bakterier. Kolodkin-Gal et al. (2010) avdekket effekt av D-aminosyrer ved å benytte supernatant fra *B. subtilis* med nedgang i biofilmdannelse. Dannelse og effekt av norspermidin ble oppdaget ved samme metode (Kolodkin-Gal et al. 2012). Andre forsøk har påvist DNase-aktivitet ved forsøk med supernatant (Nijland et al. 2010). Det finnes en rekke mekanismer og forhold som fører til hemming/oppløsning av biofilm. Det antas at det også finnes mekanismer for oppløsning av biofilm som ennå ikke er oppdaget. Ved testing av supernatant fra et utvalg *Staphylococcus* kan det derfor ha vært forskjellige virkestoffer som hemmet biofilmdannelsen.

Supernatant av *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) hadde en hemmende effekt på seg selv og hverandre. Ved testing av enzymer, ble det vist at biofilmdannelse av stammene hadde ulik effekt i nærvær av enzymer, noe som indikerte ulik sammensetning av

biofilm matriks. Med bakgrunn i dette var det interessant å se at supernatant fra stammer med antatt forskjellig oppbygning av biofilm matriks, hadde en hemmende effekt på biofilmdannelsen hos hverandre. Dette indikerer forbindelser i supernatant som kan virke på stammer med en annen biofilm matriks enn opphavs-stammen.

Supernatant ble ikke analysert for eventuelle virkestoffer i dette forsøket. Dette ville gitt et konkret svar på hvilke virkestoff som hadde effekt. Vurdering av eventuelle forbindelser i supernatant som har hatt en effekt i dette arbeidet, blir derfor kun spekulasjoner.

### 5.3 Valg av vekstmedium til biofilmstudier

I innledende forsøk ble vekstmedier med ulikt innhold av glukose og NaCl testet på et utvalg stammer, med den hensikt å se hvilken sammensetning som ga best biofilmdannelse. TSBNG (0,33 % glukose og 0,26 % NaCl) ble valgt til videre arbeid på bakgrunn av god biofilmdannelse hos utvalget stammer. Det er kjent at NaCl og glukose i vekstmediet øker dannelsen av biofilm hos *Staphylococcus aureus* (Rode et al. 2007). Tilstedeværelse av glukose i vekstmediet, hemmer uttrykk av *agr*, og dette fører til at bakteriene blir værende i biofilm i stedet for å dispergere i miljøet (Boles & Horswill 2008). I denne oppgaven ble det også påvist god biofilmdannelse i vekstmedier tilsatt større mengder glukose og NaCl, enn for TSBNG. Det var imidlertid usikkerhet om hvorvidt det høye nivået av glukose og NaCl ville hindre eventuell enzymaktivitet i senere forsøk. Disse vekstmediene ble derfor ikke benyttet i videre arbeid. Størsteparten av stammene i dette forsøket var *S. aureus*. Ved forsøk med biofilmdannelse av andre stammer/arter, kan det ha vært hensiktsmessig å benytte vekstmedier med en annen sammensetning, da disse stammene kan ha andre mekanismer som regulerer dannelse og oppløsning av biofilm.

### 5.4 Evaluering av metode

Dyrking av biofilm i mikrotiterplater og reagensrør, med påfølgende farging av krystallfiolett og målt absorbans, er metoder som ofte benyttes innen biofilmforskning (Izano et al. 2007; Kaplan et al. 2004; Rode et al. 2007). I denne oppgaven ble det fokusert på ulike forbindelser som hemmer dannelse av biofilm. Ulike kjemiske forbindelser ble derfor tilsatt i vekstmediet før inkubering. Flere studier har behandlet biofilmdannelse med ulike kjemiske

forbindelser etter inkubering (Chaignon et al. 2007; Kaplan et al. 2004). Dette ville gitt informasjon om de ulike kjemiske forbindelsene har evne til å løse opp en etablert biofilm.

I dette arbeidet ble det benyttet stammer isolert fra næringsmiddelindustrien, lab-stammer og en klinisk stamme. Generelt hadde stammer isolert fra næringsmiddelindustrien mindre biofilmdannelse enn de typiske lab-stammene. Andre vekstmedier og inkuberingstemperaturer kan ha gitt andre resultat. Det erkjennes at inkuberingstemperatur benyttet i denne oppgaven ikke er representativ for typiske forhold innen næringsmiddelindustrien, der det som regel etterstrebes lavere temperaturer. En lavere inkuberingstemperatur ville imidlertid gitt lengre inkubasjonstid før dannelse av tilstrekkelig biofilmdannelse. På grunn av oppgavens tidsbegrensing ble inkuberingstemperaturen derfor satt til 30 °C.

Ved forsøk med biofilmdannelse i mikrotiterplater, var det flere stammer som brukte lang tid på produksjon av biofilm, og stammer som ikke dannet i biofilm i det hele tatt. Generelt er det kjent at biofilm fester seg lettere til hydrofobe overflater (teflon og plastikk) enn på hydrofile overflater (glass og metall) (Cloete et al. 2009). Ved biofilmstudier av *Staphylococcus*, er dyrking av biofilm i polystyren mikrotiterplater en mye anvendt metode. Det er imidlertid vist at enkelte *S. aureus* ikke fester seg til den hydrofobe overflaten i mikrotiterplatene. Kennedy og O'Gara (2004) sammenlignet biofilmdannelse hos et utvalg *S. aureus* i Nunc-behandlede polystyrene mikrotiterplater som har en mer hydrofil, negativt ladet overflate enn ubehandlede mikrotiterplater. Studien viste at enkelte *S. aureus* kun dannet biofilm i Nunc-behandlede mikrotiterplater (Kennedy & O'Gara 2004). Manglende biofilmdannelse hos enkelte stammer i dette forsøket, er derfor ikke nødvendigvis på grunn av stammens manglende evne til biofilmdannelse, men en redusert evne til å feste seg til hydrofobe overflater. Enkelte av stammene med manglende biofilmdannelse i mikrotiterplater, hadde noe vekt i reagensrør. Motsatt hadde enkelte stammer kun biofilmdannelse i mikrotiterplater, men ikke reagensrør.

## 5.5 Relevans av resultater for kontroll av biofilm i næringsmiddelindustrien

Innen industrien er kunnskap om sammensetningen av biofilm nyttig med tanke på fjerning og forebygging. Karbohydratrike biofilmer kan fjernes med alkaliske vaskemidler og enzymer. Proteinrike biofilmer fjernes gjerne med kloralkali (Grinstead 2009). Forsøk med enzymer ga en indikasjon på kjemisk sammensetning av biofilm hos ulike *Staphylococcus* i dette forsøket. Forsøket indikerte en sammensetning av biofilm hovedsakelig basert på karbohydrat (PIA) hos de fleste stammene. Dette gir en indikasjon på at alkaliske vaskemidler kan være velegnet for fjerning. Det understrekes imidlertid at en biofilm sjelden er homogen, og det er derfor vanskelig å forutsi sammensetningen av den. Dette gjør at det er utfordrende å velge rengjøringsmidler med målrettet effekt.

Effekten av dispersin B på de fleste stammene i dette arbeidet, samsvarer med forskning som har vist at PIA utgjør en stor del i mange *Staphylococcus* biofilmer (Chaignon et al. 2007). Et lite utvalg av stammene i dette forsøket hadde biofilm som ble hemmet av proteaser. Dette indikerer at det kan være hensiktsmessig å behandle en biofilm med dispersin B først, påfulgt av en protease (proteinase K eller trypsin) ved enzymatisk fjerning av *Staphylococcus* biofilm (Chaignon et al. 2007). Enzymatisk fjerning av biofilm benyttes imidlertid lite innen næringsmiddelindustrien i dag, da det ofte kreves høye temperaturer for å få bukt med annen mikrobiell aktivitet (Simões et al. 2009). Dette er lite forenelig med de fleste enzym, som vil inaktiveres ved høye temperaturer.

Resultatene i denne oppgaven gir kunnskap som kan være nyttig i videre arbeid med utvikling av metoder for kontroll av biofilm i næringsmiddelindustrien. Resultatene danner grunnlaget for rekke videre forsøk, som kan gi interessante resultater.

## 6 Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven indikerer at biofilm hos forskjellige stammer av *Staphylococcus* kan være sammensatt av ulike komponenter. Enkelte stammer av *S. cohnii* hadde signifikant mindre dannelse av biofilm i nærvær av proteaser. Dette indikerer en biofilm matriks hvor proteiner utgjør en større del. Enkelte stammer av *S. epidermidis* og *S. aureus* hadde signifikant mindre biofilmdannelse i nærvær av Dispersin B og DNase. Dette indikerer en biofilm hovedsakelig satt sammen av ekstracellulært DNA og PIA.

Forsøket viste at *S. epidermidis* (MF 2601) og *S. cohnii* (MF 1844) dannet komponenter under inkubering, som hadde en signifikant hemmende effekt på biofilmdannelse på seg selv og hverandre. *S. cohnii* (MF 1844) hadde biofilnhemmerende komponenter i sin supernatant, som ikke lot seg inaktivere ved varmebehandling. D-aminosyrer og norspermidin hadde lite effekt på hemming av biofilmdannelse hos *Staphylococcus* i dette arbeidet.

Denne kunnskapen kan være nyttig i utarbeidelse av bedre metoder for bekjempelse av biofilm i næringsmiddelindustrien.

## 7 Forslag til videre arbeid

Dette forsøket danner grunnlaget for en rekke videre forsøk.

- Bekrefte resultater fra denne undersøkelsen ved flere gjentak og flere stammer
- Undersøke biofilm matriks til stammer med ulike enzyeffekt
- Se på biofilmdannelse og effekt av enzymer under andre vekstforhold (temperatur og vekstmedium)
- Utførelse av kjemiske analyser av total protein, karbohydrat og tørrvekt for biofilm med ulik reaksjon på enzymbehandling
- Utsette biofilm med antatt ulik sammensetning (MF 2601 mot MF 1844) med desinfeksjonsmiddel for å se om de har ulik toleranse
- Visualisere de ulike komponentene i biofilmmatriks ved mikroskopering
- Benytte en blanding av flere D-aminosyrer, i stedet for å teste D-aminosyrene enkeltvis
- Teste D-aminosyrer på stammene med lang inkuberingstid
- Gjøre flere forsøk med L-aminosyrer og D-alanin
- Behandle ferdig dannet biofilm med enzymer/D-aminosyrer/norspermidin
- Jobbe videre med supernatant av MF 2601 og MF 1844. Sjekke for D-aminosyrer, norspermidin, enzymer, varmemestabile enzymer og eventuelle andre komponenter.

## 8 Referanser

- Boles, B. R. & Horswill, A. R. (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 4 (4).
- Boles, B. R. & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Cell press*, 19 (9): 449-455.
- Brackman, G., De Meyer, L., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2013). Biofilm inhibitory and eradicating activity of wound care products against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms in an in vitro chronic wound model. *Journal of Applied Microbiology*.
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Raguna, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. B. & Jabbouri, S. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied Microbial And Cell Physiology*, 75: 125-132.
- Cloete, E., Van Der Merwe, A. & Richards, M. (2009). Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilm in the food and beverage industries*. Cambridge, Storbritannia: Woodhead Publishing
- Crampton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. & Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, 67: 5427-5433.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 881-890.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. & O'Gara, J. P. (2005). The genetics of staphylococcal biofilm formation - will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11: 967-973.
- Ganesh Kumar, C. & Anad, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.
- Geisinger, E. (2008). *Studies on the Molecular Mechanisms of Staphylococcal Quorum Sensing*. New York: ProQuest, 2008.
- Grinstead, D. (2009). Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industry*. Cambridge, Storbritannia: Woodhead Publishing.
- Gross, M., Crampton, S. E., Götz, F. & Peschel, A. (2001). Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infection and Immunity*, 69 (5): 3423-3426.

- Gruszkaa, D. T., Wojdylaa, J. A., Bingham, R. J., Turkenburgc, J. P., Manfieldd, I. W., Steward, A., Leecha, A. P., Geogheganf, J. A., Fosterf, T. J., Clarkee, J., et al. (2012). Staphylococcal biofilm-forming protein has a contiguous rod-like structure. *PNAS*, 109 (17): 6370-6371.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knøchel, S. & Molin, S. (2010). Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (7): 2271-2279.
- Hausner, M. & Wuertz, S. (1999). High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8): 3710-3713.
- Hochbaum, A. I., Kolodkin-Gal, I., Foulstin, L., Kolter, R., Aizenberg, J. & Losick, R. (2011). Inhibitory Effects of D-amino Acids on *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *Journal of Bacteriology*, 193 (20): 5616-5622.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 utg. Baltimore, Maryland, USA: William & Wilkins.
- Ibrahim, N. A., Leow, T. C., Zaliha, R. N., Raham, R. A., Salleh, A. B. & Basri, M. (2006). *Thermostable Proteases*. Salleh, A. B., Rahman, N. Z. R. A. & Basri, M. (red.). New Lipases And Proteases: Nova Science Publishers.
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B. J., Preston III, J. F. & Romeo, T. (2004). Depolymerization of  $\beta$ -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine Disrupts the Integrity of Diverse Bacterial Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187 (1): 382-387.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. & Kaplan, J. B. (2007). Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2): 470-476.
- Jablonski, L. M. & Bohach, G. A. (1997). *Staphylococcus aureus*. I: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. & Montville, T. J. (red.) *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Washington D. C.: ASM Press.
- Jørgensen, H. (2005). *Staphylococcus aureus* in Norwegian bulk milk. Prevalence, molecular epidemiology and enterotoxigenetic potential. Oslo: Norges veterinærhøgskole, Veterinærinstituttet.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 48 (7): 2633-2636.
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Critical reviews in oral biology & medicine*, 89 (3): 205-218.



- Kennedy, C. A. & O'Gara, J. P. (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (11): 1171-1173.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S. (2005). Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett*, 255: 11-16.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. & Losick, R. (2010). D-amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science*, 328 (5978): 627-629.
- Kolodkin-Gal, I., Cao, S., Chai, L., Böttcher, T., Kolter, R., Clardy, J. & Losick, R. (2012). A Self-Produces Trigger for Biofilm Disassembly that Targets Exopolysaccharide. *Cell*, 149: 684-692.
- Lam, H., Oh, D. C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., De Pedro, M. A. & Waldor, M. K. (2009). D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. *Science*, 325 1552-1555
- Langsrud, S. (2009). Biofilm formation by Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus* spp. in food processing environments. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*. Cambridge, Storbritannia: Woodhead Publishing.
- Lindsay, A. J. (2011). Genomics of *Staphylococcus*. I: Wiedmann, M. & Zhang, W. (red.) *Genomics of foodborne bacterial pathogens*: Springer New York.
- Mah, T. C. & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology*, 9 (1): 34-39.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R. & Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *PLoS ONE*, 4 (6): 1-12.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews, Microbiology*, 10: 39-50.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-199.
- Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K. & Langsrud, S. (2003). Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among *Staphylococci* from Food and Food Processing Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9): 5648-5655.
- Nijland, R., Hall, M. J. & Burgess, J. G. (2010). Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading Bacterial DNase. *PLoS ONE*, 5 (10): 1-7.

- O'Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270 (2): 179-188.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* ,322 207-228.
- Pompermayer, D. M. C. & Gaylarde, C. C. (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylen. *Food Microbiology*, 17: 361-365.
- Prakash, B. Veeregowda, B. M. Krishnappa, G. (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current science*, 85 (9): 1299-1307.
- Queck, S. J. & Otto, M. (2008). *Staphylococcus epidermidis* and other Coagulase-Negative Staphylococci. I: Lindsay, J. A. (red.) *Staphylococcus: molecular genetics*: Caister Academic Press.
- Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A. & Møretrø, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 372-383.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Heilmann, C., Herrmann, M. & Mack, D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology*, 55 (6): 1883-1895.
- Rørvik, L. M. & Granum, P. E. (2007). *Staphylococcus aureus*. I: Granum, P. E. (red.) b. 3 *Matforgiftning, næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, s. 236-245. Kristiansand: HøyskoleForlaget.
- Schwartz, K., Syed, A. K., Stephenson, R. E., Rickard, A. H. & Boles, B. R. (2012). Functional Amyloid Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 8 (6).
- Simões, M., Simões, L. C. & Vieira, M. J. (2009). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43: 573-583.
- Stanga, M. (2010). *Sanitation, Cleaning and Disinfection in the Food Industry*. Weinheim, Tyskland: Wiley-VCH verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS in Microbiology*, 9: 222-227.
- Tveten, Y. (2000). Identifikasjon av stafylokokker. I: Berg, K., Sundsfjord, A. & Tveten, Y. (red.). *Stafylokokker*. Oslo: Statens institutt for folkehelse. 16-20.
- Vinh, D. C., Nichol, K. A., Rand, F. & Karlowksy, J. A. (2006). Not So Pretty in Pink: *Staphylococcus cohnii* Masquerading as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on Chromogenic Media. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (12).

- Yarwood, J. M., Bartles, D. J., Vopler, E. M. & Greensberg, E. P. (2004). Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 186: 1838-1850.
- Yarwood, J. M., Paquette, K. M., Tikh, I. B., Volper, E. M. & Greenberg, E. P. (2007). Generation of Virulence Factor Variants in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 189 (22): 7961-7967.

## **9 Vedleggsliste**

**Vedlegg 1:** Medier

**Vedlegg 2:** Løsninger

**Vedlegg 3:** Rådata, kartleggende forsøk med D-aminosyrer, norspermidin og enzymer

**Vedlegg 4:** Stammer med lav biofilmdannelse

**Vedlegg 5:** Rådata effekt av enzymer på et utvalg stammer

**Vedlegg 6:** Effekt av ulike konsentrasjoner av D-aminosyrer

**Vedlegg 7:** Rådata, effekt av D-aminosyrer på et utvalg stammer

**Vedlegg 8:** Rådata, innledende forsøk med rørmetode

**Vedlegg 9:** Rådata, effekt av ubehandlet og varmebehandlet supernatant

**Vedlegg 10:** Statistiske beregninger fra MiniTab

**Vedlegg 1: Medier**Tryptone soya agar, TSA

32 g TSA ble løst i 800 ml destillert vann. Dette ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C før løsningen ble kjølt ned til 50 °C i vannbad. Deretter ble agaren helt ut på petriskåler. Petriskålene ble oppbevart ved 4 °C.

Tryptone Soya Broth, TSB

12 g TSB ble løst i 400 ml destillert vann. Dette ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C. Buljongen ble oppbevart ved romtemperatur.

Tryptone Soya Broth, TSB + 2 % glukose + 0,5 % NaCL (TSBNG2)

12 g TSB ble løst i 400 ml destillert vann. Det ble deretter tilsatt 8 g glukose og 2 g NaCl. Dette ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C. Buljongen ble oppbevart ved romtemperatur.

Tryptone Soya Broth, TSB + 0,33 % glukose + 0,26 % NaCL (TSBNG)

12 g TSB ble løst i 400 ml destillert vann. Det ble deretter tilsatt 1,32 g glukose og 1,04 g NaCl. Dette ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C. Buljongen ble oppbevart ved romtemperatur.

Tryptone Soya Broth, TSB + 2 % glukose + 2 % NaCL (TSBind)

12 g TSB ble løst i 400 ml destillert vann. Det ble deretter tilsatt 8 g glukose og 8 g NaCl. Dette ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C. Buljongen ble oppbevart ved romtemperatur.

**Vedlegg 2: Løsninger**

## Stamløsninger for hemming av biofilm i mikrotiterplater

<b>Stamløsning</b>	<b>Konsentrasjoner</b>	<b>Løsningsmiddel</b>
D og L-Fenylalanin	50 mM	dH <sub>2</sub> O
D og L-Leucin	85 mM	dH <sub>2</sub> O
D og L-Tyrosin	50 mM	NaOH
D og L-Methionin	200 mM	dH <sub>2</sub> O
D og L-Tryptofan	25 mM	dH <sub>2</sub> O
D-Prolin	50 mM	dH <sub>2</sub> O
D-Alanin	50 mM	dH <sub>2</sub> O
Norsperimidin	20 mM	dH <sub>2</sub> O
DNaseI	25 mg/ml	dH <sub>2</sub> O
Dispersin B	2,24 mg/ml	Glycerol
Proteinase K	10 mg/ml	50 % glycerol, 10 mM trisHCl
Trypsin	--	Løst direkte i mediet

## Løsning for farging og oppløsning av biofilm

<b>Løsning</b>	<b>Sammensetning</b>	<b>Løsningsmiddel</b>
Krystallviolett	0,1 % (0,5 g i 500 ml dH <sub>2</sub> O)	dH <sub>2</sub> O
Surgjort etanol	Etanol tilsatt 0,2 % HCl - (2 ml 37 % HCl i 1000 ml etanol)	-

**Vedlegg 3:** Rådata; kartleggingsforsøk med D-aminosyrer, norspermidin og enzymer. Blank (målt OD<sub>600</sub>) av brønner kun tilsatt vekstmedium) er trukket fra verdiene som vises i tabellene.

Tabellen viser rådata av «raske stammer». Verdiene i tabellen er gjennomsnitt av to paralleller. Tabellen viser resultat fra to forsøk.

	Kontroll	Disp	DNase	Prot	Tryp	Norsp	Leu	Phe	Met	Tyr	Tryp	Pro
<b>Blank 1</b>	0,10	0,07	0,07	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08
<b>Blank 2</b>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09	0,08	0,13	0,09	0,05	0,09	0,12
<b>1890</b>	1,43	0,18	0,08	2,29	1,75	0,41	1,45	0,70	1,43	0,98	0,91	1,61
	1,92	0,21	0,19	2,32	1,77	1,67	1,18	1,81	1,69	1,14	0,86	1,52
<b>3230</b>	0,95	0,10	0,03	2,45	1,42	0,43	0,95	0,51	0,49	0,41	0,85	1,11
	1,06	0,08	0,05	1,76	1,07	0,81	0,71	0,88	0,81	0,62	0,53	0,87
<b>1981</b>	0,31	0,12	0,19	1,50	0,88	0,22	0,17	0,24	0,25	0,20	0,15	0,23
	0,67	0,13	0,11	0,80	0,40	0,46	0,23	0,39	0,37	0,36	0,16	0,47
<b>3674</b>	1,77	0,05	0,00	2,85	2,12	0,77	1,09	0,69	0,90	1,16	0,64	1,57
	1,92	0,01	-0,01	3,04	2,68	1,79	1,70	2,36	1,86	1,51	1,50	2,23
<b>1871</b>	0,23	0,02	0,23	0,07	0,69	0,08	0,14	0,12	0,67	0,19	0,40	0,55
	0,72	0,15	0,08	0,40	2,07	1,45	0,39	1,49	1,57	0,82	0,28	1,67
<b>1872</b>	0,15	0,04	0,21	0,11	0,40	0,14	0,21	0,09	0,70	0,33	0,43	0,67
	1,07	0,19	0,11	0,76	2,47	2,02	0,69	2,01	2,18	0,50	0,39	2,10
<b>1844</b>	1,93	0,78	1,26	0,06	0,10	1,47	1,91	1,58	2,25	1,66	1,09	1,68
	1,87	1,63	0,96	0,03	0,02	1,67	1,08	1,49	1,33	1,71	1,20	1,48
<b>1834</b>	1,64	0,95	1,42	0,07	0,13	1,60	1,31	1,57	2,29	1,59	1,20	1,83
	1,61	1,73	0,92	0,04	0,05	1,61	0,98	1,43	1,44	1,65	1,29	1,37
<b>1891</b>	0,83	0,10	0,03	0,02	0,01	0,01	0,40	0,33	0,49	0,44	0,96	0,38
	0,34	0,06	0,04	0,48	0,28	0,30	0,08	0,31	0,07	0,19	0,03	0,25
<b>2601</b>	2,73	0,14	0,14	3,06	3,14	2,94	2,56	0,53	2,20	3,00	2,86	2,22
	2,37	0,28	0,10	3,23	2,72	2,99	2,33	2,96	2,42	2,56	2,93	2,85
<b>1789</b>	1,74	0,03	0,54	0,32	2,07	2,00	0,83	0,58	1,35	1,65	0,99	1,79
	0,94	0,05	0,43	0,24	1,48	1,44	0,26	1,22	0,61	1,45	0,41	1,14
<b>2613</b>	2,48	0,16	0,06	-0,02	0,27	0,22	0,94	0,53	0,72	0,24	2,00	0,17
	0,43	0,33	0,17	0,02	0,32	0,29	0,33	0,22	0,28	0,26	0,18	0,29
<b>1862</b>	0,80	0,42	0,68	0,02	0,01	0,61	0,41	0,85	0,83	0,78	0,45	0,65
	0,62	0,61	0,22	0,02	0,06	0,45	0,65	1,02	0,38	0,47	0,29	0,50

Tabellen viser rådata av «langsomme». Verdiene i tabellen er gjennomsnitt av to paralleller. Tabellen viser resultat fra to forsøk. Langsomme stammer hadde manglende vekst i første forsøk.

	Kontroll	Disp	DNase	Prot	Tryp	Norsp	Leu	Phe	Met	Tyr	Tryp	Pro
<b>Blank 1</b>	0,10	0,07	0,07	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08
<b>Blank 2</b>	0,08	0,08	0,12	0,09	0,09	0,23	0,13	0,12	0,12	0,11	0,10	0,12
<b>3675</b>	0,05	0,04	0,02	0,14	0,02	0,03	0,08	0,05	0,35	0,19	0,15	0,05
	1,57	0,10	0,44	0,78	0,57	-0,04	0,28	0,15	0,13	0,03	0,46	0,15
<b>3714</b>	0,12	0,06	0,03	0,02	-0,01	0,01	0,04	-0,01	0,25	0,01	0,09	0,00
	2,53	0,08	2,69	0,78	0,84	0,34	1,72	0,49	0,98	0,69	0,32	0,50
<b>3715</b>	0,08	0,08	0,02	0,07	0,03	0,07	0,07	0,03	0,12	0,07	1,37	0,27
	1,61	0,19	0,81	0,05	1,01	0,10	0,99	0,29	0,40	0,20	0,17	1,01
<b>3722</b>	0,10	0,05	0,02	0,00	1,94	0,06	0,26	0,14	0,28	0,11	0,02	0,08
	0,33	0,27	0,14	-0,02	1,08	0,71	0,22	0,23	0,20	0,31	0,23	0,23
<b>1904</b>	0,03	0,17	0,06	0,04	0,03	0,06	0,05	0,02	0,04	0,04	0,05	0,03
	0,27	0,52	0,02	0,07	0,05	0,31	0,21	0,30	0,22	0,32	0,19	0,23
<b>1886</b>	1,25	0,14	0,14	0,17	0,48	0,21	0,16	0,37	0,21	0,20	0,80	0,33
	0,10	0,20	0,01	0,07	0,74	0,04	0,06	0,11	0,13	0,19	0,07	0,06
<b>4698</b>	-0,01	0,19	0,09	0,04	0,05	0,03	0,01	0,03	0,03	0,01	0,01	-0,00
	0,22	0,56	0,05	0,03	0,03	-0,06	0,10	0,09	0,08	0,12	0,12	0,10



**Vedlegg 4:** Stammer med lav biofilmdannelse

Oversikt over stammer med gjennomsnittlig biofilmdannelse under OD<sub>600</sub> 0,2, etter 2 gjentak

<b>Stamme</b>	<b>Nofima stammenummer (MF)</b>	<b>OD (gjennomsnitt av 2 målinger, 4 paralleller)</b>
<i>S. aureus</i>	1784	0,05
<i>S. aureus</i>	1813	0,06
<i>S. aureus</i>	2009	0,19
<i>S. aureus</i>	3672	0,06
<i>S. aureus</i>	3671	0,08
<i>S. piscifermentas</i>	4713	0,06
<i>S. simulans</i>	3625	0,08
<i>S. warneri</i>	3287	0,05
<i>S. cohnii</i>	3624	0,03
<i>S. equorum</i>	3788	0,12
<i>S. sp</i>	4658	0,10
<i>S. saprophiticus</i>	2065	0,00
<i>S. equorum</i>	3723	0,05
<i>S. equorum</i>	2321	0,12
<i>S. saprophyticus*</i>	GB II 83-03	0,31*
<i>S. piscifermentas</i>	08-12-158	0,14

**Vedlegg 5:** Rådata effekt av enzymer på et utvalg stammer

Tabellene viser gjennomsnitt av to paralleller. Målt OD<sub>600</sub> for blank, er trukket fra verdiene som presenteres i tabellene. Biofilm er målt i mikrotiterplater.

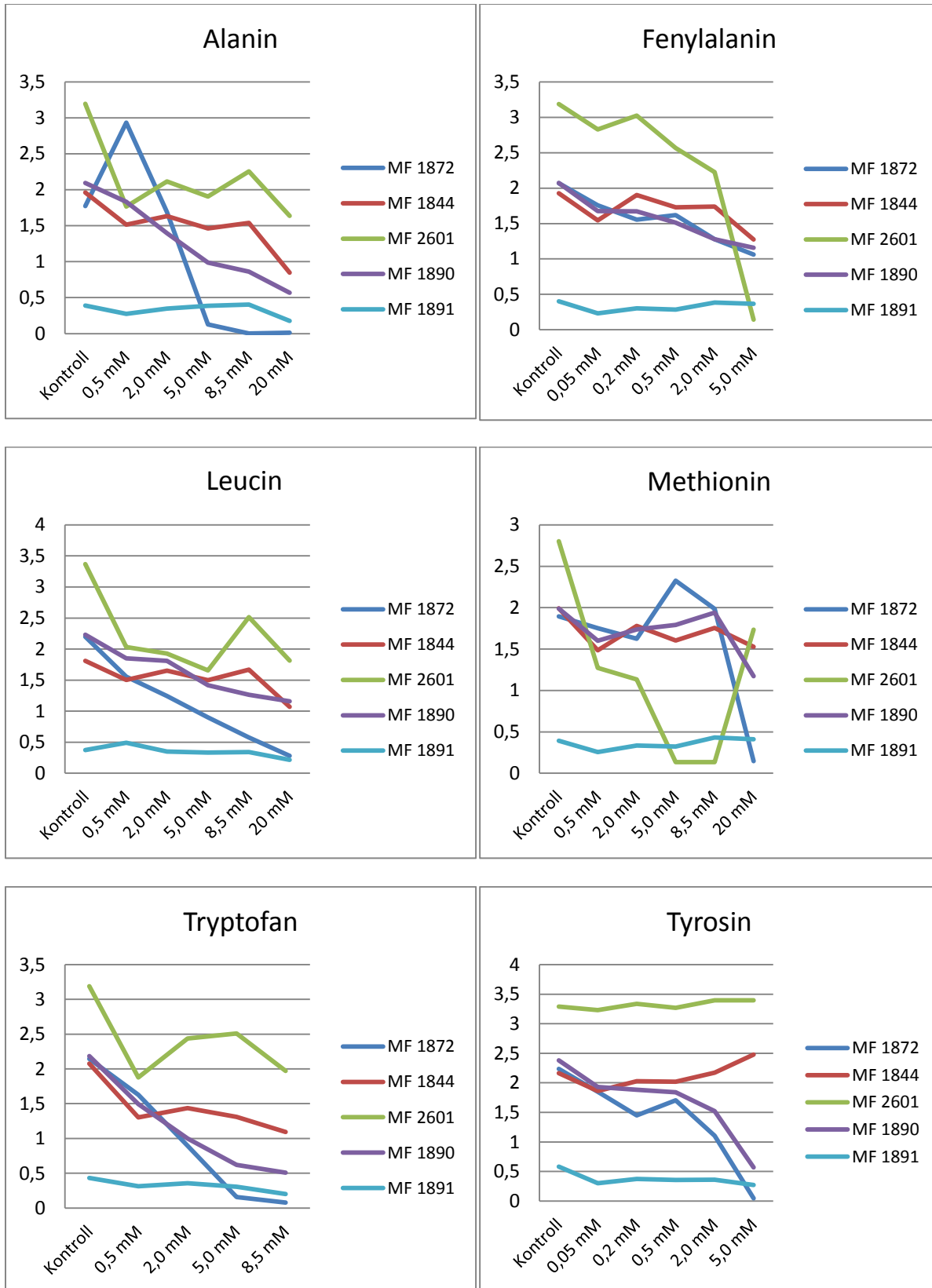
<b>Kontroll</b>	<b>1872</b>	<b>1844</b>	<b>2601</b>	<b>1890</b>	<b>1834</b>
1. gjentak	0,29	1,42	2,98	1,30	1,59
2. gjentak	1,07	1,87	2,37	1,92	1,61
3. gjentak	1,88	2,24	3,38	1,82	2,36

<b>Trypsin</b>	<b>1872</b>	<b>1844</b>	<b>2601</b>	<b>1890</b>	<b>1834</b>
1. gjentak	0,40	0,10	3,14	1,75	0,13
2. gjentak	2,47	0,02	2,72	1,77	0,05
3. gjentak	1,49	0,02	2,59	1,08	0,01

<b>DNase</b>	<b>1872</b>	<b>1844</b>	<b>2601</b>	<b>1890</b>	<b>1834</b>
1. gjentak	0,21	1,26	0,14	0,08	1,42
2. gjentak	0,11	0,96	0,10	0,19	0,92
3. gjentak	0,16	1,33	0,16	0,05	1,13

<b>Proteinase</b>	<b>1872</b>	<b>1844</b>	<b>2601</b>	<b>1890</b>	<b>1834</b>
1. gjentak	0,11	0,06	3,06	2,29	0,07
2. gjentak	0,76	0,03	3,23	2,32	0,05
3. gjentak	0,39	0,01	3,41	1,81	0,01

<b>Dispersin</b>	<b>1872</b>	<b>1844</b>	<b>2601</b>	<b>1890</b>	<b>1834</b>
1. gjentak	0,04	0,78	0,14	0,18	0,95
2. gjentak	0,19	1,63	0,28	0,21	1,73
3. gjentak	0,10	1,11	0,27	0,30	1,07

**Vedlegg 6: Effekt av ulike konsentrasjoner av D-aminosyrer**


**Vedlegg 7:** Rådata effekt av D-aminosyrer på et utvalg stammer

Tabellene viser gjennomsnitt av to paralleller. Målt OD<sub>600</sub> for blank, er trukket fra verdiene som presenteres i tabellene. Biofilm er målt i mikrotiterplater

<b>Kontroll</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	1,96	3,20	1,77	2,10
2. gjentak	2,01	2,28	1,38	1,64
3. gjentak	2,49		1,19	1,64

<b>Fenylalanin</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	1,74	2,23	1,28	1,28
2. gjentak	1,95	2,75	1,10	1,55
3. gjentak	2,25		0,16	1,31

<b>Leucin</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	1,64	1,91	1,23	1,80
2. gjentak	1,87	3,06	1,58	1,78
3. gjentak	1,58		0,26	1,24

<b>Methionin</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	1,78	1,14	1,63	1,74
2. gjentak	1,87	2,90	1,79	1,60
3. gjentak	1,75		0,98	1,37

<b>Trypsin</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	1,43	2,43	0,89	0,99
2. gjentak	1,79	2,95	0,93	1,14
3. gjentak	1,64		0,26	0,89

<b>Tyrosin</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	2,18	3,40	1,11	1,53
2. gjentak	2,19	3,22	0,66	1,44
3. gjentak	2,54		0,49	1,36

<b>Alanin</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>	<b>MF 1872</b>	<b>MF 1890</b>
1. gjentak	1,63	2,11	1,68	1,39
2. gjentak	1,99	2,80	2,32	1,60
3. gjentak	2,05		0,81	1,49

## Vedlegg 8: Rådata, innledende forsøk med rørmetode

Stamme	Dag	Ring før farging	Ring etter farging	Biofilm på bunn/bunnfall	Farge på glass	OD <sub>600</sub> NM
MF 1862	1	-	-	tett	-	0,153
	2	-	-	tett	-	-0,163
	6	+	++	spredt	+	0,183
	10	+	++	spredt	+	0,175
	14	+	++(+)	spredt	+	0,258
MF 1789	1	++	++	tett	-	-0,029
	2	++	-	tett	-	-0,035
	6	++	+++	spredt	-	0,326
	10	+	+++	spredt	+	0,192
	14	+	+++	spredt	++(+)	0,942
MF 3287	1	-	-	tett	-	-0,091
	2	+	+	tett	-	-0,106
	6	+	+++	spredt	-	0,231
	10	+++	+++	spredt	+	0,439
	14	++	++(+)	spredt	+	0,711
MF 1834	1	+	+	tett	+++	2,517
	2	+++	+++	tett	+++	2,618
	6	+++	+++	tett	+++	2,257
	10	+++	+++	tett	+++	1,635
	14	+	++	tett	+++	1,246
MF 1813	1	+	-	tett	-	-0,138
	2	-	-	tett	-	-0,057
	6	+	+	tett	-	0,109
	10	++	+	tett	-	0,131
	14	++	+	tett	-	0,418
MF 1890	1	++	+	spredt	-	0,072
	2	++	+	spredt	-	-0,023
	6	++	+	spredt	-	0,118
	10	++	+	spredt	-	-0,054
	14	++	(+)	spredt	-	0,210
MF 1844	1	+	++	tett	++	2,144
	2	-	++	tett	+++	1,858
	6	+	+++	tett	+++	1,388
	10	+	+++	spredt	+++	1,321
	14	+	++	spredt	++(+)	0,914
MF 3714	1	-	-	spredt	-	-0,146
	2	-	-	spredt	-	-0,122
	6	+	-	spredt	-	-0,054
	10	+	+	spredt	-	-0,167
	14	+	+	spredt	+	0,229
MF 3675	1	-	-	spredt	+	-0,053
	2	+	-	spredt	-	-0,140
	6	+++	+	spredt	-	-0,011
	10	+++	+	spredt	-	-0,112
	14	+++	+	spredt	+	0,179
MF	1	++	-	tett	-	0,004

1981	2	++	+	spredt	+	0,104
	6	++	+	spredt	-	-0,061
	10	++	++	Borte	-	0,082
	14	++	+	borte	-	-0,012
MF 3722	1	-	-	tett	-	0,155
	2	++	+++	spredt	+	0,704
	6	+++	+++(+)	spredt	+	2,327
	10	+++	+++(+)	tett	++	0,603
	14	+++	+++(+)	tett	++	0,868
MF 3715	1	-	-	tett	-	0,061
	2	-	-	spredt	+	0,057
	6	+	-	spredt	+	0,024
	10	+	+	grums	+	0,056
	14	+	++	borte	++	0,220
MF 3723	1	+	-	tett	+	0,024
	2	+	-	tett	-	0,029
	6	+++	+	tett	-	0,026
	10	+++	++	tett	+	0,040
	14	+++	++	tett	+	0,091
MF 3788	1	-	-	tett	-	-0,098
	2	++	+++	tett	-	0,256
	6	++	++	tett	+	0,120
	10	++	+++	tett	+	0,337
	14	+++	+++	tett	+	0,491
MF 2009	1	-	-	spredt	+	0,340
	2	-	-	spredt	+	0,158
	6	+	-	spredt	-	0,110
	10	+	+	grums	-	0,036
	14	+	++	borte	+	0,121
MF 3674	1	+	+	spredt	+	0,254
	2	-	-	spredt	++	0,294
	6	+	-	spredt	+	0,078
	10	-	(+)	borte	(+)	0,037
	14	+	+++	spredt	++	0,295
MF 3675	1	+	-	spredt	-	0,063
	2	+	+	spredt	+	0,018
	6	++	-	spredt	-	-0,044
	10	+	(+)	spredt	-	-0,063
	14	++	+	spredt	(+)	-0,038
MF 1886	1	+	-	tett	-	0,009
	2	++	+	tett	+	0,148
	6	+++	+	tett	-	0,029
	10	+++ (+)	+(+)	tett	-	0,058
	14	+++(+)	++(+)	tett	+	0,347
MF 2613	1	-	-	tett	-	0,025
	2	++	+++	tett	+	0,242
	6	+++	++	tett	++	0,322
	10	++	+++	tett	++	0,486
	14	+++	+++(+)	tett	++	0,588
MF 3714	1	+	-	tett	-	-0,068
	2	+	-	spredt	-	-0,038
	6	+	+	spredt	-	-0,006
	10	++	+	grums	-	-0,061

	14	+++	+(+)	grums	-	0,068
MF 1891	1	++	++	spredt	-	0,638
	2	+++	-	spredt	-	-0,10
	6	++	-	spredt	-	0,019
	10	++	+	borte	-	0,035
	14	+++	++	borte	+	0,298
MF 3230	1	-	-	spredt	(+)	-0,072
	2	+	-	spredt	-	-0,053
	6	++	-	spredt	-	-0,038
	10	++	(+)	spredt	-	0,027
	14	++	++	spredt	(+)	0,116
MF 3624	1	-	-	tett	-	-0,04
	2	+	+	tett	-	0,098
	6	+	+++	tett	-	0,546
	10	++	++	tett	+	0,199
	14	++(+)	++(+)	tett	++	0,387
MF 3625	1	-	-	spredt	-	-0,119
	2	-	-	tett	-	-0,027
	6	++	++	tett	+	0,541
	10	++	++	tett	++	0,373
	14	++	++	tett	++	0,563
MF 4658	1	-	+	spredt	-	-0,083
	2	+	(+)	spredt	+	0,454
	6	+	+++	spredt	+	0,453
	10	++	+++(+)	spredt	+	0,676
	14	++	+++(+)	spredt	+(+)	0,601
MF 0812- 15-8	1	-	-	tett	+(+)	-0,019
	2	-	-	tett	+	0,074
	6	++	(+)	tett	-	0,00
	10	++(+)	++	tett	+	0,183
	14	+++	+	tett	+	0,097
MF 4713	1	-	-	tett	(+)	-0,013
	2	(+)	-	tett	+	0,157
	6	++	+	tett	-	0,075
	10	++	+	tett	-	0,039
	14	+++	++	tett	(+)	0,103
MF 4698	1	-	-	tett	-	0,042
	2	-	-	tett	-	0,117
	6	++	+	tett	-	0,149
	10	+++	+	tett	-	0,015
	14	+++	+	tett	-	0,102
MF 1904	1	-	-	tett	-	0,051
	2	-	-	tett	-	0,151
	6	++	+	tett	-	0,033
	10	++	-	tett	-	-0,012
	14	++	++(+)	tett	-	0,368
MF 1872	1	-	-	spredt	-	-0,043
	2	-	-	spredt	-	0,01
	6	++	(+)	spredt	-	0,061
	10	++(+)	(+)	spredt	-	-0,014
	14	++(+)	(+)	spredt	-	0,245
MF 2065	1	-	-	tett	-	-0,033
	2	(+)	+	tett	-	0,105

	6	++	++(+)	tett	-	0,136
	10	+	++	tett	-	0,080
	14	+(+)	+++	tett	(+)	0,186
MF 1871	1	-	-	spredt	-	-0,05
	2	(+)	(+)	spredt	-	0,007
	6	++	-	spredt	-	-0,006
	10	+++	-	spredt	-	-0,026
	14	+++	+	spredt	-	0,224
MF 2601	1	++	++(+)	spredt	++	2,362
	2	++	++	spredt	+++	1,871
	6	++	+++	spredt	+++	1,940
	10	++	+++	spredt	+++	0,803
	14	+++	++	spredt	++(+)	0,345
MF 1789	1	-	-	tett	-	0,046
	2	(+)	-	tett	-	0,127
	6	+	-	tett	-	0,071
	10	-	-	tett	-	-0,057
	14	+	-	tett	-	0,076
MF 2321	1	-	-	tett	-	-0,037
	2	(+)	-	tett	(+)	0,081
	6	+	+++	tett	(+)	0,526
	10	+++	++	tett	+	0,602
	14	+++	+++	tett	+	1,019
MF GB	1	++	-	tett	(+)	0,068
	2	-	-	tett	-	-0,059
	6	++	+	tett	-	0,062
	10	++	++(+)	tett	-	0,274
	14	+++	+++	tett	+	0,783
MF 3672	1	(+)	-	tett	(+)	0,073
	2	-	-	tett	(+)	-0,029
	6	-	+	tett	(+)	0,030
	10	-	+	tett	(+)	0,054
	14	(+)	+	tett	+	0,234
MF 3671	1	(+)	(+)	spredt	+	0,078
	2	(+)	-	spredt	+	0,017
	6	+	(+)	spredt	(+)	0,032
	10	++	(+)	spredt	(+)	0,000
	14	++	+	spredt	+	0,177

- = Ingen biofilmdannelse

(+) = Antydning til biofilmdannelse

+ = Biofilmdannelse

++ = Bra biofilmdannelse

+++ = Mye biofilmdannelse

+++(+)= Svært mye biofilmdannelse



**Vedlegg 9:** Rådata effekt av ubehandlet og varmebehandlet supernatant

Målt biofilmdannelse i reagensrør ( $OD_{600}$ ). Målt  $OD_{600}$  for blank er trukket fra verdiene som vises i tabellen.

<b>1844 supernatant</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>
Kontroll 1	1,53	0,683
Kontroll 2	1,771	0,832
Kontroll 3	1,672	0,789
1. gjentak	0,003	0,158
2. gjentak	0,251	0,16
3. gjentak	0,129	0,157
1. gjentak varmebeh.	0,327	0,085
2. gjentak varmebeh.	0,198	0,123

<b>2601 supernatant</b>	<b>MF 1844</b>	<b>MF 2601</b>
1. kontroll	2,127	0,649
2. kontroll	1,32	0,511
3. kontroll	1,595	0,508
1. gjentak	1,284	0,091
2. gjentak	0,768	0,047
3. gjentak	0,672	0,027
1. gjentak varmebeh.	1,243	0,153
2. gjentak varmebeh.	0,716	0,03

## Vedlegg 10: Statistiske beregninger fra MiniTab

### Hvilke enzymer virker på hvilke stammer?

- **Spørsmål: Hvilke biofilmer er signifikant forskjellige?**

#### One-way ANOVA: 1872 versus C1

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	4	4,256	1,064	2,93	0,076
Error	10	3,629	0,363		
Total	14	7,885			

S = 0,6024    R-Sq = 53,97%    R-Sq(adj) = 35,56%

#### Grouping Information Using Tukey Method

C1	N	Mean	Grouping
Try	3	1,4535	A
K	3	1,0820	A
Proteinase	3	0,4205	A
DNase	3	0,1562	A
Dispersin	3	0,1114	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of C1

Individual confidence level = 99,18%

#### One-way ANOVA: 1844 versus C1

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	4	7,5426	1,8857	23,72	0,000
Error	10	0,7949	0,0795		
Total	14	8,3375			

S = 0,2819    R-Sq = 90,47%    R-Sq(adj) = 86,65%

#### Grouping Information Using Tukey Method

C1	N	Mean	Grouping
K	3	1,8421	A
DNase	3	1,1806	A
Dispersin	3	1,1741	A
Try	3	0,0457	B
Proteinase	3	0,0322	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of C1

Individual confidence level = 99,18%

### One-way ANOVA: **2601** versus C1

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	4	28,6116	7,1529	93,93	0,000
Error	10	0,7615	0,0762		
Total	14	29,3731			

S = 0,2760    R-Sq = 97,41%    R-Sq(adj) = 96,37%

Grouping Information Using Tukey Method

C1	N	Mean	Grouping
Proteinase	3	3,2339	A
K	3	2,9081	A
Try	3	2,8144	A
Dispersin	3	0,2318	B
DNase	3	0,1311	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of C1

Individual confidence level = 99,18%

### One-way ANOVA: **1890** versus C1

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	4	10,0228	2,5057	35,19	0,000
Error	10	0,7120	0,0712		
Total	14	10,7348			

S = 0,2668    R-Sq = 93,37%    R-Sq(adj) = 90,71%

Grouping Information Using Tukey Method

C1	N	Mean	Grouping
Proteinase	3	2,1370	A
K	3	1,6806	A
Try	3	1,5327	A
Dispersin	3	0,2288	B
DNase	3	0,1056	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of C1

Individual confidence level = 99,18%

**One-way ANOVA: 1834 versus C1**

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	4	7.5750	1.8937	21.76	0.000
Error	10	0.8704	0.0870		
Total	14	8.4453			

S = 0.2950    R-Sq = 89.69%    R-Sq(adj) = 85.57%

## Grouping Information Using Tukey Method

C1	N	Mean	Grouping
K	3	1.8533	A
Dispersin	3	1.2479	A
DNase	3	1.1552	A
Try	3	0.0629	B
Proteinase	3	0.0439	B

Means that do not share a letter are significantly different

**Effekt av supernatant**

- **Effekt av 1844 supernatant på MF 1844 og MF 2601 målt mot kontroll**

**Paired T-Test and CI: MF 1844 tilsatt supernatant mot MF 1844 kontroll**

Paired T for 1844\_S - 1844\_K

	N	Mean	StDev	SE Mean
1844_S	3	0.1277	0.1240	0.0716
1844_K	3	1.6577	0.1211	0.0699
Difference	3	-1.53000	0.01179	0.00681

95% CI for mean difference: (-1.55929; -1.50071)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -224.77    P-Value = 0.000

**Paired T-Test and CI: MF 2601 tilsatt supernatant mot MF 2601 kontroll**

Paired T for 2601\_S - 2601\_K

	N	Mean	StDev	SE Mean
2601_S	3	0.1583	0.0015	0.0009
2601_K	3	0.7680	0.0767	0.0443
Difference	3	-0.6097	0.0760	0.0439

95% CI for mean difference: (-0.7985; -0.4209)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -13.89    P-Value = 0.005

- **Effekt av 2601supernatant på MF 1844 og MF 2601 målt mot kontroll**

### Paired T-Test and CI: MF 1844 tilsatt supernatant mot MF 1844 kontroll

Paired T for 1844\_2601sup\_S - 1844\_2601sup\_K

	N	Mean	StDev	SE Mean
1844_2601sup_S	3	0.908	0.329	0.190
1844_2601sup_K	3	1.681	0.410	0.237
Difference	3	-0.773	0.195	0.113

95% CI for mean difference: (-1.258; -0.288)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -6.85 P-Value = 0.021

### Paired T-Test and CI: MF 2601 tilsatt supernatant mot MF 2601 kontroll

Paired T for 2601\_2602sup\_S - 2601\_2602sup\_K

	N	Mean	StDev	SE Mean
2601_2601sup_S	3	0.0550	0.0327	0.0189
2601_2601sup_K	3	0.5560	0.0806	0.0465
Difference	3	-0.5010	0.0501	0.0289

95% CI for mean difference: (-0.6254; -0.3766)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -17.32 P-Value = 0.003

### Sammenligning: varmebehandlet supernatant med kontroll

- **Spørsmål: vil varmebehandlet supernatant hemme biofilm?**

#### 1844-supernatant

### Paired T-Test and CI: MF 1844 i varmebehandlet supernatant mot MF 1844 kontroll

Paired T for 1844 varmebeh 2601sup - 1844 K

	N	Mean	StDev	SE Mean
1844 varmebeh 1844sup	2	0.2625	0.0912	0.0645
1844 K	2	1.7215	0.0700	0.0495
Difference	2	-1.4590	0.0212	0.0150

95% CI for mean difference: (-1.6496; -1.2684)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -97.27 P-Value = 0.007

**Paired T-Test and CI: MF 2601 i varmebehandlet supernatant mot MF 2601 kontroll**

Paired T for 2601 varmebeh 1844sup - 2601 K

	N	Mean	StDev	SE Mean
2601 varmebeh 1844sup	2	0,1040	0,0269	0,0190
2601 K	2	0,8105	0,0304	0,0215
Difference	2	-0,7065	0,0573	0,0405

95% CI for mean difference: (-1,2211; -0,1919)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -17,44 P-Value = 0,036

**2601-supernatant****Paired T-Test and CI: MF 1844 i varmebehandlet supernatant mot MF 1844 kontroll**

Paired T for 1844 varmebeh 2601sup - 1844 kontroll

	N	Mean	StDev	SE Mean
1844 varmebeh 2601sup	2	0,980	0,373	0,264
1844 kontroll	2	1,458	0,194	0,137
Difference	2	-0,478	0,567	0,401

95% CI for mean difference: (-5,573; 4,617)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -1,19 P-Value = 0,444

**Paired T-Test and CI: MF 2601 i varmebehandlet supernatant mot MF 2601 kontroll**

Paired T for 2601 varmebeh 2601sup - 2601 kontroll

	N	Mean	StDev	SE Mean
2601 varmebeh 2601sup	2	0,0915	0,0870	0,0615
2601 kontroll	2	0,5095	0,0021	0,0015
Difference	2	-0,4180	0,0849	0,0600

95% CI for mean difference: (-1,1804; 0,3444)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -6,97 P-Value = 0,091

- **Spørsmål: Hemmer varmebehandlet supernatant biofilm like mye som den som ikke er varmebehandlet?**

### **Varmebehandlet 1844 supernatant mot ubehandlet 1844 supernatant**

#### **Paired T-Test and CI: MF 1844 i varmebehandlet 1844-supernatant**

Paired T for 1844 2601sup - 1844 varmebeh 2601sup

	N	Mean	StDev	SE Mean
1844 2601sup	2	0.1900	0.0863	0.0610
1844 varmebeh 1844sup	2	0.2625	0.0912	0.0645
Difference	2	-0.07250	0.00495	0.00350

95% CI for mean difference: (-0.11697; -0.02803)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -20.71 P-Value = 0.031

#### **Paired T-Test and CI: MF 2601 i varmebehandlet 1844-supernatant**

Paired T for 2601 varmebeh 1844sup - 2601 1844sup

	N	Mean	StDev	SE Mean
2601 varmebeh 1844sup	2	0.1040	0.0269	0.0190
2601 1844sup	2	0.1585	0.0021	0.0015
Difference	2	-0.0545	0.0290	0.0205

95% CI for mean difference: (-0.3150; 0.2060)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -2.66 P-Value = 0.229

### **Varmebehandlet 2601supernatant mot ubehandlet 2601 supernatant**

#### **Paired T-Test and CI: MF 1844 i varmebehandlet 2601-supernatant**

Paired T for 1844 varmebeh 2601sup - 1844sup

	N	Mean	StDev	SE Mean
1844 varmebeh 2601sup	2	0.980	0.373	0.264
1844sup	2	0.720	0.068	0.048
Difference	2	0.260	0.305	0.216

95% CI for mean difference: (-2.479; 2.998)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1.20 P-Value = 0.441

**Paired T-Test and CI: MF 2601 i varmebehandlet 2601-supernatant**

Paired T for 2601 varmebeh 2601sup - 2601sup

	N	Mean	StDev	SE Mean
2601 varmebeh 2601sup	2	0.0915	0.0870	0.0615
2601sup	2	0.0370	0.0141	0.0100
Difference	2	0.0545	0.0728	0.0515

95% CI for mean difference: (-0.5999; 0.7089)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1.06 P-Value = 0.482