



FORORD

Denne oppgaven ble skrevet som en del av en mastergrad i matvitenskap ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet. Oppgaven ble skrevet ved Nofima, avdeling for trygg og holdbar mat.

Jeg har ikke angret et sekund på at jeg valgte å skrive masteroppgave for Nofima. Temaet *biofilm* har vært svært interessant å jobbe med, og har gitt meg mye praktisk og teoretisk erfaring som jeg er sikker på vil komme godt med på veien videre.

En stor takk rettes til mine veiledere ved Nofima, forsker Trond Møretrø og forsker Solveig Langsrud, for fremragende veiledning og engasjement under arbeidet med oppgaven. Takk til Tove Maugesten og de andre damene på laben, for gode råd og hjelp med det praktiske arbeidet.

Jeg vil også rette en takk til masterstudent Pernille Hjemli, som jeg delte kontor med denne våren. Konstant blid og hjelpsom, selv etter mine utallige spørsmål.

Til slutt vil jeg takke min hovedveileder ved NMBU, Hilde Marit Østlie.

Ås, mai 2014

Maria Ingeborg Mikkelsen

SAMMENDRAG

Stafylokokker blir hyppig isolert fra overflater og utstyr i næringsmiddelbedrifter, og deres evne til å danne biofilm kan være viktig for overlevelse i slike miljøer. Det er viktig med mer kunnskap om oppbygging av biofilmer og hvordan disse beskytter bakteriene mot stress.

I denne masteroppgaven var hensikten å undersøke om ulike enzymer og natriumperiodat hadde oppløsende effekt på biofilm dannet av ulike arter/stammer av *Staphylococcus*. I tillegg ble det undersøkt om enkelte av stammene hadde høyere toleranse overfor desinfeksjonsmidler og om det var en korrelasjon mellom toleranse og sammensetning av biofilm-matriks og forekomst av resistens gener.

Biofilm ble dyrket i mikrotiterbrett. Etter inkubering ble biofilmen eksponert for ulike enzymer og natriumperiodat for å undersøke eventuell oppløsende effekt. Utvalgte bakteriestammer ble dyrket som biofilm på stål og i suspensjon og eksponert for desinfeksjonsmidler for å se om det var forskjell i toleranse mellom stammene. For stammer med antatt proteinholdig biofilm matriks ble det testet for tilstedeværelse av *bap*-gen ved PCR.

Resultatene viste at ulike enzymer hadde ulik oppløsende effekt på biofilm produsert av ulike arter/stammer av *Staphylococcus*. Flertallet av stammene fikk en reduksjon i biofilm av dispersin B (>80 %), som indikerer en biofilm-matriks bestående i hovedsak av polysakkarider. En av stammene fikk reduksjon i biofilm av proteinase K/trypsin (>98 %). Dette indikerer en biofilm-matriks basert på ekstracellulære proteiner. DNase og natriumperiodat viste liten nedbrytende effekt. Stammene viste også ulik evne til å danne biofilm, og viste varierende grad av biofilmdannelse på ulike materialer. Ved desinfeksjon av biofilm viste flertallet av stammene svært god toleranse overfor benzalkonium klorid, en type kvartær ammoniumforbindelse, mens én stamme var sensitiv. Forskjellen i sensitivitet mellom stammer kunne ikke alene forklares av forskjeller i biofilmenes sensitivitet overfor enzymer eller tilstedeværelse av gener (*qac*), som koder for membranpumper for kvartære ammoniumforbindelser, inkludert benzalkoniumklorid. *Bap*-genet kunne ikke påvises i noen av stammene etter kjøring av PCR.

Resultatene indikerer at stafylokokker isolert fra næringsmiddelindustrien har ulik grad av biofilmdannelse i tillegg til ulik sammensetning av biofilm-matriks, og at forskjellige mekanismer spiller inn på stafylokokkers toleranse overfor desinfeksjonsmidler.

ABSTRACT

Staphylococci are frequently isolated from surfaces and equipment in food factories and their ability to form biofilms may be important for their survival in such environments. It is important to have knowledge about the structure of biofilms and how they protect bacteria against stress.

The purpose of this thesis was to investigate whether different enzymes and sodium periodate had dissolving effect on biofilms formed by different species/strains of *Staphylococcus*. It was also investigated whether some of the strains had a higher tolerance to disinfectants and whether there was a correlation between tolerance and composition of the biofilm matrix and the presence of resistance genes.

Biofilms were grown in microtiter plates. After incubation the biofilms were exposed to various enzymes and sodium periodate to study possible dissolving effect. Selected strains were grown as biofilm on steel and in suspension and exposed to disinfectants to see if there was a difference in tolerance between them. Strains with a biofilm matrix presumed made up of proteins were also tested for presence of the gene *bap* by PCR.

The results showed that different enzymes had different dissolving effect on biofilms produced by different species/strains of *Staphylococcus*. The majority of the strains showed a decrease in biofilm after exposure to dispersin B (> 80 %), indicating a biofilm matrix mainly consisting of polysaccharides. In one strain proteinase K/trypsin gave a reduction in biofilm (> 98%), which indicates a biofilm matrix built up of extracellular proteins. DNase and sodium periodate showed little dissolving effect. The strains also showed varying ability to form biofilms and also varying degrees of biofilm formation on various materials. After disinfection of biofilm the majority of the strains showed very good tolerance to benzalkonium chloride, a type of quaternary ammonium compounds, while one strain was sensitive. The difference in sensitivity between the strains could not be explained by differences in the biofilms sensitivity to enzymes nor the presence of genes (*qac*), coding for membrane pumps for quaternary ammonium compounds including benzalkonium chloride. The gene *bap* could not be detected in any of the strains after running PCR.

The results indicate that staphylococci isolated from the food industry have varying degree of biofilm formation as well as different composition of the biofilm matrix, and different mechanisms plays a part in the staphylococcal tolerance to disinfectants.

INNHALDSFORTEGNELSE

1 Innledning	1
2 Teori	3
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp	3
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.2 Koagulase-negative stammer av <i>Staphylococcus</i> spp	4
2.2 Biofilm	5
2.2.1 Biofilmdannelse.....	7
2.2.2 Biofilmdannelse hos stafylokokker	9
2.2.3 Biofilmdannelse i næringsmiddelindustrien.....	11
2.2.4 Enzymer til oppløsning av biofilm	11
2.3 Renhold og desinfeksjon i næringsmiddelindustrien.....	12
2.3.1 Vaskemidler.....	13
2.3.2 Desinfeksjonsmidler	14
2.3.3 Kvantære ammoniumkomponent-resistente stafylokokker.....	17
3 Materialer og metoder	18
3.1 Oversikt over forsøksoppsett	18
3.2 Bakteriestammer	19
3.3 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer.....	19
3.4 Dyrking av biofilm i mikrotiterbrett etterfulgt av eksponering for kjemiske stoffer..	20
3.5 Dyrking av biofilm på stål etterfulgt av desinfeksjon.....	22
3.6 Suspensjonstest med BC	26
3.7 Forekomst av <i>bap</i> -gener i stafylokokker	27
3.8 Statistiske analyser.....	29
4 Resultater	30
4.1 Biofilmdannelse i mikrotiterbrett.....	30
4.2 Biofilmdannelse på stål.....	30
4.3 Oppløsning av biofilm i mikrotiterbrett.....	31
4.4 Desinfeksjon av biofilm på stål	33
4.4.1 Desinfeksjon med 200 ppm BC.....	33
4.4.2 Desinfeksjon med 0,1 % Climax	34
4.5 Suspensjonstest med BC	37

4.6 Forekomst av <i>bap</i> -gener i stafylokokker	38
5 Diskusjon	40
5.1 Enzymer	40
5.2 Biofilmdannelse	42
5.3 Toleranse overfor BC.....	43
5.4 Evaluering av metoder	45
5.5 Relevans av resultater for kontroll av biofilmdannelse i næringsmiddelindustrien ...	47
6 Konklusjon	49
7 Forslag til videre arbeid	50
8 Referanser	51
9 Vedleggsliste	58

1 Innledning

Biofilmdannelse i næringsmiddelindustrien er en stor utfordring, da tilgangen på fuktighet og næringsstoffer er stor og bakterier hyppig blir tilført proseshaller gjennom råvarer. Biofilm vil være en potensiell kilde til kontaminering av mat, som både kan føre til forringelse eller overføring av patogene bakterier til produkter (Myszka & Czaczyk 2011). *Staphylococcus* spp. blir hyppig isolert fra næringsmiddelindustrien, og Møretrø et al. (2003) har i en tidligere studie vist at det eksisterer sterke biofilmdannere blant stafylokokker isolert fra næringsmiddelindustrien. Det er grunnlag for å tro at biofilmdannelse blant stafylokokker er av betydning for deres overlevelse i matprosesseringsmiljøer, men i hvilken grad er ikke kjent (Moretro et al. 2003).

Stafylokokker er kjent som de hyppigste årsakene til biofilm-assosierte infeksjoner i mennesker. *Staphylococcus aureus* og *Staphylococcus epidermidis* er de to artene innen bakterieslekten *Staphylococcus* det er gjort mest forskning på, da disse er en vanlig årsak til sykehusinfeksjoner (Otto 2008). *Staphylococcus aureus* er i tillegg en av de hyppigste årsakene til matbåren sykdom, som skyldes et enterotoksin produsert av enkelte stammer (Langsrud 2009). I senere tid har det blitt oppdaget enterotoksinproduksjon hos andre stafylokokk-arter, og de varmeresistente enterotoksinene er av spesielt stor bekymring i næringsmiddelindustrien (Heir et al. 1995).

På grunn av den økende erkjennelsen om biofilmers betydning på menneskers helse, industri og matprosessering, har interessen for utvikling av nye metoder for forebygging og kontroll av biofilm økt (Papa et al. 2013).

Man har lenge trodd at polysakkarid intercellulært adhesin (PIA) er av avgjørende betydning for biofilmdannelse hos stafylokokker. Nyere forskning har derimot vist at sammensetning av biofilm-matriks varierer mellom stammer, og at ekstracellulært DNA, teikoidsyrer og proteiner kan utgjøre en viktig del (Kogan et al. 2006). Dette er blant annet blitt demonstrert ved å utsette en rekke biofilmer for ulike enzymer, hvor resultatene har vist at forskjellige biofilmer lot seg påvirke av enzymer i ulik grad (Chaignon et al. 2007). I en tidligere masteroppgave fant Elisabeth Oust Ledsaak ut at biofilmdannelse hos stammer innen genus *Staphylococcus* fra mat og matindustri ble påvirket av forskjellige enzymer i ulik grad (Ledsaak 2013).

Desinfeksjonsmidler basert på kvartære ammoniumforbindelser (QAC) er mye i bruk på sykehus og i næringsmiddelindustrien. Resistens overfor QAC-baserte desinfeksjonsmidler er utbredt blant kliniske stammer av stafylokokker (Heir et al. 1995), og resistente stammer har også blitt isolert fra ulike matprosesseringsmiljøer og produkter. Resistensen er koblet opp mot en rekke gener i *qac*-familien (Heir et al. 1999a).

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke om ulike enzymer og natriumperiodat hadde oppløsende effekt på allerede dannede biofilmer av ulike arter/stammer av *Staphylococcus* isolert fra næringsmiddelindustrien, for dermed å få en indirekte indikasjon på oppbygging av biofilm-matriks. Det ble også sett på om det var varierende grad av biofilmdannelse mellom stammene. Det ble undersøkt om det var variasjon i toleranse overfor desinfeksjonsmidler mellom ulike stammer, og om biofilm og resistensgener var involvert i dette. Det ble i tillegg undersøkt for tilstedeværelse av genet *bap* som koder for biofilm assosierte protein i utvalgte stammer av *Staphylococcus*.

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

2 Teori

2.1 *Staphylococcus* spp.

Genus *Staphylococcus* tilhører familien *Micrococcaceae*, og er Gram-positive, katalase-positive kokker. Slekten består av minst 40 arter, hvor flertallet er koagulase-negative (Gotz et al. 2006; www.bacterio.net). Stafylokokkene er kjent for å overleve under tørre og varierte forhold, og er blant annet blitt isolert fra jord, sand, vann, kloakk, planteflater og produkter, fôr, kjøtt, kylling og meieriprodukter (Gotz et al. 2006; Moretro et al. 2003). De blir hyppig isolert fra hjemmemiljø, helseinstitusjoner og fra miljøer i tilknytning til mat (Langsrud 2009).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus er en fakultativ anaerob, ubevegelig, Gram-positiv kokk, som både er katalase- og koagulase positiv (Langsrud 2009; Rørvik & Granum 2007). Bakterien er ofte å finne i små mengder på hud og slimhinner hos mennesker og varmblodige dyr. Den er ikke en del av den normale bakteriefloraen på huden - allikevel er dette hovedreservoaret til bakterien (Langsrud 2009). Bakterien blir hyppig isolert ved sårddannelser, og er for eksempel svært vanlig å finne i norsk melk fra ku og geit, noe som kan ha en sammenheng med at den er en hyppig årsak til jurbetennelse (Rørvik & Granum 2007).

S. aureus kan forårsake en rekke sykdommer på mennesker og dyr, som infeksjoner på hud og indre organer, intoksikasjon som toksisk sjokksyndrom og matforgiftning (Langsrud 2009). Matforgiftning skyldes at en del stammer av *S. aureus* kan produsere ett eller flere *S. aureus*-enterotoksin (SE), som forårsaker matforgiftning hos konsumenten (Rørvik & Granum 2007). Symptomer på matforgiftning av *S. aureus* enterotoksiner er kvalme, oppkast, magekramper og diaré som inntreffer 1-8 timer etter inntak av kontaminert mat. Det er estimert at det er nødvendig med 10^5 bakterier/g næringsmiddel for at tilstrekkelige mengder SE skal produseres og utvikle sykdom (Rørvik & Granum 2007). Selv om *S. aureus* er en av de hyppigste årsakene til matforgiftning, er den sjelden omtalt som en viktig matpatogen. Dette kan skyldes den begrensede alvorlighetsgraden på sykdommen (Langsrud 2009; Rørvik & Granum 2007). Smitteveien fra menneske til mat skjer oftest ved håndtering av matvarer. Denne formen for kontaminasjon er den vanligste årsaken til stafylokokkintoksikasjon. Matvarer kan også kontamineres via uhygieniske produksjonsmiljø eller ved at bakterien

overføres via kontaminerte råvarer. En rekke matvarer har vært involvert i utbrudd, som kokt kjøtt, melkeprodukter, kylling, sjømat og innbakt mat. Allikevel er *S. aureus* sjeldent isolert fra overflater og utstyr i næringsmiddelindustrien (Langsrud 2009).

Staphylococcus aureus klarer seg dårlig i konkurranse med andre bakterier, men vil ha et fortrinn i næringsmidler med et høyt innhold av salt og lav vannaktivitet. I tillegg er den relativt resistent mot tørke, og kan klare seg over lengre perioder og vokse godt i produksjonsmiljø. Som det kommer fram av tabell 2.1 trenger enterotoksinproduserende stammer bedre betingelser for SE-produksjon sammenlignet med vekst (Rørvik & Granum 2007).

Tabell 2.1 Forhold som påvirker vekst og enterotoksinproduksjon i *Staphylococcus aureus* (Rørvik & Granum 2007).

Ytre forhold*	Vekst	Enterotoksinproduksjon
Temperatur	7-47 °C (optimum 30-37 °C)	10-46 °C (minimum 3-4 timer ved 15-18 °C for forgiftning)
pH	4,0-9,8 (optimum 6-7)	4,0-9,3 (optimum 7-7,5)
Vannaktivitet (a_w)	0,86	Fra 0,86
Saltinnhold (NaCl)	Opp til 15 % (godt ved 10 %)	Ved over 10 % under ellers optimale forhold

*Minimums og maksimumsverdiene for de ulike parameterne avhenger av optimale betingelser. Verdiene vil normalt være henholdsvis høyere og lavere i næringsmidler.

2.1.2 Koagulase-negative stammer av *Staphylococcus* spp.

Koagulase-negative stafylokokker (CNS) er en gruppe tilpasningsdyktige og opportunistiske patogener hvor deres evne til å overleve og vokse i en rekke miljøer forårsaker et vidt spekter av sykdommer i både mennesker og dyr (Tormo et al. 2005). Patogenesen deres skyldes hovedsakelig deres evne til å danne biofilm på implantert medisinsk utstyr, som gir økt toleranse overfor desinfeksjonsmidler under operasjon og/eller antibiotika (Qin et al. 2012).

Staphylococcus epidermidis er en del av den naturlige mikrofloraen på huden, og er sammen med *S. aureus* den bakterien som oftest blir isolert fra infeksjoner hos mennesker (Izano et al. 2008). På grunn av dens tilstedeværelse på huden, kan den lett bli overført til mat og overflater i kontakt med mat, og blir derfor hyppig isolert fra matprosesseringsmiljøer (Moretro et al. 2003).

Staphylococcus cohnii er sjeldent rapportert som årsak til sykdom, men har blitt beskrevet å forårsake multippel hjernesvulst i Weber-Christians sykdom, å utløse hud- og bløtvevsinfeksjoner, i tillegg til andre systemiske infeksjoner hos mennesker (Garza-Gonzalez et al. 2011).

Staphylococcus lentus er et medlem av *Staphylococcus sciuri* gruppen. *S. sciuri* gruppen er en del av den normale floraen på hud og slimhinner hos dyr, og de blir ofte isolert fra fermenterte kjøttprodukter (Nam et al. 2012). Bakterien har vært assosiert med infeksjoner hos dyr, men den har sjelden blitt rapportert som patogen overfor mennesker (Mazal & Sieger 2010). Medlemmer av *S. sciuri* gruppen er ikke allment ansett for å være sykdomsfremkallende, men det er et stort behov for å bekrefte sikkerheten til denne *Staphylococcus* gruppen i matvarer grunnet hyppig isolering av slike bakterier fra sykehusmiljøer, hvorav mange av artene har potensial for produksjon av enterotoksin (Nam et al. 2012). Enkelte stammer av *S. lentus* isolert fra kyllingslakt og arbeidere i et slakteri har vist seg resistent overfor meticillin (Koller et al. 2011).

Staphylococcus capitis er en del av den naturlige bakteriefloraen hos mennesker og har i enkelte tilfeller blitt rapportert ved infeksjøs endokarditt og protese ventil endokarditt. Per i dag er det lite informasjon om patogenesen til *S. capitis* (Qin et al. 2012).

S. saprophyticus er en patogen stafylokokk som ved hjelp av virulensfaktoren urease gir urinveisinfeksjon hos spedbarn og små barn, hos unge og voksne kvinner, og i eldre voksne eller pasienter med urinkateter (Loes et al. 2014).

2.2 Biofilm

En biofilm kan defineres som et fastsittende fellesskap av mikrober, karakterisert ved celler som irreversibelt er forbundet med en overflate, innkapslet i en matriks av ekstracellulære polymere stoffer (EPS) (Cloete et al. 2009; Srey et al. 2013). En biofilm huser ofte ulike genus/arter på samme tid, og disse mikroorganismene viser en endret fenotype med hensyn på ekspresjon av gener, produksjon av proteiner og vekst (Cloete et al. 2009; Korber et al. 2009). En biofilm kan dannes på nesten enhver overflate, av så å si enhver mikroorganisme (Cloete et al. 2009; Srey et al. 2013). Tilgang på fuktighet og en minimum mengde næringsstoffer er alt som skal til for biofilmdannelse (Peña 2010).

Det er ytterst fordelaktig for bakterier å danne biofilm, fordi den utgjør en svært effektiv overlevelsesstrategi, som gjør bakteriene tilpasningsdyktige og øker deres sjanse for overlevelse. Denne strategien er basert på fire store fordeler: (I) beskyttelse fra negative miljømessige faktorer, (II) forbedret tilgang på næringsstoffer for vekst og utvikling, (III) økt bindingsevne av vannmolekyler, som igjen reduserer muligheten for dehydrering, og (IV) korte avstander til datterceller og andre bakterier, som tilrettelegger for høyere frekvenser av DNA-overføringer mellom bakteriene (Peña 2010).

En biofilm består for det meste av vann (80-90 %) og ekstracellulære polymere substanser (EPS). EPS utgjør hovedbestanddelen i matriks (50-90 % av biofilmens totale innhold av organisk materiale) og er med på å forme strukturen til en biofilm (Cloete et al. 2009; Donlan 2001). Selv om EPS for det meste består av polysakkarider, kan den også inneholde andre molekyler som nukleinsyrer, proteiner, glykoproteiner, lipider og ulike produkter etter lysing av bakterieceller (Peña 2010; Van Houdt & Michiels 2010). Mengde og type polysakkarid i matriks avhenger av bakterieart og påvirkning av miljømessige faktorer (Langsrud 2009).



Figur 2.1 Skanning med elektronmikroskop som viser en modnet biofilm (A), underlaget (B) og en festet celle (C) (Donlan 2001).

Inne i biofilmen finnes det en rekke åpne kanaler som gjør det mulig å frakte vann og essensielle næringsstoffer til voksende celler lenger inne i biofilmen (Donlan 2001; Peña

2010). Strukturen til en biofilm er ikke et homogent monolag av slim men har heterogen utforming. Biofilmen endrer seg også over tid (Donlan 2001; Peña 2010).

Dannelse og utvikling av biofilm er påvirket av en rekke faktorer som; bakteriestamme, overflateegenskaper og miljømessige parametere (pH, næringstilgang og temperatur) (Cloete et al. 2009; Srey et al. 2013). Evnen til å danne biofilm varierer sterkt, ikke bare mellom arter men også innen samme art, og sammensetningen av en biofilm kan variere betydelig mellom ulike stammer av samme art (Srey et al. 2013). Tykkelsen på en biofilm kan variere fra et enkelt cellelag til et tykt lag med celler integrert i EPS (Cloete et al. 2009).

2.2.1 Biofilmdannelse

Biofilmdannelse har blitt grundig studert både i naturlige habitater og i definerte modellsystemer i laboratorier over de siste 20 årene, og mye av dette arbeidet har revolusjonert mikrobiologien (Donlan 2001; McDougald et al. 2012). Biofilmdannelsen avhenger av en interaksjon mellom tre hovedkomponenter; bakteriecellen, festeflaten og omgivende medium (Van Houdt & Michiels 2010). Overgangen fra planktoniske celler til en biofilm-modus for vekst er en innviklet prosess, og forekommer som respons på endringer i omgivelsene. For at denne endringen skal finne sted må visse gener opp- og ned-reguleres. Denne reguleringen og uttrykkelsen av gener skiller bakterier i en biofilm fra sine planktoniske celler (Cloete et al. 2009).

Biofilmdannelsen er en trinnvis og dynamisk prosess som innebærer følgende fem trinn: (i) innledende feste til en overflate, (ii) irreversibelt feste, (iii) tidlig utvikling av biofilmstruktur, (iv) modning, og (v) spredning og rekolonisering (Srey et al. 2013).

(i) Det første trinnet i biofilmdannelsen er ustabil og reversibelt. Feste av en bakterie til en overflate er kontrollert av en rekke variabler, som bakterie-art, miljømessige faktorer, essensielle gen-produkter og sammensetningen av overflaten. Skulle ikke omstendighetene ligge til rette for feste, kan cellen velge å løsrive seg fra overflaten og gå tilbake til sin planktoniske tilværelse (Cloete et al. 2009; Srey et al. 2013). Et endelig feste avhenger av summen av tiltrekkende og frastøtende krefter mellom de to overflatene. Disse kreftene inkluderer elektrostatiske- og hydrofobiske interaksjoner i tillegg til van der Waal's interaksjoner, og virker over lengre avstander (Cloete et al. 2009).

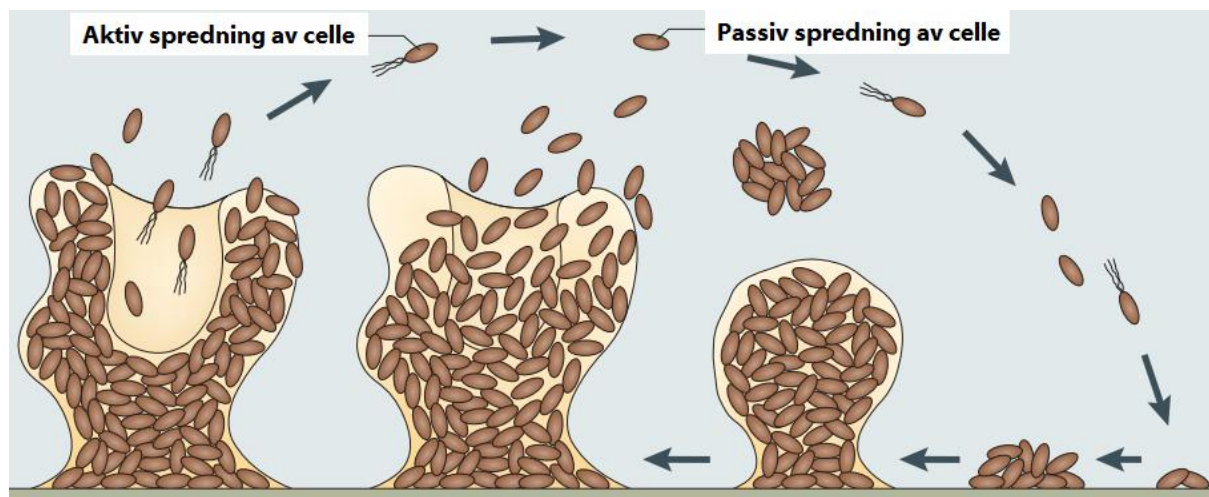
(ii) Hvis forholdene ligger til rette for det vil det i dette trinnet skje en overgang fra et reversibelt til et irreversibelt feste med en endring fra svake interaksjoner mellom bakterie og overflate til permanente bånd (Srey et al. 2013). Krefter som er ansvarlig for denne type binding virker over kortere avstander og er kjent som dipol, ioniske, hydrogen og hydrofobiske interaksjoner. Med en gang bakterien har festet seg irreversibelt til overflaten vil den gjennomgå en rekke genotypiske og fenotypiske endringer for å sikre utvikling og modning av biofilmen. Disse endringene resulterer i produksjon av økte mengder EPS (Cloete et al. 2009).

(iii) I det tredje trinnet fortsetter ytterligere produksjon av EPS, som resulterer i en tredimensjonal struktur (Srey et al. 2013) Bakteriene begynner å dele seg samtidig som de sender ut kjemiske signaler som hjelper cellene å kommunisere innad i biofilmen. Ekstracellulære polysakkarider (EPS) bidrar til å styrke bindingene mellom bakteriene og underlaget, og skjermer koloniene fra ytre miljømessig stress (Srey et al. 2013). Dermed kan bakteriene starte oppformeringen av mikrokolonier. Disse vil senere utvikle seg til makrokolonier adskilt ved hjelp av åpne kanaler og EPS (Cloete et al. 2009).

(iv) Med en gang en bakterie har irreversibelt festet seg til en overflate og begynt produksjonen av EPS, vil modning av biofilmen starte. I dette trinnet vil biofilmen utvikle seg til en organisert struktur som enten kan være flat eller sopp-formet, avhengig av næringstilgangen (Srey et al. 2013). Tilgangen til næringsstoffer i det nærliggende miljøet, strømmen av disse til nærliggende celler i biofilmen og fjerning av avfall er med på å begrense vekstpotensialet til enhver biofilm. I tillegg vil faktorer som pH, tilgang på oksygen, temperatur osv. være med på å kontrollere modningen (Cloete et al. 2009). Strukturell modning av en biofilm krever en periode på minst 10 dager (Srey et al. 2013). Etter en tid vil biofilmen nå en kritisk masse og en dynamisk likevekt nås ved at det ytterste laget på biofilmen begynner å generere planktoniske organismer. Disse cellene er fri og kan forlate biofilmen og kolonisere andre overflater (Cloete et al. 2009).

(v) Løsrivelse og spredning av celler skjer i det femte trinnet, og tillater cellene å gå tilbake til sin planktoniske tilværelse, noe som er helt avgjørende for overlevelse (Cloete et al. 2009; Srey et al. 2013). Spredningen skjer enten ved at datterceller, produsert av en aktivt voksende celle (aktiv spredning), blir kastet ut av biofilmen eller at en celle løsriver seg fra biofilmen (passiv spredning) (se figur xx) (Cloete et al. 2009). Spredningsceller er spesialiserte celler

som kan kolonisere nye overflater og starte dannelsen av nye biofilmer (McDougald et al. 2012). Ytre forstyrrelser som økt væskestrøm og indre prosesser i biofilmen, som endogene enzymatiske degraderinger eller frigjøring av EPS er alle blitt vurdert som mulige årsaker til oppløsning av biofilm. Sult kan også være en årsak og lar bakteriene søke etter nye næringsrike overflater (Srey et al. 2013).



Figur 1.2 En biofilms syklus fra planktoniske celler til en etablert biofilm. Biofilmen har aktiv og passiv spredning av celler til det ytre miljøet (McDougald et al. 2012).

Dannelse av biofilm har betydelige konsekvenser i felt som spenner fra industrielle prosesser som oljeboring, papirproduksjon og matprosessering, til helse relaterte felt innen medisin og tannbehandling (Van Houdt & Michiels 2010). Biofilm er årsak til en rekke infeksjoner i mennesker (Srey et al. 2013).

2.2.2 Biofilmdannelse hos stafylokokker

Staphylococcus epidermidis og *S. aureus* er de hyppigste årsakene til sykehusinfeksjoner og biofilm er en viktig årsak til dette (Otto 2008). Sammenlignet med disse to er biofilm-assosierte infeksjoner med andre *Staphylococcus*-stammer langt mindre vanlig (Chaignon et al. 2007). Ofte er biofilm-assosierte infeksjoner med *S. aureus* vanskelig å behandle med antibiotika (Otto 2008). Flere studier har vist at *S. aureus* er i stand til å vokse i form av biofilm på en rekke abiotiske materialer, som glass, rustfritt stål, polystyren, polypropylen og polyvinyl klorid. Derfor er det ventet at det vil dannes biofilm på materialer og overflater i næringsmiddelindustrien. *Staphylococcus* spp. isolerte fra matprosesseringsoverflater, som vanligvis ikke vokser særlig godt ved lave temperaturer, har reist spørsmålet om denne

bakterieslekten er en bedre biofilmdanner enn mange andre bakterier assosiert med mat, eller om funnet skyldes deres resistens overfor tørre omgivelser (Langsrud 2009).

To komponenter på overflaten til stafylokokker har blitt identifisert som viktige bidragsyttere til biofilmdannelsen; polysakkarid intracellulær adhesin (PIA) og biofilm assosiert protein (Bap) (Piessens et al. 2012). PIA er den mest studerte mekanismen for biofilmproduksjon i stafylokokker (O'Gara 2007), og er et matriksmolekyl bestående for det meste av den lineære (1→6)-β-linked N-acetyl-D-glukoseamin polymeren (PNAG) (Cucarella et al. 2001; Piessens et al. 2012). *icaADBC* lokuset består av genene ansvarlig for biosyntesen av molekylet (Chaignon et al. 2007; Kogan et al. 2006). Ved aktivering av operonet vil PIA bli syntetisert. PIA har vist seg å bidra i kontakten mellom celler i tillegg til å trigge produksjonen av tykke flerlags biofilmer (Ziebuhr et al. 1999). En transkripsjonsrepressor, *icaR*, er plassert oppstrøms for *icaADBC* operonet, og ekspresjonen av *ica* er strengt regulert av miljømessige forhold og varierer sterkt mellom stammer (Cramton et al. 1999). Genet har vist seg vidt fordelt blant koagulase-negative stafylokokker fra sykehusinfeksjoner og i matprosesseringsmiljøer (Moretro et al. 2003; Piessens et al. 2012). Betydningen av *ica* for biofilmdannelse på overflater i matindustrien kan derfor ikke utelukkes, og mer forskning er nødvendig på dette feltet.

Det biofilm assosierte proteinet Bap er et overflateprotein som først ble identifisert i sterke biofilmdannere av *Staphylococcus aureus*-stammer isolert fra storfe med kronisk jurbetennelse, og er sterkt knyttet til vedvarende infeksjon (Piessens et al. 2012). Proteinets bygget opp av 2.276 aminosyrer, og dens kjerneregion utgjør 52 % av proteinet og består av 13 påfølgende nesten identiske repetisjoner, som hver utgjør 86 aminosyrer (Cucarella et al. 2001). Bap viser strukturelle likheter med cellevegg-forankrede proteiner i Gram-positive bakterier, og forsøk har vist at Bap ikke bare er involvert i det primære festettrinnet, men også er involvert med polysakkaridet PIA, i celle-til-celle-aggregering og derved biofilm modning (Latasa et al. 2006). Bap-positive stammer har vist seg å ha en større evne til å kolonisere melkekjertlene hos storfe. Cucarella et al. (2001) viste at *bap* var representert i noen *S. aureus* isolert fra mastitt hos ku (5 %), men genet ble ikke amplifisert i *S. aureus*-stammer isolert fra mennesker. I samme rapporten konkluderte de med at stammer som hadde overproduksjon av Bap gav økt produksjon av polysakkarid, mens hos stammer hvor *bap*-genet var forstyrret førte det til redusert nivå av PIA (Cucarella et al. 2001).

2.2.3 Biofilmdannelse i næringsmiddelindustrien

Biofilmdannelse i næringsmiddelindustrien blir sett på som en alvorlig trussel overfor mattryggheten, og er en viktig prioritet i dagens globaliserte marked med en verdensomspennende transport av mat og konsumering av både rå, fersk og minimalisert prosessert mat (Van Houdt & Michiels 2010). Matvarer og overflater i kontakt med mat har ofte relative høye næringskonsentrasjoner, og sammen med egnede miljømessige forhold, vil dette være den ideelle plassen for biofilmdannelse. Utilstrekkelig rengjøring og desinfisering av overflater i kontakt med mat, fører til akkumulering av en rekke organiske og uorganiske komponenter. Dette resulterer i forhøyede konsentrasjoner av næringsstoffer på relativt "rene" overflater (Korber et al. 2009).

Den største utfordringen i næringsmiddelindustrien er representert ved overlevelsen av matbårne patogene- og forringelsesbakterier (Peña 2010). Biofilm dannet i matprosesseringsmiljøer er av spesiell betydning ettersom den har potensialet til å fungere som en vedvarende kilde til mikrobiell kontaminering, som igjen kan føre til matsvinn eller overføring av sykdommer (Van Houdt & Michiels 2010). Biofilm er også ofte ansvarlig for mekanisk blokkering i varmevekslere og økt korrosjon av overflater (Peña 2010). Sammen med svinn og forringelse av produkter vil dette føre til enorme årlige økonomiske tap for næringsmiddelbedrifter (Van Houdt & Michiels 2010).

I prinsippet er hvilken som helst overflate sårbar for biofilmdannelse. Dette inkluderer blant annet overflater av plast, glass, metal, tre og mat, og et potensielt mikrobielt feste vil avhenge av en rekke fysiske og kjemiske egenskaper ved overflaten som tekstur, overflateladning, hydrofobisitet, pH, temperatur, næringssammensetning i løsningen, rengjørings- og desinfeksjonsmuligheter, fuktighet, sårbarhet overfor korrosjon osv. (Srey et al. 2013; Van Houdt & Michiels 2010). Disse faktorene vil til sammen avgjøre den hygieniske statusen på materialet, og valg av type materiale vil derfor ha stor betydning i utforming av matrelaterte kontaktflater (Van Houdt & Michiels 2010).

2.2.4 Enzymer til oppløsning av biofilm

I et av forsøkene i denne oppgaven ble enzymene dispersin B, DNase, proteinase B, trypsin og periodat (NaIO_4) testet for deres evne til å bryte ned biofilm dannet av ulike arter av

Staphylococcus. Den enzymatiske oppløsningen av biofilm ser ut til å henge nøye sammen med dens kjemiske oppbygging av biofilm-matriks (Chaignon et al. 2007).

Dispersin B har vist seg svært effektiv overfor biofilm med et høyt innhold av PIA, og lite effektiv overfor biofilm av stammer som ikke produserer dette polysakkaridet (Chaignon et al. 2007). Dette kan henge samme med observasjonene til Itoh et al. (2005), som fant ut at dispersin B endolytisk hydrolyserer de glykosidiske bindingene i poly- β -(1,6)-GlcNac (Itoh et al. 2005). Dette understreker teorien om at en biofilm uten PIA, skal være resistent overfor PIA-nedbrytende stoffer (Kogan et al. 2006). Biofilm av stammer som produserer betydelige mengder av PIA ble derimot nedbrutt av dispersin B, mens proteinase K ikke viste noen effekt (Chaignon et al. 2007).

Ekstracellulært DNA (eDNA) har vist seg å utgjøre en strukturell komponent i biofilm-matriksen hos *S. aureus* og *S. epidermidis* (Izano et al. 2008). Izano et al. (2008) fant blant annet ut at enzymet DNase I i større eller mindre grad hadde evne til å bryte ned biofilmen til enkelte stammer av *S. aureus* og *S. epidermidis* (Izano et al. 2008).

Proteinase K og trypsin er protolytiske enzymer med ulike substrat-spesifisitet: proteinase K bryter endolytisk peptid-bindingene av alifatiske, aromatiske eller hydrofobiske aminosyrer, mens trypsin er spesifikk og bryter peptidbindingen på lysin og arginin (Chaignon et al. 2007). Kogan et al. (2006) konkluderte med at biofilm nedbrutt av proteinase K, men ikke av dispersin B/ NaIO_4 indikerer at makromolekylene som stabiliserer biofilmen ikke er PIA, men heller proteinbaserte komponenter (Kogan et al. 2006).

Periodat (NaIO_4) har blant annet vist oppløsende effekt på biofilm produsert av PIA-produserende *S. epidermidis* 1457 (Rohde et al. 2005). Periodat endrer den polymeriske kjeden til PIA ved å oksidere karboner som bærer tilstøtende hydroxylgrupper og bryter C3-C4 bindingen i GlcNAc-enheten (residue) (Chaignon et al. 2007).

2.3 Renhold og desinfeksjon i næringsmiddelindustrien

Mikrobielt feste til overflater i næringsmiddelindustrien er en svært hurtig prosess, og det vil i de fleste tilfeller ikke være mulig å vaske og desinfisere hyppig nok for å unngå at bakterier fester seg. Likevel er det viktig å nøye fastsette en tilstrekkelig hyppighet på renhold og desinfeksjon for å unngå modning av biofilmen og opphopning av absorbert organisk

materiale (Van Houdt & Michiels 2010). For å redusere næringstilgangen til mikroben og hindre vekst er det helt avgjørende med hyppig vask, og samtidig å holde overflater så tørre som mulig (Sundheim & Dyrnes 1999).

Valg av overflatemateriale i næringsmiddelindustrien er viktig med tanke på renhold og desinfeksjon. I et av hovedforsøkene blir biofilm dyrket på stålkuponger av typen AISI 304. Dette er en type austenittisk rustfritt stål, og er sammen med 316 muligens de mest benyttende kontaktflatene i matindustrien. Dette skyldes stålets kjemiske, fysiske og mekaniske stabilitet ved ulike matprosesserings temperaturer, rengjøring og høye resistens overfor korrosjon (Cabeça et al. 2012; Van Houdt & Michiels 2010). Type 304 er en blanding av jern, 18 % krom og 8 % nikkel, inneholder maksimum 0,08 % karbon og er ikke magnetisk. Denne typen blir benyttet i kjemisk prosesseringsutstyr i mat-, meieri- og drikkevare-industri, i varmevekslere og ved bruk av svake kjemikalier (Stainless Processing).

Bakterier tilknyttet en biofilm står mye sterkere i kampen mot desinfeksjonsmidler og andre antimikrobielle stoffer, sammenlignet med deres respektive planktoniske celler (McDougald et al. 2012; Peña 2010). Dette skyldes at matriksen fungerer som en ytre barriere som forhindrer eller minsker kontakten med det antimikrobielle stoffet (Srey et al. 2013). Ved utilstrekkelig desinfeksjon vil kun det ytterste laget med bakterier i biofilmen dø, mens de underliggende lagene fortsatt ligger godt beskyttet inne i matriks (Korber et al. 2009).

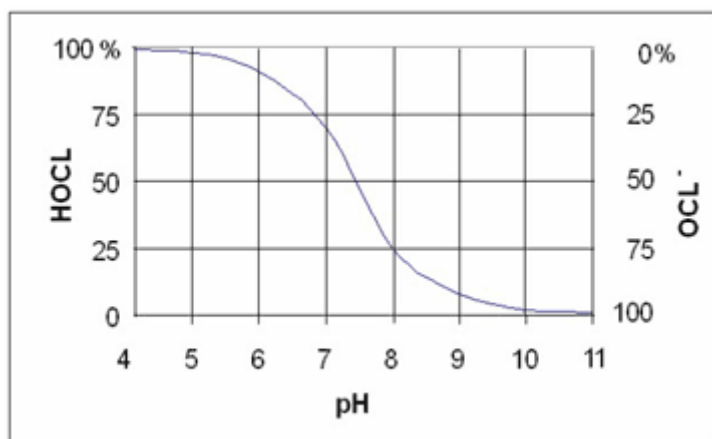
2.3.1 Vaskemidler

Det primære målet ved rengjøring er å fjerne produktrester. Indirekte er fjerning av disse stoffene også det første kritiske punktet i fjerning, dreping og kontroll av biofilm, og dette blir betydelig lettere å oppnå ved anvendelse av mekanisk kraft (vasking og skrubbing). Ved tilstedeværelse av matrester og smuss vil ikke desinfeksjonsmidler fungere like effektivt (Van Houdt & Michiels 2010).

Vaskemidler i industrien deles inn etter surhetsgrad i alkaliske og sure rengjøringsmidler. De alkaliske midlene brukes til å fjerne organisk smuss, og sterkt alkaliske midler er godt egna til å løse opp fett og protein som er brent fast. Sure rengjøringsmidler har liten vaskevirkning på fett og protein, men løser opp gjenværende mineralbelegg (Sundheim & Dyrnes 1999). I denne oppgaven ble klorin og enzymer benyttet som rengjøringsmidler.

Klorforbindelser

I et av forsøkene ble klorin benyttet som kontroll på rengjøringsmiddel. Klorforbindelser er oksidasjonsmidler og ødelegger den cellulære aktiviteten til proteiner (McDonnell & Russell 1999). Det er først og fremst hypokloritt, dernest kloramin og klordioksyd som benyttes i næringsmiddelindustrien. Hypokloritt (HOCl) dissosierer som vist i figur 2.3. Det er molekylet i udissoisert form som har best effekt overfor bakterier. Dette betyr at virkningsgraden vil endres med endrende pH. Ved pH-verdier over 10 vil igjen effekten av hypokloritt forbedres. Dette skyldes en kombinasjon av ugunstige pH-verdier for overlevelse av bakterier og OCl^- . Dårligst effekt har hypokloritt ved pH-verdier mellom 8 og 9. Resistensutvikling overfor hypokloritt er ikke kjent, men den inaktiveres derimot lett av organisk materiale, spesielt av proteiner (Granum 2008).



Figur 2.3 pHs innvirkning på dissosiasjon av hypokloritt (HACH).

Enzymer

Enzymer har lenge vært brukt i vaskepulver til oppløsning av proteinflekker på tøy. Næringsmiddelindustrien har i noen grad tatt i bruk enzymer som vaskemidler, og bruken av f.eks. proteinspaltende, fettspaltende og stivelsesspaltende enzymer vil sannsynligvis øke i fremtiden (Sundheim & Dyrnes 1999).

2.3.2 Desinfeksjonsmidler

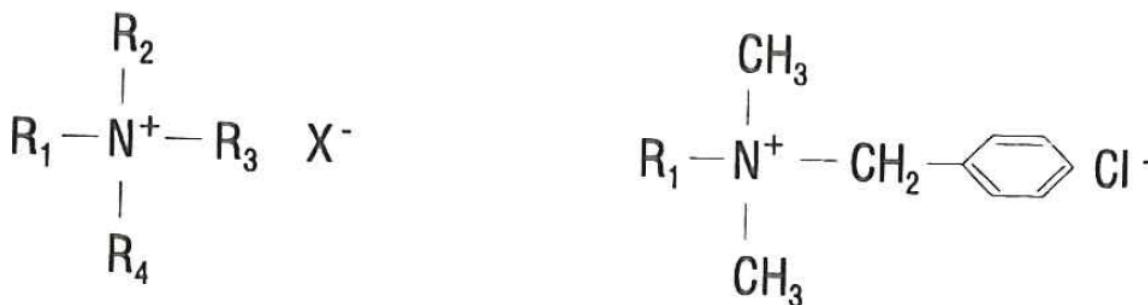
Desinfeksjonsmidler er forbindelser som kan drepe bakterier på grunn av sin kjemiske sammensetning (Granum 2008). Dette gjelder vanligvis ikke bakteriesporer, og desinfeksjonsmiddelet trenger nødvendigvis ikke drepe alle mikroorganismene, kun redusere antallet til et nivå som verken kan skade helsen eller kvaliteten på matvarer med begrenset holdbarhet (Sundheim & Dyrnes 1999). Hvilket desinfeksjonsmiddel som er mest effektivt i

en gitt situasjon avhenger av en rekke faktorer som inkluderer sammensetningen av kontaktflaten, temperatur, eksponeringstid, konsentrasjon, pH, temperatur, forstyrrende organisk materiale som matrester og skitt, og bakteriell resistens. Det har vist seg at eldre biofilmer er mer resistente overfor ulike desinfeksjonsmidler sammenlignet med yngre biofilmer (Van Houdt & Michiels 2010).

De ni vanligste desinfeksjonsmidlene som anvendes i dag er; fenolforbindelser, aldehyder, klorforbindelser, jodprodukter, alkoholer, klorhexidin, kvartære ammoniumforbindelser, amfotære forbindelser og peroksyder. I næringsmiddelindustrien benyttes i størst grad kvartære ammoniumforbindelser og klorforbindelser. Amfotære forbindelser, jodprodukter og peroksyder vil man også i noen grad finne anvendt i næringsmiddelindustrien (Granum 2008). I denne oppgaven vil kvartære ammoniumforbindelser og peroksyder bli omtalt, da disse blir benyttet i forsøk i oppgaven.

Kvartære ammoniumforbindelser

Kvartære ammoniumforbindelser (QAC) hører inn under gruppen kationiske tensider og har en generell formell som vist i figur 2.4. Stoffets antimikrobielle effekt er bestemt av den kjemiske sammensetninga av alkyl eller av de radikale heterosykliske gruppene R1-R4. Disse er overflateaktive kationiske grupper med egenskaper som blant annet kan redusere overflatespenningen i grensesnittet ved absorpsjon. Dette gjør kvartære ammoniumforbindelser høyeffektive både i løsning og på overflater (Heir 1998; McDonnell & Russell 1999). For å oppnå en potensiell antimikrobiell aktivitet, må minst en av sidekjedene inneholde en kjede med 8-18 karbonatomer. Spesielt viktig er lengden til alkylkjeden. For benzalkoniumklorid har en alkylkjede på mellom C12 og C16 vist seg å ha den største bakteriecidale aktiviteten (Granum 2008; Heir 1998). De resterende tre sidegruppene kan variere i stor grad uten at dette vil ha noen stor innvirkning på den mikrobielle effekten.



Figur 2.2 Den generelle strukturen til kvartære ammoniumforbindelser (venstre). R₁-R₄ representerer alkylgrupper hvor minst en av gruppene må inneholde en kjede på 8-18 karbonatomer for å oppnå en potensiell mikrobiell aktivitet. X⁻ representerer ethvert anion men er vanligvis klorid eller bromid. Til høyere vises strukturen til den kvartære ammoniumforbindelsen banzalkonium klorid (Heir 1998).

Organiske forbindelser har liten inaktiverende effekt på kvartære ammoniumforbindelser, og på grunn av forbindelsens evne til å redusere overflatespenninger, har stoffet også en oppløsende effekt på biofilm (Granum 2008). En blanding av QAC med ulike n-akyl kjeder er kjent for å ha en bredspektret aktivitet under normale forhold (Heir 1998). De kvartære ammoniumforbindelsene vil absorberes og trenge inn i celleveggen på bakterier. Reaksjoner med den cytoplasmatiske membranen (lipider eller proteiner) etterfulgt av uorden i membranen, vil føre til at intracellulært materiale med lav molekylvekt vil lekke ut av cellen, og det vil oppstå en degradering av proteiner, nukleinsyrer og celleveggen forårsaket av autolytiske enzymer. I tillegg vil det være et tap av strukturell organisering og integritet av den cytoplasmatiske membranen i bakterien i tillegg til andre ødeleggende effekter på bakteriecellen (McDonnell & Russell 1999).

Peroksyder

Pereddiksyre er det peroksydet som er mest utbredt til bruk i næringsmiddelindustrien. Ved høy temperatur (60-80 °C) har stoffet en høy desinfiserende effekt og dreper alle typer mikroorganismer og til dels sporer. Aktiviteten avtar sterkt med fallende temperatur.

Peroksidene inaktiveres lett av organisk materiale (Granum 2008).

I denne oppgaven blir peroksydet Climax SU388 (Lilleborg Profesjonell) benyttet. Dette er et flytende surt desinfeksjonsmiddel, som benyttes til kalddesinfeksjon av rør og tanker i næringsmiddelindustrien. Middelet inneholder blant annet pereddiksyre (~5 %), eddiksyre (10-25 %) og hydrogenperoksid (20-30 %) (Innholdsfortegnelse på dunk).

2.3.3 Kvartære ammoniumkomponent-resistente stafylokokker

Stafylokokker viser i stor grad iboende resistens overfor antiseptiske midler og desinfeksjonsmidler, som er en naturlig del av bakteriens resistens og er derfor ikke blitt til via mutasjoner eller overføring av resistente plasmider (McDonnell & Russell 1999).

Stafylokokker resistente mot kvartære ammoniumforbindelser (QAC) ble først isolert fra kliniske *Staphylococcus aureus* stammer, hvor tre QAC-resistente gener ble karakterisert; *qacA*, *qacB* og *smr* (*qacC*) (Heir et al. 1998). I senere tid har også QAC-resistente *Staphylococcus* spp. som bærer *qacA/qacB* og *smr* blitt isolert fra ulike matproduksjonsmiljøer og produkter (Heir et al. 1995; Sundheim et al. 1992).

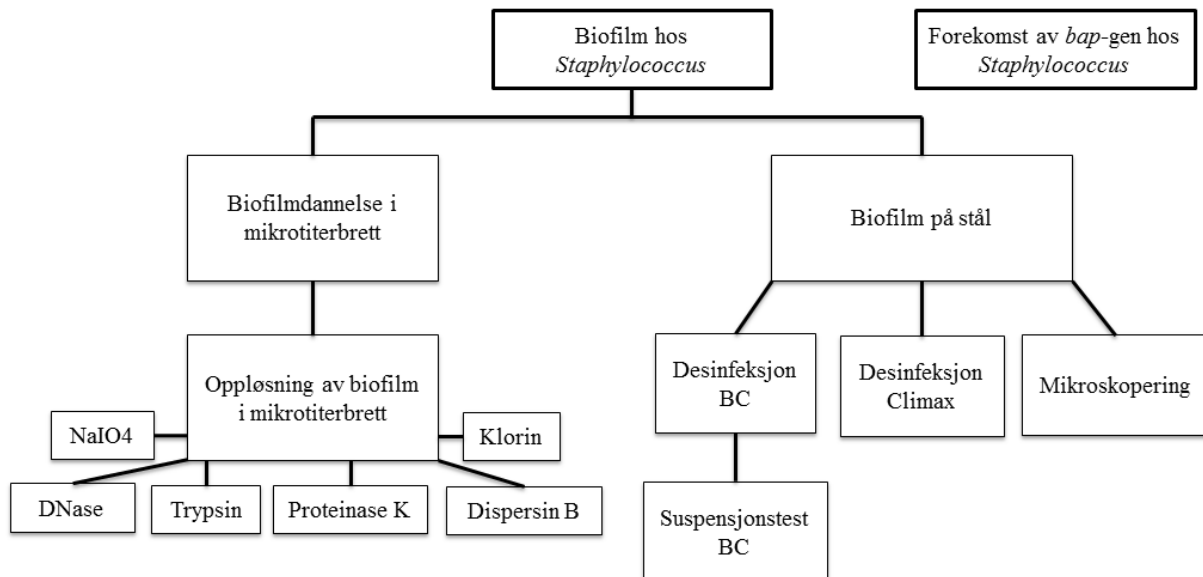
Desinfeksjonsmidler basert på kvartære ammonium-forbindelser (QAC) er i utstrakt bruk både i kliniske miljøer og i næringsmiddelindustrien. Dette skaper et selektivt miljø for vekst og overlevelse av resistente mikroorganismer (Heir et al. 1998). Selv om *qac*-gener er oppkalt etter en av deres viktigste substrater (dvs. kvartære ammoniumforbindelser), koder genene også for resistens mot et bredt spekter av andre kationiske forbindelser som blant annet interkalerende fargestoffer og biguanider. De ulike QAC proteinene er involvert i relativt lave spesifikke efflux-baserte multidrug pumper og tilhører en familie av små multiresistens proteiner. Selv om den praktiske betydningen av QAC-mediert resistens hovedsakelig ligger i motstand mot antiseptiske midler, er motstridende funn i denne saken fortsatt rapportert (Jaglic & Cervinkova 2012).

I næringsmiddelindustrien er stafylokokker av stor bekymring på grunn av deres evne til å produsere enterotoksiner. I mange år har denne karakteristikken kun vært assosiert med koagulase-positive *S. aureus*. I senere tid har det derimot blitt vist at også koagulase-negative stafylokokker har denne egenskapen. Tilstedeværelse av stafylokokker resistente mot desinfeksjonsmidler er en bekymring med tanke på at resistente gener kan spres til andre *Staphylococcus*-stammer. Dette vil føre til overlevelse, vekst og spredning av enterotoksiske stafylokokker og/eller stafylokokker av klinisk betydning (Heir et al. 1999a).

3 Materialer og metoder

3.1 Oversikt over forsøksoppsett

Figur 3.1 viser et flytskjema av forsøksoppsettet for denne oppgaven. Først ble biofilm dyrket i mikrotiterbrett og på stålkuponger. Biofilmen i mikrotiterbrettet ble eksponert for ulike enzymer, natriumperiodat og klorin. Biofilmen på stål ble eksponert for to ulike desinfeksjonsmidler, BC og Climax. Stålkuponger med biofilm før og etter eksponering for desinfeksjonsmidler ble mikroskopert ved første gjentak. I tillegg ble det kjørt en suspensjonstest med BC. Til slutt ble det undersøkt for forekomst av et gen – *bap* i et utvalg *Staphylococcus*-stammer, som er et gen som koder for proteiner assosiert med biofilm, ved hjelp av PCR.



Figur 3.1 Flytskjema for forsøk i oppgaven. Følgende forsøk utgjør grunnlaget for denne oppgaven.

3.2 Bakteriestammer

Bakteriestammene benyttet i dette forsøket var ulike arter av *Staphylococcus* - både kjente laboriestammer og stammer isolert fra norsk matindustri. Stammene ble valgt på grunnlag av evne til biofilmdannelse i et tidligere forsøk (Ledsaak 2013). Oversikt over de ulike stammene som ble benyttet og hvor de ble isolert fra er gitt i tabell 3.1

Tabell 3.1 Oversikt over stammer av *Staphylococcus* benyttet i oppgaven. Hvilke bakteriearter/stammer som ble benyttet i hvert forsøk er angitt under hvert forsøk.

Nofima stammenummer (MF)	Art	qac-gen ^a	ica-gen ^b	Opphav
1789	<i>S. epidermidis</i>	-	+	Fjærkre foredlingsanlegg
1844	<i>S. cohnii</i>	-	-	Fjærkre foredlingsanlegg
1862	<i>S. lentus</i>	-	-	Fjærkre foredlingsanlegg
1871	<i>S. capitis</i>	<i>qacA</i>	+	Baguett
1872	<i>S. capitis</i>	<i>qacA</i>	+	Fjærkre foredlingsanlegg
1890	<i>S. aureus</i>	-	+	RN4220
1904	<i>S. saprophyticus</i>	<i>qacC</i>	I.T. ^c	Rødt kjøtt, anlegg
2051	<i>S. aureus</i>	-	+	RN4220/ pSK265 ^d
2052	<i>S. aureus</i>	<i>qacC</i>	+	RN4220/ pSK265- <i>qacC</i> ^e
2601	<i>S. epidermidis</i>	I.T.	+	ATCC35894
3675	<i>S. aureus</i>	I.T.	+	Rømme, utbrudd
3714	<i>S. aureus</i>	I.T.	+	Pizza, utbrudd

^a Forekomst av ulike typer *qac*-gen. *qac*-negative stammer er merket (-).

^b Forekomst av *ica*-gen. *ica*-negative stammer er merket (-).

^c I.T.; ikke testet.

^d RN4220 med plasmid pSK265.

^e RN4220 med plasmid pSK265 med innsatt *qacC*-gen.

3.3 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer

Stammene som ble benyttet i dette forsøket ble oppbevart ved – 20 °C i Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, England) tilsatt 20 % glycerol. Før forsøkene ble stammer benyttet i gjeldene forsøk strøket ut på Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid Ltd.,) og inkubert i 24 timer ved 30 °C. TSA-skåler (petriskåler; VWR International. Runde, 90x16,2 mm PS mit, West Chester, US.) med oppdyrkede kolonier ble oppbevart ved 4 °C i opptil en måned. Omtrent én gang i måneden ble det plukket 2-3 kolonier fra hver TSA-skål, som deretter ble strøket ut på en ny TSA-skål. Overnattkulturer ble laget ved å plukke 2-3 enkeltkolonier fra TSA-skåler, for deretter å inokulere dem i rør med TSB som ble inkubert ved risting (120

rpm, Vari-shaker, Dynatec, Askim) i ca. 24 timer ved 30 °C. For tillaging av medier se vedlegg 1.

3.4 Dyrking av biofilm i mikrotiterbrett etterfulgt av eksponering for kjemiske stoffer

I følgende forsøk (forsøk 1) ble biofilm av ni stammer av *Staphylococcus* dyrket i mikrotiterbrett for deretter å bli eksponert for ulike kjemiske stoffer, se tabell 3.2. Enzymer benyttet i dette forsøket var dispersin B (Kane Biotec Inc. USA), proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), trypsin (Sigma-Aldrich) og DNase (Sigma-Aldrich) i tillegg til natriumperiodat (NaIO₄, Sigma-Aldrich) og klorin (Lilleborg AS, Nydalen, Norge). Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich) ble benyttet som et mål på total biofilmdannelse av hver stamme. For tillaging av løsningene se vedlegg 2.

Tabell 3.2 Bruksskonsentrasjoner av enzymløsninger, natriumperiodat og klorin ved nedbrytning av biofilm. Bruksskonsentrasjonen benyttet for hver løsning var den samme for alle de ni stammene.

	Dispersin B (µg/ml)	Proteinase K (µg/ml)	Trypsin (µg/ml)	DNase (µg/ml)	NaIO₄ (mM)	Klorin (%)
MF1789	50	100	100	100	40	0,03
MF1844						
MF1871						
MF1872						
MF1890						
MF1904						
MF2601						
MF3675						
MF3714						

Innledningsvis ble to-tre kolonier av hver stamme fra TSA, inokulert i 3 ml TSB over natt på risting, ved 30 °C. Dagen etter ble hver stamme fortynnet 100 ganger i TSBNG (TSB + NaCl + D-glukose monohydrat, begge fra Merck, Darmstadt, Tyskland) ved å blande 30 µl overnattekultur i 3 ml TSBNG. For tillaging av TSBNG se vedlegg 1.

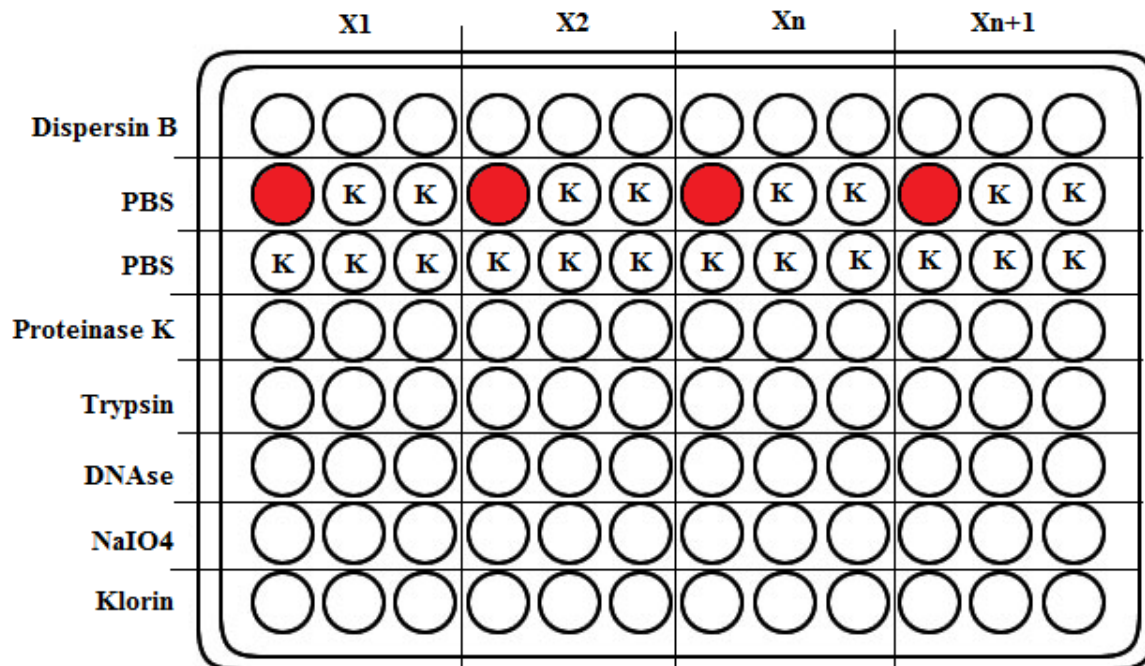
162 µl TSBNG ble tilsatt i hver brønn i et polystyren mikrotiterbrett, 96 brønner (FALCON®. Microtest™ 96 brønns. Becton Dickinson Labware. New Jersey,US). I fire av brønnene (per brett) ble det tilsatt ytterligere 18 µl TSBNG, totalt 180 µl. For hver stamme ble det deretter tilsatt 18 µl fortynnet cellesuspensjon til 23 brønner. Dette gav plass til fire stammer per brett.

Brettene ble satt til inkubasjon ved 30 °C. Etter 48 timer ble det målt OD_{600-nm} (SPECTROstar^{Nano} BMG Labtech) som mål på total vekst. Ved hjelp av en platevasker (Wellwash AC, Thermo Electron Corporation, USA) ble kulturen sugd ut, før brettet ble vasket i to vasketrinn med dH₂O.

For hver stamme ble det tilsatt 200 µl enzym/NaIO₄/klorin til 3 parallelle brønner. For kontroll (PBS) ble det tilsatt 200 µl til 5 parallelle brønner (se figur 3.2).

Biofilmene ble eksponert for virkestoffene i 2 timer ved 30 °C på vippebrett. Suspensjonen ble helt av og brettet vasket med dH₂O i en platevasker i to vasketrinn. 200 µl 0,1 % krystallviolett (0,5 g i 500 ml dH₂O, Merck, Darmstadt, Tyskland) ble så tilsatt i hver brønn, og brettene ble farget i 4 minutter. For å fjerne krystallviolett og få bort overflødig farge ble vaskeprogrammet innstilt på tre vasketrinn. Et bilde ble tatt ovenfra og ned som et bilde på gjenværende biofilm.

200 µl surgjort etanol (2 ml 37 % HCl i 1000 ml etanol, etanol: Kemytol, Norge, HCl: Merck) ble tilsatt i hver brønn for å løse ut fargestoff. Virketiden var 2 minutter på ristemaskin for å forsikre at all farge ble løst ut. 100 µl av utvasket farge ble deretter overført til et nytt mikrotiterbrett og OD_{600nm} ble målt som mål på gjenværende biofilm. Forsøket ble utført i to uavhengige gjentak.



Figur 3.2 Oppsett for behandling av biofilm. X indikerer en av de ni stammene testet. For hvert virkestoff ble det kjørt tre paralleller for hver stamme (vertikale linjer). På de horisontale radene ble det kjørt et virkestoff for hver rad. Rød brønn indikerer brønn med kun tilsatt buljong (TSBNG) – dvs. uten tilsatt bakteriesuspensjon. I brønnene merket med K (kontroll) ble det tilsatt PBS og den aktuelle stammen.

3.5 Dyrking av biofilm på stål etterfulgt av desinfeksjon

I dette forsøket (forsøk 2) ble det gått videre med følgende stammer fra forsøk 1; MF1844, MF1871 og MF1872 som alle viste god biofilmproduksjon. I tillegg ble stammene MF1862, MF2051 og MF2052 testet. MF2051 og MF2052 er to varianter av MF1890 med innsatt plasmid, sistnevnte med *qacC* gen. Hensikten med forsøket var å få de ulike bakteriene til å danne biofilm på stålkuponger og deretter utsette de for desinfeksjonsmidler av pereddiksyre og benzalkoniumklorid. Ikke alle bakteriene ble eksponert for begge desinfeksjonsmidlene. En oversikt over hvilke bakterier som ble utsatt for hvilke desinfeksjonsmiddel er gitt i tabell 3.3. Som pereddiksyre ble Climax SU388 (heretter Climax, Lilleborg Profesjonell, Nydalen, Norge) benyttet, og som benzalkoniumklorid ble BC P3-topax M95 (heretter BC, Ecolab, Norge) benyttet.

Dyrking av biofilm

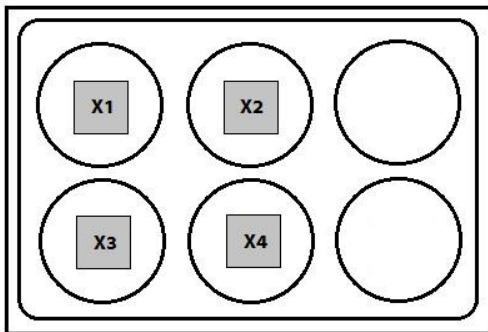
Kolonier av stammene ble plukket fra respektive skåler og inokulert i 3 ml TSB. Mediet med bakteriestammene ble dyrket på ristemaskin ved 30 °C over natt.

Dagen etter ble hver av stammene fortynnet 100 ganger i TSBNG. I et seksbrønns mikrotiterbrett (FALCON®. Multiwell™ 6 brønns) ble det i fire av brønnene lagt en sterilisert stålkupong (2 cm x 2 cm, AISI, 304 2B), og tilsatt 5 ml av den fortynnede bakteriesuspensjonen i hver brønn.

Ved første gjentak ble det tilsatt fortynnet bakteriesuspensjon i seks brønner med en stålkupong i bunnen av hver brønn. For at bakeriene skulle feste seg til stålkupongen, ble brettene inkubert i 3 timer ved 30 °C. To av kupongene, for hver av de to stammene, ble mikroskopert etter inkubering.

Etter inkubasjonen ble suspensjonen pipettert av og kupongene vasket med sterilt destillert vann. Vannet ble pipettert av og kupongene plassert i et nytt Brett. 3 ml TSBNG ble tilsatt i hver brønn og satt til inkubasjon ved 30 °C i 48 timer for å danne biofilm (se figur 3.3).

Suspensjonen ble pipettert av og kupongene ble på nytt vasket med sterilt destillert vann. For de to ekstra kupongene som skulle mikroskoperes i det første gjentak, stoppet behandlingen etter vasking med sterilt destillert vann.



Figur 3.3 Dyrking av biofilm på sterile stålkuponger i seksbrønns mikrotiterbrett. Én kupong ble plassert i hver av de fire brønnene.

Desinfeksjon av biofilm

Biofilmen ble så eksponert for et desinfeksjonsmiddel; enten BC med en konsentrasjon på 200 ppm eller Climax med en konsentrasjon på 0,1 %. Ved første gjentak med Climax ble det benyttet en konsentrasjon på 0,2 %. Løsningene ble laget fra konsentrert stamløsning ved fortynning i sterilt vann til ønsket konsentrasjon.

Kun to av stammene ble testet med Climax, mens alle stammene ble testet med BC. Forsøket med Climax ble kjørt seks ganger, første gang med 0,2 % Climax, de resterende fem gangene med 0,1 % Climax. Med BC ble det kjørt 3 gjentak, med unntak for bakteriestammene MF1844 og MF1872, hvor det ble kjørt seks gjentak. Se tabell 3.3.

Tabell 3.3 Oversikt over bakteriestammer benyttet i desinfeksjonsforsøket, og hvilke bakteriestammer som ble utsatt for hvilke desinfeksjonsmiddel.

Desinfeksjonsmiddel	Stamme	Art
Climax ^a	MF1844	<i>S. cohnii</i>
	MF1872	<i>S. capitis</i>
BC ^b	MF1844	<i>S. cohnii</i>
	MF1862	<i>S. lentus</i>
	MF1871	<i>S. capitis</i>
	MF1872	<i>S. capitis</i>
	MF2051	<i>S. aureus</i>
	MF2052	<i>S. aureus</i>

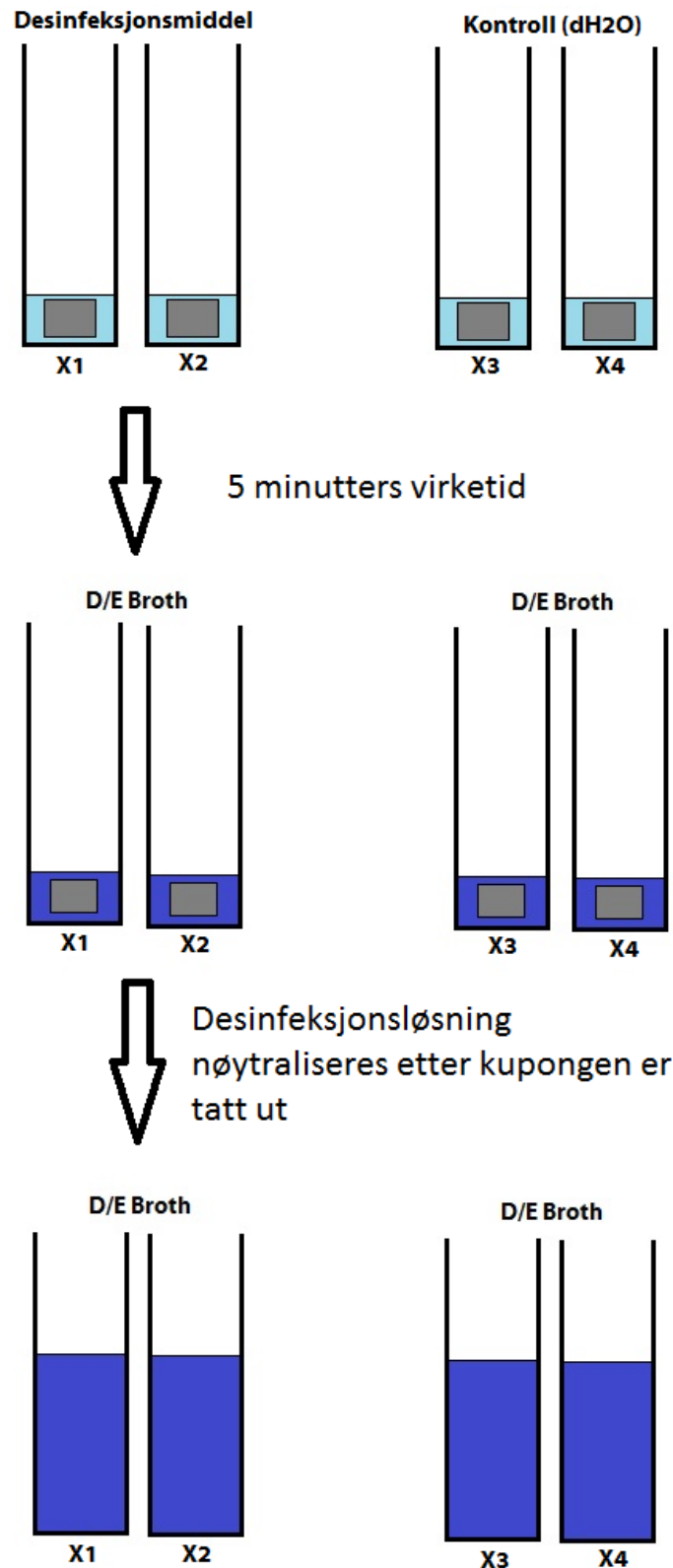
^a 0,1 %^b 200 ppm

For hver stamme ble det til sammen benyttet tolv glassrør (se figur 3.4 for forsøksoppsett). Rørene hadde en diameter på tre cm og rommet ca. 56 ml og stålkupongene og tålte sonikering. I rør X1 og X2 ble det tilsatt 6 ml desinfeksjonsmiddel, og i rør X3 og X4 6 ml destillert vann (kontroll). Fire kuponger fra hver stamme ble overført til fire respektive rør – én kupong per rør med 30 sekunders mellomrom mellom hver kupong tilsatt.

Etter fem minutters inkubering i desinfeksjonsmiddel/kontroll (dH₂O) ble kupongene overført til et respektivt glassrør med 6 ml DifcoTM D/E Neutralizing Broth (D/E Broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA).

Gjenværende desinfeksjonsløsningen/kontroll-løsningen ble så tilsatt 34 ml D/E Broth for nøytralisering.

Rørene med kupong og 6 ml D/E Broth ble videre eksponert for sonikering i 10 minutter i et sonikeringskar (Branson ultrasonic cleaner, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, US. 3510 EDTH) så fort alle kupongene hadde vært utsatt for desinfeksjonsmiddel/kontroll-løsning.



Figur 3.4 Oppsett for desinfeksjonstest på biofilm. Rør X1 og X2 ble tilsatt 6 ml desinfeksjonsmiddel og rør X3 og X4 6 ml destillert vann (kontroll). Én og én kupong ble deretter tilsatt i et av de fire rørene med 30 sekunders mellomrom. Desinfeksjonsmidlet/destillert vann fikk virke i nøyaktig 5 minutter før kupongen ble tatt ut av løsningen og nøytralisert i 6 ml Difco™ D/E Neutralizing Broth. Med en gang kupongen var fjernet fra løsningen ble det tilsatt 34 ml D/E Broth i løsningen for å nøytralisere væsken.

Det ble laget en fortynningsrekke av hver løsning; 500 µl av desinfeksjonsløsningen/kontroll-løsningen/sonikeringsløsningen ble overført til 4,5 ml peptonvann (4 g Bacteriological peptone + 34 g NaCl i 4 liter dH₂O, Pepton: Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England). Utplating ble gjort med automatisk platespreder (WASP 2, Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, England) på TSA-skåler. Desinfeksjonsløsningen/kontroll-løsningen ble et mål på antall levende bakterier i suspensjon, mens sonikeringsløsningen ble et mål på antall levende bakterier på kupong. Etter inkubering i 24 timer ved 30 °C ble skålene lest i en automatisk plateleser (ProtoCOL 2 version 1.1, Synbiosis, Cambridge, UK) i programmet ProtoCOL 2 Colony Counting and Zone Sizing System (Synbiosis, Cambridge, UK).

Mikroskopering av biofilm fra stålkuponger behandlet med Climax og BC

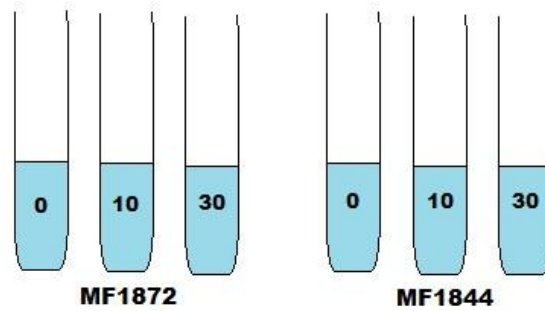
Som en test på om sonikeringen løsnet bakteriene fra stålkupongene, ble én kupong, som ikke var sonikert og to kuponger, som var sonikert og enten behandlet med Climax, BC eller sterilt destillert vann, farget med Acridine Orange. Kupongene ble videre mikroskopert med et fluorescensmikroskop (Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), og det ble tatt bilder av gjenværende biofilm ved å benytte programvaren Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, USA).

3.6 Suspensjonstest med BC

I dette forsøket ble sensitiviteten overfor BC i suspensjon undersøkt for stamme MF1844 og MF1872.

Stamme MF1844 og MF1872 ble podet over fra TSA skåler til TSB og inkubert ved 30 °C over natt på risting. Det ble laget en ny overnattkultur i TSBNG, med 1 % inokulum fra forrige kultur, som ble satt ved 30 °C i rundt 18 timer på risting. Overnattkulturen ble så fortynnet 10 ganger i peptonvann.

Det ble benyttet to konsentrasjoner av BC; 10 ppm og 30 ppm. Vann ble benyttet som en tredje behandling, og fungerte som kontroll. For hver stamme ble 0,5 ml av fortynnet bakteriesuspensjon overført til 4,5 ml desinfeksjonsmiddel, en med 10 ppm og en med 30 ppm BC-konsentrasjon. I tillegg ble 0,5 ml av hver av stammene overført til 4,5 ml sterilt vann (se figur 3.5). Etter 5 minutters virketid ble 0,5 ml av hver løsning overført til et nytt rør med 4,5 ml DifcoTM D/E Neutralizing Broth.



Figur 3.5 Oppsett suspensjonstest for *S. capitis* MF1872 og *S. cohnii* MF1844. Benzalkoniumklorid med konsentrasjonene 10 ppm og 30 ppm ble benyttet som desinfeksjonsmiddel. Nullprøven bestod kun av sterilt destillert vann og fungerte som kontroll.

Det ble laget fortynningsrekker ved å blande 500 µl av hver løsning i 4,5 ml peptonvann. Utplatingen ble gjort med WASP, i tillegg til 500 µl direkte utplattet manuelt, fra rør som hadde vært eksponert for desinfeksjonsmiddel. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 48 timer før de ble avlest. Forsøket ble gjentatt 3 ganger på hver av stammene.

Et fjerde gjentak ble i tillegg kjørt på stamme MF1872, men på dette gjentaket ble en konsentrasjon på 200 ppm BC benyttet.

3.7 Forekomst av *bap*-gener i stafylokokker

I dette forsøket ble det testet om stammene MF1844, MF1871, MF1872 og MF1890 hadde *bap*-genet som koder for proteiner assosiert med biofilm.

Det ble benyttet to sett primere, tidligere brukt for å amplifisere *bap*-genet i flere typer stafylokokker. Forsøket ble kjørt uten positive kontroller, da disse ikke fantes i stammesamlingen på gjeldene tidspunkt.

Stammene ble strøket ut på TSA og inkubert over natt ved 30 °C. Dagen etter ble det plukket en koloni fra hver agarskål, ved å bruke en 200 µl pipettespiss. Cellene ble så smurt ned i bunnen av 96-brønns PCR plate (Thermo Scientific AB-0900. 0,2 ml Semi-skirted 96-brønns PCR plate, Waltham, US).

Det ble til sammen laget tre rader som inneholdt alle de valgte stammene. En strips ble plassert over brønnene, og brettet ble kjørt i mikrobølgeovnen i ett minutt ved full effekt.

Det ble laget en Qiagen multiplex PCR-blanding ved å blande; 6,25 µl 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Venlo, Netherlands), 0,25 µl 10 pmol/µl Primer 1, 0,25 µl 10 pmol/µl Primer 2 og 5,75 µl RNase-free water. Totalt volum 12,5 µl.

For hver stamme ble det kjørt tre PCR reaksjoner med følgende tre primersett:

Tabell 3.4 Primersett benyttet til amplifisering av *bap*-gen i *Staphylococcus*.

Primer-sett	Primer	Sekvens	Fragment lengde (bp)
1 ^a	BAP2F	5'-GAG CCA GAT AAA CAA CAA GAA G-3'	598
	BAP 2R	5'-CAT GCT CAG CAA TAA TTG GAT C-3'	
2 ^b	bapF-6m	5'-ACT TAY TRC CHT ATA TCG AAR TAG-3'	900
	Sasp-7c	5'-GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC-3'	
3	Mangala F	5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'	466
	Mangala R	5'-GAA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'	

^a Referanse primersett: (Potter et al. 2009)

^b Referanse primersett: (Cucarella et al. 2001)

12 µl av mastermixen ble tilsatt i brønnene i 96-brønns PCR plata med de utvalgte bakteriestammene; en rad med primersett 1, en rad med primersett 2 og en tredje rad med primersett 3. Brettene ble spunnet rask ned før det ble kjørt PCR på en PCR-maskin (Gene Amp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, USA).

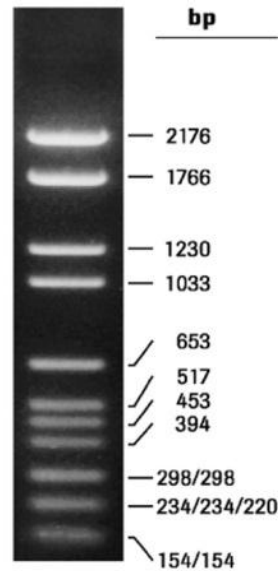
Følgende PCR-program ble benyttet:

Tabell 3.5 PCR-program benyttet for valgte primersett. Primersett 1 og 2 benyttet samme PCR-program, mens det tredje primersettet, Mangala, var forskjellig fra de to andre i stegene *Annealing* og *polymerisering*.

Trinn	BAP2F + BAP 2R / bapF-6m + sasp-7c		Mangala F + Mangala R	
Initieringssteg	15 min	95 °C	15 min	95 °C
3-stegs syklisk repetering 30:				
Denaturering	30 s	94 °C	30 s	94 °C
Annealing	90 s	50 °C	90 s	60 °C
Polymerisering	1 min	72 °C	30 s	72 °C
Avsluttende polymerisering	10 min	72 °C	10 min	72 °C

Etter PCR-programmet var kjørt, ble det laget en blanding med 3 µl H₂O + 2 µl orange G loading buffer (Sigma Chemical Co. St. Louis USA) + 5 µl PCR-produkt for hver stamme. Blandingene ble amplifisert i hver sin brønn på en 0,7 % agarosegel (Certified™ Molecular Biology Agarose, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA.), farget med GelRed (GelRed

Nucleic Acid Stain, Biotium, Hayward, CA.), og deretter kjørt ved 100 V i 30 min. Ladder som ble benyttet var Standard VI (figur 3.6, DNA Molecular weight marker, Roche, Basel, Schweiz). Deretter ble det tatt et bilde av gelen som viste oppnådde bånd. Maskin benyttet til å se oppnådde bånd var Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA.) og programvare Image Lab 4.1 (Bio-Rad Laboratories).



Figur 3.6 Ladder Standard VI (DNA Molecular weight marker) benyttet ved kjøring av PCR-produkt på gel.

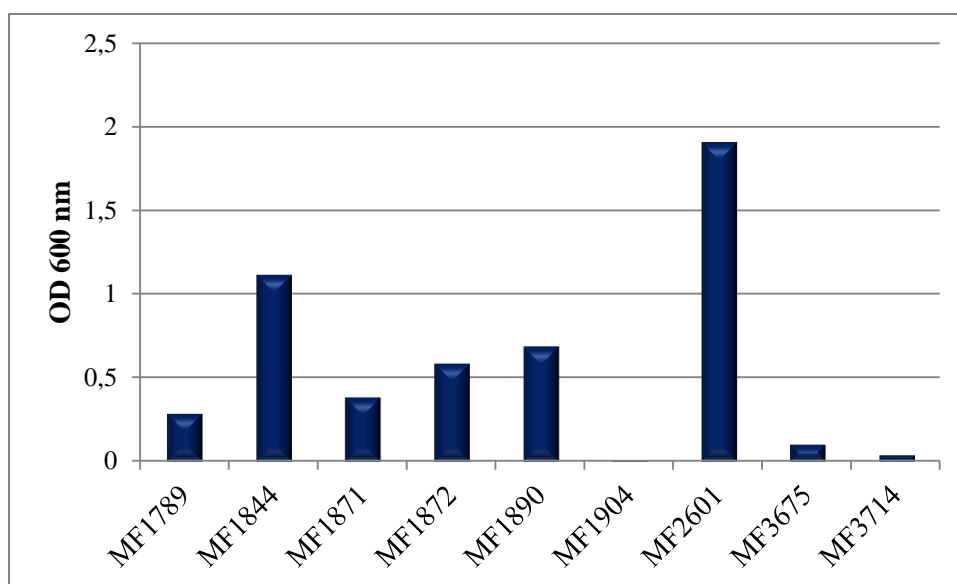
3.8 Statistiske analyser

Data fra de ulike forsøkene ble analysert ved ulike analyser som paret T-test, ett-utvalgs T-test, enveis ANOVA og Tukey's test. MINITAB (Minitab® 16.1.1) ble benyttet som programvare, og statistisk signifikans ble definert som $p < 0.05$.

4 Resultater

4.1 Biofilmdannelse i mikrotiterbrett

Ni stammer av *Staphylococcus* ble dyrket i 96-brønns mikrotiterbrett i 2 døgn. Etter endt inkubasjon ble OD_{600nm} målt for å konstatere at det var vekst i alle brønnene, med unntak av kontrollbrønnene som kun var tilsatt vekstmedium. Biofilmene ble så eksponert for ulike virkestoff i 2 timer. PBS fungerte som kontroll og gav i tillegg en indikasjon på total biofilmdannelse hos de ni *Staphylococcus*-stammene (figur 4.1).

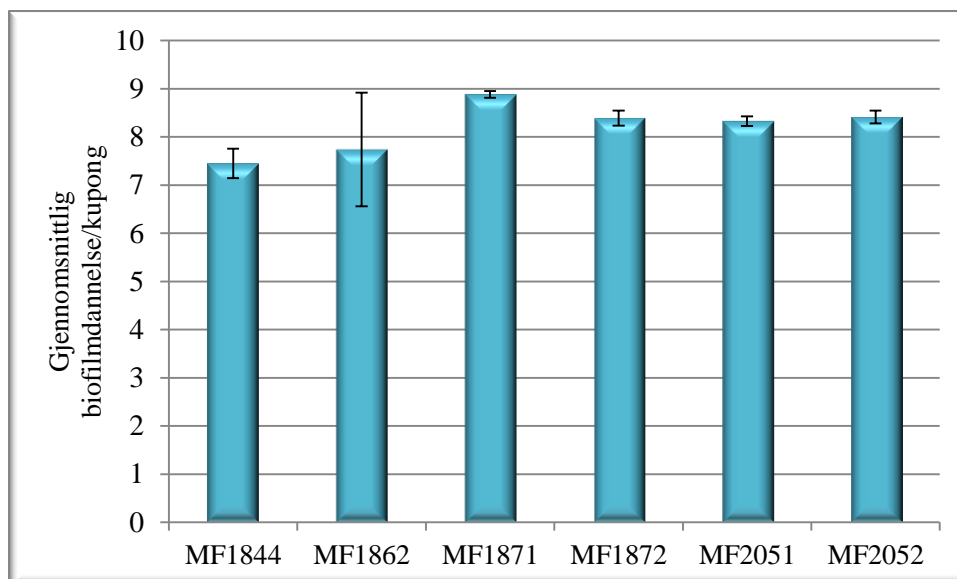


Figur 4.1 Total biofilmdannelse angitt som OD_{600nm} etter farging, avfarging og oppløsning av farge hos ni stammer av *Staphylococcus*. Tallene er beregnet ut ifra et gjennomsnitt av to gjentak for hver stamme (ett gjentak for MF3714), hvor PBS ble benyttet som virkestoff. MF1904 hadde lav biofilmdannelse. Derfor er verdien vanskelig å se på figuren.

Figuren viser varierende grad av biofilmdannelse mellom de ni stammene, hvor tre av stammene nærmest ikke har biofilmdannelse.

4.2 Biofilmdannelse på stål

De seks *Staphylococcus*-stammene MF1844, MF1862, MF1871, MF1872, MF2051 og MF2052 ble dyrket på stålkuponger i to døgn. Etter inkubering ble kupongene eksponert for destillert vann i nøyaktig fem minutter og antall bakterier ble beregnet. Figur 4.2 viser gjennomsnittlig biofilmdannelse per kupong for hver av de seks *Staphylococcus*-stammene.



Figur 4.2 Gjennomsnittlig biofilmdannelse på kuponger eksponert for vann hos *Staphylococcus*-stammer. Verdiene er angitt som gjennomsnitt basert på fem gjentak for MF1844, to for MF1862, tre for MF1871, MF2051 og MF2052 og fem gjentak for MF1872. Standardavvik er markert med feilfelt.

Figuren viser at biofilmdannelsen var jevnere mellom stammene på stål sammenlignet med polystyren (mikrotiterbrett). Stamme MF1844 viste lavere biofilmdannelse på stål sammenlignet med polystyren, mens stamme MF1872 viste høyere biofilmdannelse på stål enn polystyren. I tillegg ligger MF1871 mye høyere i biofilmdannelse på stål enn på polystyren, og er den stammen som produserte mest biofilm på stål. Denne stammen produserte samtidig minst biofilm på polystyren.

4.3 Oppløsning av biofilm i mikrotiterbrett





































Etter eksponering av virkestoff, ble gjenværende biofilm farget med krystallviolett. Figur 4.3 viser et representativt utvalg av gjenværende krystallviolett etter fire minutters farging. Tre av stammene viste svært lav biofilmdannelse og resultatene er derfor kun nevnt i vedlegg 3.

For å finne et mål på gjenværende biofilm ble et gjennomsnitt av tre paralleller for hvert virkestoff, delt på gjennomsnittet av fem paralleller av kontroll (PBS) for hver stamme.

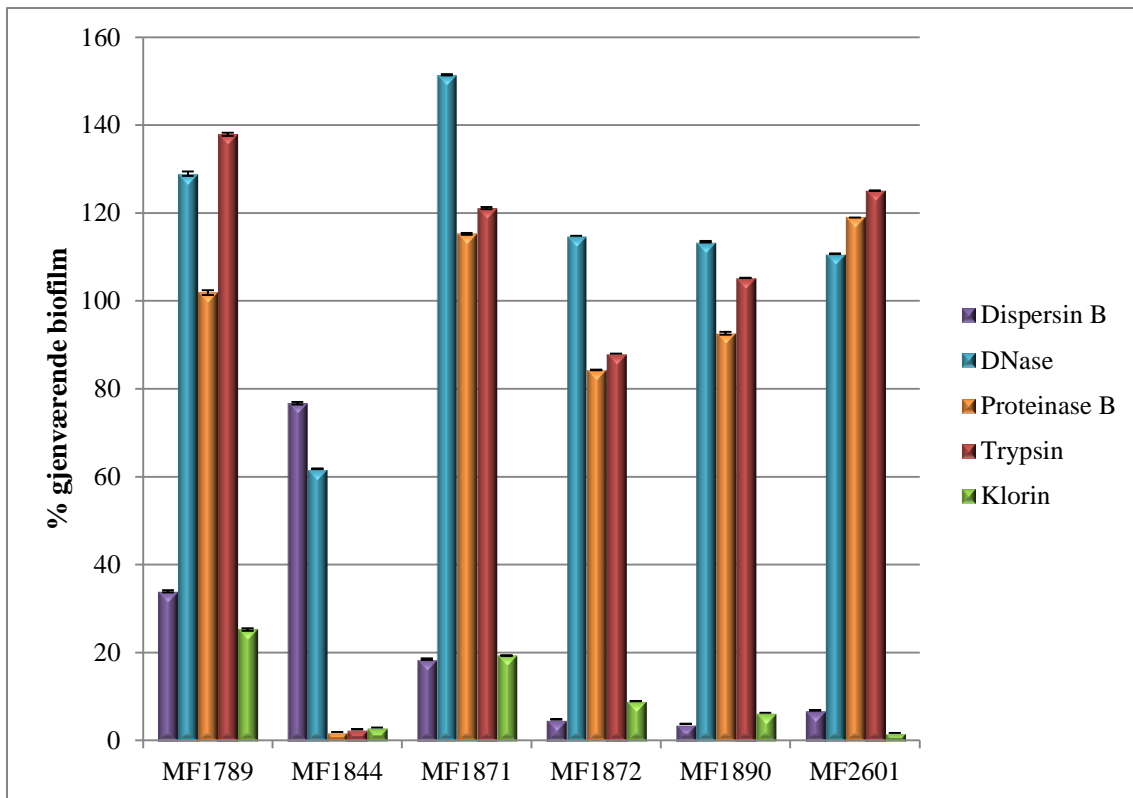
Kartlegging av de seks stammene med høyest biofilmdannelse viste at virkestoffene hadde ulik effekt på disse stammene. Figur 4.3 og 4.4 gir en oversikt over virkestoffenes oppløsende effekt på dannet biofilm. (Rådata bak figuren er gitt i vedlegg 3). Ved klorin benyttet som virkestoff viste alle de seks stammene <20 % gjenværende biofilm sammenlignet med

kontroll. Dispersin B viste seg å være effektivt til oppløsning av biofilm hos fem av stammene, med unntak av MF1844 som viste kun noe oppløsning av biofilm. Biofilm dannet av denne stammen ble i større grad nedbrutt av Proteinase K og Trypsin. DNase viste seg å ha liten innvirkning på biofilmen hos alle seks stammene.

I tillegg til enzymene dispersin B, proteinase K, trypsin og DNase, og desinfeksjonsmiddelet klorin ble NaIO₄ – natriumperiodat benyttet som et virkestoff. NaIO₄ viste liten evne til nedbrytning av biofilm hos alle seks stammene og data fra dette forsøket er derfor kun nevnt i vedlegg 3.

	MF1789	MF1844	MF1871	MF1872	MF1890	MF2601
PBS						
Dispersin						
Proteinase						
Trypsin						
DNase						
Klorin						

Figur 4.3 Gjenværende biofilm etter utsettelse for virkestoff. Bildene viser et representativt utvalg av gjenværende biofilm for seks stammer av *Staphylococcus* etter farging med krystallviolett. PBS fungerte som kontroll og indikerer total biofilmdannelse hos hver enkelt stamme.



Figur 4.4 Oppløsning av biofilm i mikrotiterbrett for ulike stammer av *Staphylococcus*. Prosent gjenværende biofilm i mikrotiterbrett etter to timers utsettelse for ulike virkestoff, regnet ut ifra PBS. Figuren viser gjennomsnitt av to målinger. OD₆₀₀-verdier for brønner kun tilsatt vekstmedium er trukket fra verdiene som vises i grafen. Standardavvik er markert med feilfelt.

Enkelte av stammene ble målt (OD_{600nm}) til høyere gjenværende biofilm etter utsettelse for enzym sammenlignet med kontrollbrønner. Derfor er prosent gjenværende biofilm høyere i enkelte tilfeller. Det ble utført en Tukey's test på DNase og PBS som viste at det ikke var signifikant mer biofilm i disse brønnene sammenlignet med kontrollbrønn ($p=0.150$).

4.4 Desinfeksjon av biofilm på stål

4.4.1 Desinfeksjon med 200 ppm BC

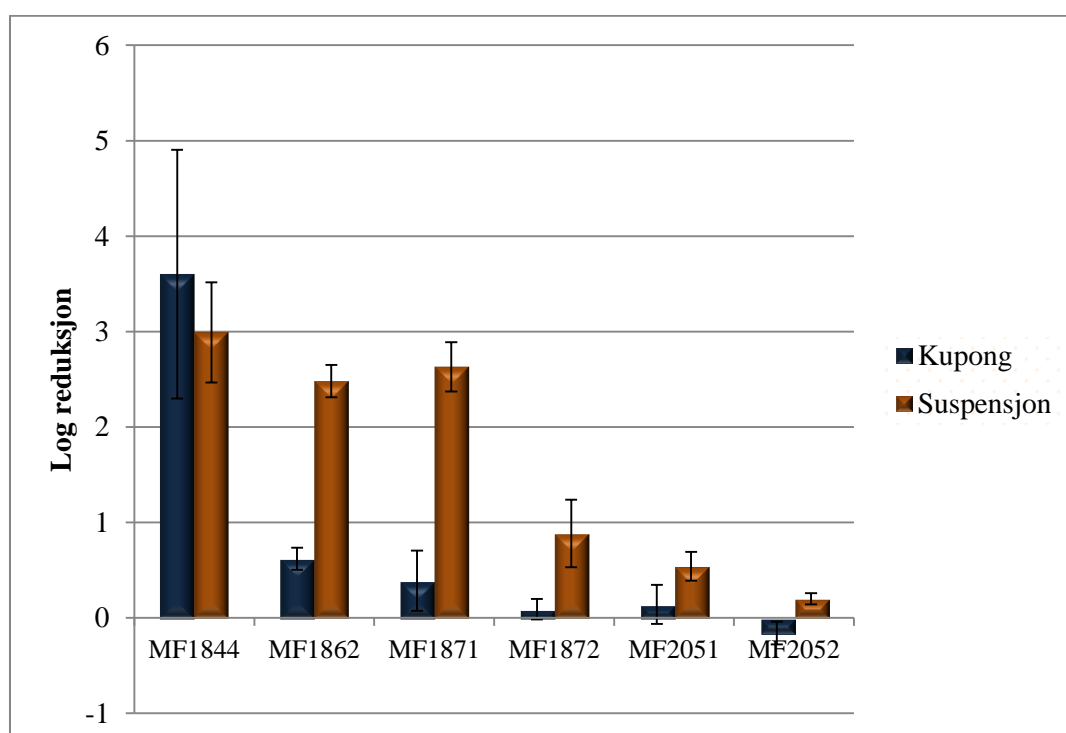
Stammene MF1844, MF1862, MF1871, MF1872, MF2051 og MF2052 ble dyrket på stålkuponger. Etter to dagers inkubering ble stålkupongene eksponert for 200 ppm benzalkoniumklorid i nøyaktig 5 minutter og antall overlevende bakterier beregnet. Kupongene ble mikroskopert med et fluorescensmikroskop, men på grunn av overgrodde kuponger er bildene kun vist i vedlegg 4.

Figur 4.5 viser gjennomsnittlig log reduksjon på kupong og i suspensjon for de fem bakteriestammene. Forsøket ble først utført med fem gjentak for MF1844 og MF1872. Det ble

deretter bestemt å teste ytterligere fire stammer, som ble testet i tre gjentak. Gjennomsnittlig log reduksjon på kupong var størst for MF1844 - over tre ganger større, sammenlignet med de andre stammene. Hos alle bakteriestammene, bortsett fra hos MF1844, var drapet i suspensjonen større enn på kupong (figur 4.5).

MF1844 hadde signifikant lavere toleranse overfor BC i biofilm enn de andre stammene ($p=0.000$).

Tukey's test viste ingen signifikante forskjeller mellom MF2051 og MF2052 i toleranse overfor BC ($p=0.427$).



Figur 4.5 Gjennomsnittlig log reduksjon på kupong/ suspensjon for stammer av *Staphylococcus* eksponert for 200 ppm benzalkoniumklorid. Gjennomsnittene er regnet ut ifra 2 gjentak for MF1862, 3 gjentak for stammene MF1871, MF2051 og MF2052, og 5 gjentak for stammene MF1844 og MF1872. Standardavvik er markert med feilfelt.

4.4.2 Desinfeksjon med 0,1 % Climax

Stammene MF1844 og MF1872 ble dyrket på stål i mikrotiterbrett. Etter 48 timers inkubering ble stålkupongene eksponert for 0,1 % Climax i nøyaktig 5 minutter. Løsningene ble deretter spredd på TSA og inkubert i et døgn ved 30 °C for å undersøke overlevelse av bakterier.

Ved første gjentak ble det benyttet en konsentrasjon på 0,2 % Climax. Resultatene viste fullstendig drap av bakteriene. For å kunne undersøke om det var noen forskjell mellom

MF1844 og MF1872 i forhold til toleranse overfor desinfeksjonsmiddelet, ble det valgt å halvere konsentrasjonen til 0,1 % i de andre gjentakene.

I de fleste gjentakene med Climax var det fullstendig drap av bakteriene, selv med en konsentrasjon på 0,1 %. Dette var tilfellet for både MF1844 og MF1872 (tabell 4.1). I to av gjentakene viste derimot MF1872 større tendenser til overlevelse enn MF1844 (se vedlegg 3 for rådata).

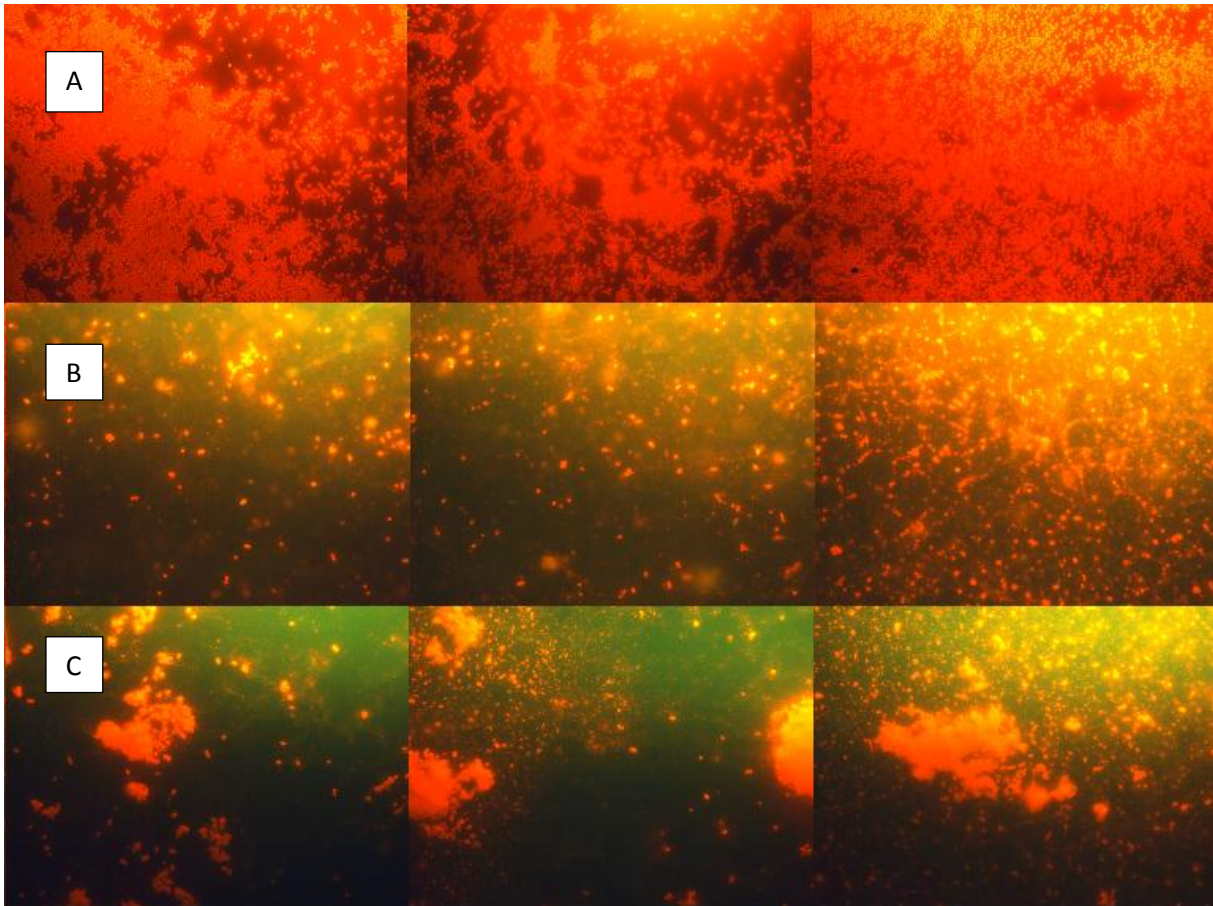
Et utvalg av kuponger fra hver av stammene MF1844 og MF1872 ble i tillegg farget og mikroskopert med et fluorescensmikroskop (figur 4.6 og figur 4.7). For hver av de to stammene var én ubehandlet kupong med biofilm, én kupong behandlet med vann etterfulgt av sonikering og den siste kupongen behandlet med 0,1 % Climax etterfulgt av sonikering.

Bildene viser svært tett biofilmdannelse hos MF1872 sammenlignet med MF1844. Hos den sistnevnte er det mulig å observere enkeltkolonier, mens hos MF1872 er det lag på lag med biofilm. Først etter desinfeksjon med Climax var det mulig å se enkeltceller av denne stammen.

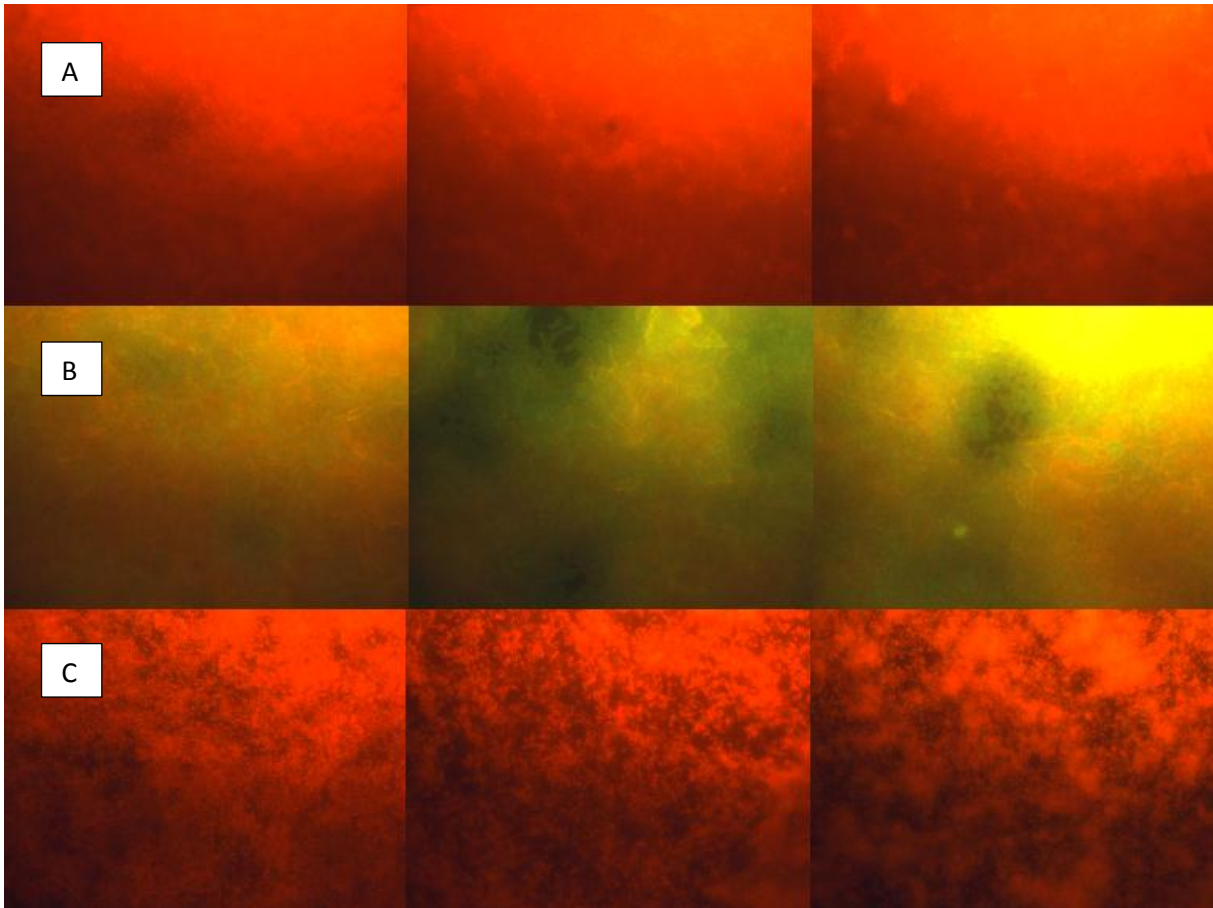
Tabell 4.1 Gjennomsnittlig log reduksjon på kupong/suspensjon etter desinfeksjon med 0,1 % Climax SU388. Desinfeksjonsmiddelet ble testet på stammene *Staphylococcus* MF1844 og MF1872. Verdiene er et gjennomsnitt av fem gjentak. Ved første gjentak ble det benyttet en konsentrasjon på 0,2 %. I de neste gjentakene var denne halvert til 0,1 %.

	Reduksjon kupong (log cfu/kupong)	Reduksjon suspensjon (log cfu/ml)
MF1844	5,31	>4,28
MF1872	4,81	3,72

I de fleste gjentakene var det ingen overlevende bakterier og reduksjonen var derfor større enn angitt. Se vedlegg 3 for rådata.



Figur 4.6 Mikroskopering av biofilm, fra stamme MF1844, på stålkupong. A) Bildene viser en ubehandlet stålkupong med kun dyrket biofilm. B) Bildene viser en stålkupong behandlet med vann etterfulgt av sonikering. C) Bildene viser en stålkupong som er blitt behandlet med Climax, etterfulgt av sonikering. Bildene er et representativt utvalg for hver av de tre kupongene.



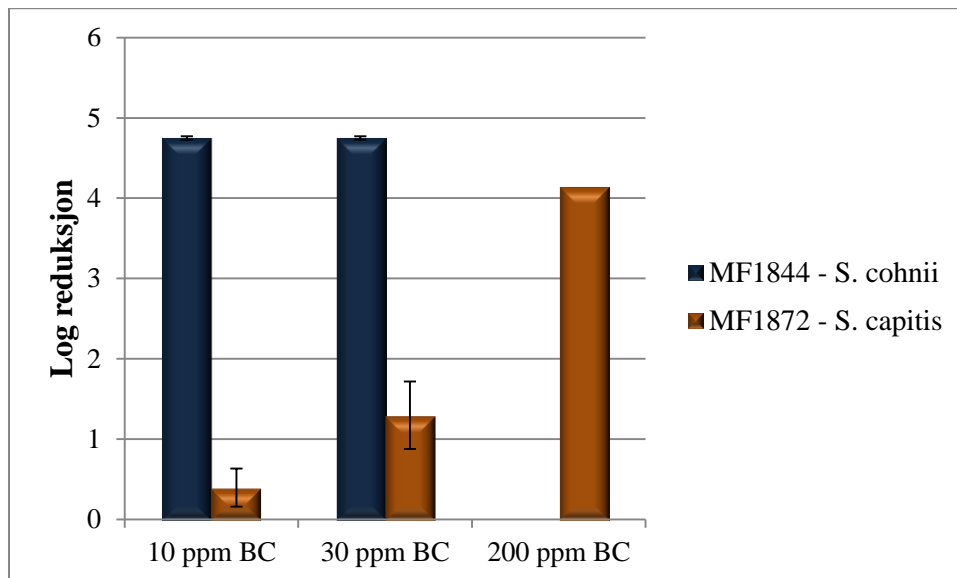
Figur 4.7 Mikroskopering av biofilm, fra stamme MF1872, på stålkupong. A) Bildene viser en ubehandlet stålkupong med kun dyrket biofilm. B) Bildene viser en stålkupong behandlet med vann etterfulgt av sonikering. C) Bildene viser en stålkupong som er blitt behandlet med Climax, etterfulgt av sonikering. Bildene er et representativt utvalg for hver av de tre kupongene.

4.5 Suspensjonstest med BC

For å undersøke om overlevelsessevnen overfor benzalkoniumklorid, i suspensjon, var forskjellig eller lik for stamme MF1844 og MF1872, ble de to stammene eksponert for konsentrasjoner på 10 og 30 ppm BC. MF1872 ble i tillegg testet med 200 ppm BC, da den viste god overlevelsessevne i opptil 30 ppm BC.

MF1872 viste klare tendenser til god overlevelsessevne i både 10 og 30 ppm BC (figur 4.8). Reduksjonen lå godt under 1 log cfu/ml på 10 ppm BC, mens på 30 ppm var den høyeste reduksjonen på 1,81 log cfu/ml. For MF1844 var det fullstendig drap på alle tre gjentakene ved 10 ppm. (se vedlegg 3 for rådata). Eksponering for 200 ppm på MF1872 gav fullstendig drap.

Tukey's test viste at MF1872 hadde signifikant lavere drap enn log 4,5 cfu/ml reduksjon i både 10 ppm ($p=0.001$) og 30 ppm ($p=0.004$) BC. Drapet var derimot signifikant større ved 30 ppm kontra 10 ppm ($p=0.022$)



Figur 4.8 Log reduksjon etter desinfeksjon med 10, 30 og 200 ppm benzalkoniumklorid i suspensjon. Figuren viser et gjennomsnitt av tre forsøk for 10 og 30 ppm. For 200 ppm ble kun MF1872 testet, i ett gjentak. Standardavvik er markert med feilfelt.

4.6 Forekomst av *bap*-gener i stafylokokker

Det ble kjørt PCR med to primersett for *bap*-gener hos *Staphylococcus* på stammene MF1844, MF1871, MF1872 og MF1890. I mangel på positive kontroller ble det i tillegg kjørt et primersett, Mangala F+R, for amplifisering av 16S rDNA, som er universelt i alle bakterier.

Bildet tatt etter kjøring på agarosegel viser at *bap*-genet ikke kunne påvises i noen av stammene (figur 4.9). 16S rDNA ble derimot påvist i alle stammene, noe som tyder på at DNA var frigitt fra bakteriene i tilstrekkelig kvalitet og at PCR-reagenser fungerte.



Figur 4.9 Bilde av gel kjørt med tre ulike primersett på fire stammer av *Staphylococcus*. De røde båndene (z1-z4) er produkter ved bruk av Mangala F+R for stammene 1: MF1844, 2: MF1872, 3: MF1871 og 4: MF1890. Brønner merket med 5 indikerer gelelektroforese-blanding uten tilsatt PCR-produkt. X indikerer PCR-reagens med primersett BAP2F + BAP 2R og y indikerer primersett bapF-6m + sasp-7c.

5 Diskusjon

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke om ulike enzymer og natriumperiodat hadde oppløsende effekt på allerede dannede biofilmer av ulike arter/stammer av *Staphylococcus*, for dermed å få en indirekte indikasjon på oppbygging av biofilm-matriks. Det ble også sett på om det var varierende grad av biofilmdannelse mellom stammene. Det ble undersøkt om det var variasjon i toleranse overfor desinfeksjonsmidler mellom ulike stammer, og om biofilm og resistensgener var involvert i dette. Det ble i tillegg undersøkt for tilstedeværelse av genet som koder for biofilm assosierte protein (*bap*) i utvalgte stammer av *Staphylococcus*.

5.1 Enzymer

Tidligere studier har vist at ulike enzymer har en oppløsende effekt på biofilm, og at den henger nøye sammen med den kjemiske sammensetningen av biofilmen (Chaignon et al. 2007). Det samme viste forsøket i denne oppgaven med enzymer på ni stammer av *Staphylococcus*. For stammer som dannet biofilm ble det i det innledende forsøket vist at biofilm produsert av de forskjellige stammene hadde ulik toleranse overfor de ulike enzymene.

Resultatene indikerer at flertallet av stammene som ble undersøkt dannet en matriks bestående av polysakkarider. Biofilm dannet av undersøkte stammer innen artene *S. aureus*, *S. capitis* og *S. epidermidis* ble helt eller delvis løst opp etter eksponering for enzymet dispersin B.

Dispersin B har vist seg å ha en nedbrytende effekt på PIA-basert biofilm ved å endolytisk hydrolysere de glykosidiske bindingene i poly- β -(1,6)- N-acetyl-D-glukoseamin (PIA) (Boles & Horswill 2011; Itoh et al. 2005; Rohde et al. 2010). Alle stammene som produserte en biofilm som løsnet med dispersin B har i tidligere forsøk vist seg å være *ica*-positive (Moretro et al. 2003) og dermed ha mulighet til å danne PIA. Izano et al. (2007) har tidligere vist at dispersin B har en oppløsende effekt på biofilm dannet av stammer av *S. aureus* og *S. epidermidis*. Itoh et al. (2004) viste i sin studie at dispersin B ikke har noen effekt på biofilmdannelse hos stammer som mangler *ica*-operonet. Stamme MF1844 (*S. cohnii*) skilte seg signifikant fra de andre stammene og ble ikke brutt ned av dispersin B ($p=0.034$). Med bakgrunn i studien til Itoh et al. (2004) kan det tyde på at denne stammen ikke danner matriks bestående av polysakkarider.

Det var kun biofilmen til *S. cohnii* MF1844 som ble løst opp av proteinase K og trypsin ($p=0.035$ og $p=0.002$). Disse enzymene er begge serin-proteaser med endoproteolytisk aktivitet. Proteinase K kutter peptidbindinger i alifatiske, aromatiske og hydrofobiske aminosyrer, mens trypsin er spesifikk for peptidbindinger på lysin og arginin (Gilan & Sivan 2013a).

Resultatene tyder på at denne stammen hovedsakelig produserte en biofilm bestående av ekstracellulære proteiner. Kogan et al. (2006) viste gjennom sin studie at biofilmen til visse kliniske stammer av stafylokokker ikke inneholder PIA, men for det meste består av teikoidsyrer og proteiner, da proteinase K viste seg å ha en oppløsende effekt på biofilmen. Dette indikerer at makromolekylene som stabiliserer biofilmen er komponenter bestående av proteiner (Kogan et al. 2006). En tidligere studie gjort av Ledsaak (2013) viste lignende resultater for disse stammene da det ble testet for hemmende effekt på biofilmdannelse ved tilsetning av dispersin B og proteinase K/trypsin.

DNase var det enzymet som viste lavest nedbrytende effekt på samtlige biofilmer. DNase bryter ned DNA. Ekstracellulær DNA (eDNA) har vist seg å spille en viktig rolle i utviklingen av en biofilm ved å gi strukturell stabilitet og beskyttelse mot antimikrobielle agenter (Gilan & Sivan 2013b). I et tidligere forsøk viste Oust Ledsaak (2013) at DNase hadde en sterk hemmende effekt på biofilmdannelsen hos en rekke stammer av *Staphylococcus*, hvor dispersin B også viste hemmende effekt (Ledsaak 2013). Det at DNase kun hemmer dannelse av biofilm, men ikke bryter ned ferdig biofilm kan tyde på at eDNA hos de testede stammene ikke utgjør en viktig del i en modnet biofilm, men kanskje er en viktigere del av matriks under oppbygging av biofilm. Dette antydte også Gilan & Sivan (2013) da den inhiberende effekten av DNase I inntraff tidlig i biofilmdannelsen, mens effekten var mindre fremtredende under modning av biofilmen.

Natriumperiodat (NaIO_4) hadde i dette forsøket liten oppløsende effekt på biofilm produsert av de ni testede stammene. Periodat har vist seg å ha en oksiderende effekt på karbon 3 og 4 som bærer tilstøtende hydroksylgrupper og bryte C-C bindinger i poly- β -1,6-N-acetyl-D-glukoseamin (Wang et al. 2004). Wang et al. (2004) viste i sin studie at behandling med metaperiodat førte til nærmest fullstendig oppløsning ($>90\%$) av biofilmen hos stammer av *Escherichia coli*, hvor poly- β -1,6-GlcNAc utgjorde store deler av matriks. Natriumperiodat har i tidligere forsøk vist seg å ha en nedbrytende effekt av biofilm rik på PIA på lik linje med dispersin B, og det faktum at de angriper samme molekyl, gjorde at vi forventet en effekt av periodat der vi fikk en effekt av dispersin B. I denne oppgaven ble det benyttet 40 mM NaIO_4 løst i dH_2O ved 30 °C. Samme konsentrasjon og løsningsmiddel har blitt benyttet i et tidligere

forsøk som viste oppløsning av biofilm ved bruk av *meta*-periodat (Fredheim et al. 2009). I et annet forsøk hvor natriumperiodat viste oppløsende effekt på en rekke biofilmer produsert av ulike stammer av *Staphylococcus*, benyttet de en konsentrasjon på 10 mM natriumperiodat oppløst i 50 mM natriumacetat-buffer (pH 4.5) ved 37 °C (Chaignon et al. 2007). Chaignon et al. (2006) viste i samme studien at natriumperiodat ikke hadde noen oppløsende effekt på en stamme av *S. epidermidis*, selv om den var en sterk PIA-produzent, og forklarte resultatet med at det kreves en ytterligere mild syrlig hydrolyse for å videre depolymerisere PIA-makromolekylene. Derfor var det ikke sikkert det var nok med en enkel behandling med periodat etterfulgt av vask for å tilstrekkelig oppløse den tykke PIA-biofilmen til *S. epidermidis* (Chaignon et al. 2007).

Klorin ble benyttet som kontroll på nedbrytende effekt, og var den forbindelsen som viste best evne til å løse biofilm produsert av alle seks stammene (>75 %). Klorin er et oksiderende middel som ødelegger den cellulære aktiviteten til proteiner (McDonnell & Russell 1999). Klor brukes både til vask og til desinfeksjon i næringsmiddelindustrien (Granum 2008). Vaskeeffekten er best ved høy pH og kloralkaliske midler for vask har en pH på 12-13 i brukerløsning. Desinfeksjonseffekten er høyere ved lavere pH og ofte brukes midler med en pH på om lag 11 (Stanga 2010). Selv om klorin viste seg å ha best nedbrytende effekt på samtlige biofilmer, var enzymene mer effektive i enkelte tilfeller. I et tidligere forsøk ble det vist ved bruk av elektron-mikroskop at det fortsatt var mikroorganismer igjen på rustfritt stål etter vask med opptil 150 ppm natrium hypokloritt (Schwach & Zottola 1984).

5.2 Biofilmdannelse

De ni stammene som ble dyrket i mikrotiterbrett i innledende forsøk viste varierende grad av biofilmdannelse, mens produksjonen var mer jevn hos de seks stammene som ble dyrket på stål. Resultatene etter biofilmdannelse viste en omvendt korrelasjon for de tre stammene som både var blitt dyrket på polystyren og stål. *S. lentus* MF1862 og *S. cohnii* MF1844 var stammer med en proteinrik matriks. Disse to viste tendenser til lavere biofilmdannelse på stål enn de fire andre stammene, med biofilm-matriks bestående av polysakkarider. Det kan derfor tyde på at bakterier som produserer en proteinrik matriks ikke like lett danner biofilm på stål som i polystyren og omvendt, men dette må testes på flere stammer med proteinmatriks før man kan konkludere med dette. *S. lentus* MF1862 ble heller ikke testet på polystyren, noe som gjør sammenligningsgrunnlaget vagt. Det er tidligere blitt observert at enkelte stammer av *S. aureus* har vanskeligere for å feste seg til rustfritt stål sammenlignet med andre stammer

(Vazquez-Sanchez et al. 2014). Det har blitt vist at hydrofobiske overflater (som teflon og plast) lettere lar seg kolonisere enn hydrofile overflater (som glass og metall) (Cloete et al. 2009).

Av de 12 *Staphylococcus*-stammene som ble testet i denne oppgaven hadde åtte av stammene fått påvist *icaADBC*-loket (Moretro et al. 2003). Én av stammene var ikke testet for dette lokuset, og de resterende to stammene var *ica*-negative. Møretrø et al (2003) fant ut at sterk biofilmdannelse og tilstedeværelse av *icaA* er positivt korrelert, og det virker dermed som *ica*-loket er viktig for biofilmdannelse. To av stammene som viste dårligst biofilmdannelse har derimot fått påvist *ica*-gen. I et annet forsøk ble det derimot vist at tilstedeværelse av *icaA* og *icaD* gener nødvendigvis ikke var positivt korrelert med biofilmproduksjon (Darwish & Asfour 2013). I en studie gjort av Møretrø et al. (2003) ble *ica*-loket påvist i fire av åtte biofilmmegative stammer av *S. epidermidis*. Samme observasjonen gjorde Ziebuhr et al. (1999), som i sin studie viste at ikke alle *ica*-positive isolater av *S. epidermidis* produserte biofilm (Ziebuhr et al. 1999). Disse studiene m.fl. viser at *ica*-positive stammer ikke nødvendigvis trenger å være gode biofilmdannere, som stemmer godt med resultatene i denne oppgaven.

Alle *ica*-negative stammer viste god biofilmdannelse sammenlignet med de andre stammene som har fått påvist *icaADBC*-loket i tidligere forsøk. At disse er gode biofilmdannere i tillegg til at to *ica*-positive stammer viste dårligst biofilmdannelse, tyder på at *ica*-gen ikke er avgjørende for god biofilmproduksjon, og at stammer med en proteinrik matriks har muligheter til å danne en like tykk og stabil biofilm som stammer med matriks basert på polysakkarider. Det er blitt vist i en studie at sterke biofilmdannere blant stammer av *S. epidermidis* uttrykte proteiner som var fraværende i proteinprofilen til de stammene som produserte lavere mengder biofilm. Dette understreker at det også finnes proteiner som er avgjørende for god biofilmdannelse (Sousa et al. 2009). Cucarella et al. (2001) mente at Bap ikke bare er involvert i intracellulært feste og akkumulering i flerlags celleklynger, som produktet av *ica* operonet gjør, men at det også bidrar i det primære feste til abiotiske overflater. Det er blant annet vist at biofilm-matriks bestående av Bap-proteinet utløser vedheft til epitelceller (Valle et al. 2012).

5.3 Toleranse overfor BC

De første forsøkene viste at *S. cohnii* MF1844 var mer sensitiv til BC i biofilm enn *S. capitis* MF1872 som inneholder et *qacA* gen. *qacA*-genet er sammen med *qacB*, *qac C*, *qacG* og

qacH blitt koplet opp mot resistens overfor kvartære ammoniumforbindelser (Heir et al. 1995; Heir 1998; Heir et al. 1998; Heir et al. 1999a; Heir et al. 1999b; Sundheim et al. 1998; Temiz et al. 2014). Siden de to stammene også hadde ulik sensitivitet mot enzymer var det usikkerhet om hva som kunne være mekanismen bak toleranse mot BC i biofilm.

Suspensjonstesten med BC viste at *S. capitis* MF1872 tålte mer enn *S. cohnii* MF1844 også i suspensjon, noe som ga en indikasjon på at forskjellen i sensitivitet ikke bare var relatert til biofilm.

Siden *S. capitis* MF1872 var *qacA* positiv, så ønsket vi å undersøke om *qac*-gener kunne ha betydning for toleranse mot BC i biofilm. Videre forsøk viste at det ikke var signifikante forskjeller i sensitivitet mot BC i biofilm mellom *S. aureus* MF2051 og *S. aureus* MF2052 ($p=0.427$), som er identiske stammer med unntak av at sistnevnte har et *qacC* gen. Ideelt sett burde man testet *qacA* gen i et slikt system, men dette var ikke tilgjengelig som klonet inn i plasmid i *S. aureus*. Siden to *qac*-negative stammer viste god toleranse overfor BC, tyder dette på at toleranse overfor kvartære ammoniumforbindelser har en annen forklaring.

Tilstedeværelse av *qac*-gen ($p=1.0$) er ut ifra disse resultatene ikke avgjørende for toleranse overfor BC. En studie gjort av Cabeca et al. (2012) antydte at en stamme av *S. aureus* isolert fra næringsmiddelindustrien, var mer tolerant overfor kvartære ammoniumforbindelser enn stammer av *Listeria monocytogenes* og *Escherichia coli* testet. Årsaken til den høye toleransen, utenom at de er mer tolerante i biofilm, er ikke kjent (Cabeca et al. 2012).

Vazquez-Sanchez et al. (2014) antydte at resistens overfor ulike desinfeksjonsmidler ikke er lik for ulike bakterie-stammer. Dette bemerker at det er behov for å bruke en bred samling av stammer i standardtester hvor hensikten er å teste bakteriedrepende effekt. Dette for å sikre en korrekt anvendelse av desinfeksjonsmidler i blant annet næringsmiddelindustrien (Vazquez-Sanchez et al. 2014).

Resultatene antydte at oppbygging av matriks spilte inn på toleransen overfor BC, og at en matriks bestående av mye polysakkarid gjorde bakteriestammen mer tolerant overfor BC. *S. cohnii* MF1862, som Leedsaak (2013) fant ut hadde en proteinrik matriks, viste derimot god toleranse overfor BC, og en matriks rik på polysakkarider er kanskje ikke avgjørende for toleransen overfor BC. For å finne ut om protein-matriks kan ha en betydning for svak toleranse overfor BC er det nødvendig å teste flere stammer med denne typen matriks. Vazquez-Sanchez et al. (2014) observerte at resistensen overfor BC økte med aldrende biofilm.

Som antydnet var toleransen overfor BC høyere i biofilm sammenlignet med i suspensjon. At cellene er mer tolerante i biofilm sammenlignet med i suspensjon er nevnt i en rekke artikler (Behnke et al. 2011; Cabeca et al. 2012; Flemming 1998; Vazquez-Sanchez et al. 2014).

Vazquez-Sanchez et al. (2014) fant ut at biofilm dannet av *S. aureus* på rustfritt stål, viste en høyere motstand mot BC sammenlignet med sine planktoniske celler, men denne økningen var sterkt stamme-avhengig. Selv om en stamme av *S. aureus* i biofilm viste en motstand 16 ganger høyere enn sine planktoniske celler, viste en annen stamme at biofilmen kun var om lag tre ganger mer motstandsdyktig sammenlignet med sine planktoniske celler. Begge stammene var gode biofilmdannere (Vazquez-Sanchez et al. 2014).

Eksposering for Climax resulterte i kraftig reduksjon i antall bakterier hos begge stammene testet. Da anbefalt brukerkonsentrasjon på 0,2 % drepte alle bakteriene, valgte vi å gå ned til en konsentrasjon på 0,1 %. Denne konsentrasjonen resulterte også i tilnærmet fullt drap av bakterier og det var derfor vanskelig å se om det var noen forskjell i toleransen mellom de to stammene. Peredikksyre har i tidligere forsøk vist seg å ha god baktericidal effekt på stammer av *S. aureus* isolert fra matindustrien (Cabeca et al. 2012; Vazquez-Sanchez et al. 2014). Siden vi ønsket å bruke konsentrasjoner som benyttes i næringsmiddelindustrien, valgte vi derfor å droppe dette desinfeksjonsmiddelet i videre tester, og kun gå videre med BC.

5.4 Evaluering av metoder

Dyrking av biofilm på polystyren og rustfritt stål er utbredte metoder innen biofilmforskning (Chaignon et al. 2007; Christensen et al. 1985; Moretro et al. 2003; Tormo et al. 2005; Wang et al. 2004). Plast og stål er materialer som benyttes mye i næringsmiddelindustrien (Cabeca et al. 2012; Van Houdt & Michiels 2010).

For å raskt oppnå biofilmdannelse i begge metodene ble inkuberingsstemperatur satt til 30 °C. Dette er ingen representativ temperatur for næringsmiddelindustrien hvor det etterstrebes en så lav temperatur som mulig for å senke hastigheten på all mikrobiologisk aktivitet. Dette oppnås ved at bedervelige næringsmidler alltid skal befinne seg i kjølekjede (mellom -1 og +4 °C) helt fra råvarestadiet, gjennom hele produksjonen og ut i omsetningsleddene (Hagesæther 1986). Mange av stammene som var isolert fra næringsmiddelindustrien viste seg å være svake biofilm-produsenter sammenlignet med lab-stammene. Dette trenger nødvendigvis ikke bety at de er dårligere biofilmdannere. Andre betingelser kunne gitt andre resultater, da disse

bakteriene er tilpasset kjøligere temperaturer og tilgang på annen næring. Dette er blant annet blitt vist for *Listeria monocytogenes*, hvor temperatur og næringstilgang påvirker evnen til vedheft til rustfritt stål, grunnet endrede fysiokjemiske egenskaper på bakterieoverflaten som hydrofobisitet/hydrofilisitet og overflateladning (Norwood & Gilmour 1999). En annen studie fant at stafylokokker med høy biofilmdannelse oftere ble isolert fra produkter med høy prosesseringsgrad (Vazquez-Sanchez et al. 2014).

Dyrking av *Staphylococcus*-biofilm på polystyren etterfulgt av eksponering for ulike enzymer har vist at *Staphylococcus* danner biofilm på polystyren og at ulike enzymer hadde ulik evne til å løsne biofilm produsert av de forskjellige stammene (Chaignon et al. 2007; Kogan et al. 2006). Resultatene gav en god indikasjon på både biofilmdannelse og enzymenes oppløsende effekt overfor de ulike biofilmene. Ulike stammer av *S. aureus* og *S. epidermidis* har i tidligere studier blitt beskrevet som gode biofilmdannere på blant annet polystyren (Gross et al. 2001; Vuong et al. 2003), og Møretrø et al. (2003) viste god biofilmdannelse hos også andre arter av *Staphylococcus*.

Metoden med dyrking av biofilm på stålkuponger etterfulgt av direkte desinfeksjon er ingen optimal metode for å undersøke drapeseffekt av desinfeksjon relatert til næringsmiddelindustrien. I næringsmiddelindustrien blir overflater vasket med rengjøringsmidler før desinfeksjon for å oppnå god effekt (Van Houdt & Michiels 2010). At rengjøring lønner seg før desinfeksjon vistes tydelig på stålkupongene som ble mikroskopert etter eksponering for desinfeksjonsmidler. Selv om 0,1 % Climax viste nærmere fullstendig drap av begge bakteriestammene, var det allikevel et tykt lag igjen med biofilm på kupongen til *S. capitis* MF1872 etter eksponering. Det betyr at biofilmen fortsatt kan inneholde mange bakterier, som desinfeksjonsmidlet aldri nådde fram til. Hensikten med oppgaven var derimot å undersøke om det var forskjell i toleranse overfor BC mellom stammene. Resultatene indikerte nettopp dette og suspensjonstesten understrekte at enkelte stammer av *Staphylococcus* også er tolerant overfor BC i suspensjon. Ved bruk av 200 ppm, som er brukerkonsentrasjonen i næringsmiddelindustrien, i suspensjon overlevde derimot ingen bakterier. Allikevel må man i industrien være helt sikre på at all biofilm er fjernet, for å være sikre på at alle stafylokokkene skal bli drept ved desinfeksjon.

PCR er en utbredt metode for deteksjon/amplifisering av spesifikke gen i bakterier (Piessens et al. 2012; Potter et al. 2009). I denne oppgaven ble det benyttet to primersett til amplifisering av *bap*-genet i fire utvalgte *Staphylococcus*-stammer (Potter et al. 2009; Tormo et al. 2005). Disse primerne hadde i tidligere studier vist å dekke ulike overlappende regioner av *bap*-genet, og resulterte i amplifisering av *bap* fra ulike arter *Staphylococcus*, inkludert *aureus* og *cohnii*. Det biofilm-assosierte proteinet (Bap) er et overflateprotein involvert i biofilmdannelsen (Tormo et al. 2005). Tidligere har *bap* kun blitt funnet i stammer av *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hyicus* og *S. cohnii* isolert fra melkekjertler hos kuer med jurbetennelse. Ingen stafylokokker isolert fra mennesker har fått påvist *bap*-genet (2009) (Potter et al. 2009). I en studie gjort av Darwish et al. (2013) ble *bap*-genet kun påvist i 4 av 40 *S. aureus* og 3 av 68 koagulase-negative stafylokokker isolert fra storfe med klinisk jurbetennelse. *Staphylococcus*-artene som ble testet for *bap*-gen i denne oppgaven var *S. cohnii*, *S. capitis* og *S. aureus*. Primersettene som ble benyttet har i tidligere forsøk vist seg å amplifisere *bap*-genet i flere typer stafylokokker. Bakteriestammen av spesiell interesse var *S. cohnii* MF1844, isolert fra et fjærkre foredlingsanlegg, som i innledende forsøk hadde vist å produsere en proteinrik matriks. Forsøket ble kjørt uten positive kontroller, da amplifisering av *bap*-gen hverken var gjort tidligere på stammer i Nofimas stammesamling, eller positive kontroller var bestilt inn. Genet kunne ikke påvises i noen av stammene. Et negativt aspekt er mangel på positive kontroller. Uten dem kan man ikke utelukke at stammene inneholder *bap*-genet, og at PCR resultatene gir falske negative resultat. Det kan også tenkes at *bap*-genet er noe forskjellig bygd opp i ulike stammer, og at primersett som ble benyttet i dette forsøket ikke var tilstrekkelig homologe i forhold til stammene som ble testet. Et av primerparene var tidligere benyttet til amplifisering av *bap* i *S. cohnii*.

5.5 Relevans av resultater for kontroll av biofilmdannelse i næringsmiddelindustrien

Resultatene i denne oppgaven viser tydelig at det eksisterer stammer innen genus *Staphylococcus* som er svært tolerante overfor BC, både i suspensjon og i biofilm. Tidligere studier har vist at anbefalte doser fra produsentene for BC, peredikksyre og natriumhypokloritt til desinfisering av flater i kontakt med mat var lavere enn doser som skulle til for fullstendig biofilm-fjerning, under enkelte miljøforhold som er vanlig i næringsmiddelindustrien (Vazquez-Sanchez et al. 2014) Dette setter spørsmålsteget ved dagens bakteriedrepende tester, og fremmer arbeidet for nye strategier for fjerning av biofilm.

Forsøket med enzymer har vist at biofilm produsert av ulike stammer løsner av tilstedeværelse av ulike enzymer. Enzymer kan derfor være et alternativt rengjøringsmiddel til bruk i næringsmiddelindustrien, mye på grunn av dens spesifisitet i tillegg til positive innvirkning på miljøet. I dag benyttes enzymer i en rekke industrielle prosesser. Enzymer blir blant annet benyttet i vaskemidler til bruk på tøy (Chiweshe & Crews 2000). I de senere årene har det vært økende interesse for bruk av xylanaser, spesielt til bruk i blekeprosessen i treforedlingsindustrien. Klorbasert bleking i treforedlingsindustrien har blant annet alvorlige miljøeffekter som produksjon av giftige og mutagene klorforbindelser (Comlekcioglu et al. 2014). Sen et al. (2014) viste nylig at man ved bruk av alkaliske proteaser isolert fra *Bacillus pseudofirmus* stamme SVB1 kunne fjerne fastbrente proteinrester fra faste underlag. Fastbrente proteinrester på overflaten av redskaper benyttet i meieri- og kjøttforedlingsindustrien er en stor utfordring, hvor rutinemessige renseoperasjoner involverer bruk av sterke vaskemidler basert på varm alkali og / eller syre, etterfulgt av varme- eller kjemisk desinfisering. Disse konvensjonelle tilnærmingene er hverken økonomisk eller miljøvennlig (Sen et al. 2014).

Disse studiene m. fl. viser at det er et potensial i bruk av enzymer til rengjøring i næringsmiddelindustrien. I tykkere biofilmer vil enzymene ha større mulighet til å trenge lenger inn i biofilmen og løse den opp fra innsiden, da klor kun vil oksidere komponenter på overflaten av en tykk biofilm. Ved å kombinere enzymbruk med rengjøringsmidler, vil rengjøringsmidlene komme lettere til, noe som vil forenkle rengjøringsprosessen. Bruk av enzymer forutsetter dog at flere enzymer blir benyttet samtidig, da ulike stammer viser ulik toleranse overfor forskjellige enzymer (Chaignon et al. 2007; Kogan et al. 2006) Enzymene trenger ikke kun omfatte de som ble benyttet i denne oppgaven, men også andre enzymer som proteaser, lipaser, amylase og cellulase for å nevne noen. Disse vil sammen bryte ned mye av næringsstoffene som befinner seg på overflater i næringsmiddelindustrien og minske sannsynligheten for biofilmdannelse. Per i dag vil bruk av enzymer som rengjøringsmiddel bli en svært kostbar prosess da det kreves enorme mengder enzym for å oppnå optimal effekt. Men med tiden vil det kanskje utvikles nye metoder til fremstilling av store mengder enzym, som vil gjøre det lønnsomt å velge denne løsningen, særlig til områder med biofilmutfordringer.

6 Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven har vist at biofilm dannet av ulike arter/stammer av *Staphylococcus* reagerer ulikt på enzymer. Dette tyder på at stafylokokker har forskjellig sammensetning av matriks, hvor flertallet av de testede stammene har en biofilm bestående hovedsakelig av polysakkarider. Enzymer kan derfor være et alternativ til konvensjonelle vaskemidler for kontroll av biofilm. Det vil sannsynligvis måtte brukes en blanding av enzymer for å bryte ned biofilmer med ulik sammensetning. Dette vil være kostbart og vil sannsynligvis bare være aktuelt i de tilfeller konvensjonelle vaskemidler ikke klarer å fjerne biofilm eller på utstyr som ikke tåler de klorholdige vaskemidlene.

I forsøk viste ulike stafylokokker å ha varierende grad av biofilmdannelse. Dette kan tyde på at en rekke faktorer i miljøet spiller inn på biofilmdannelsen og/eller at egenskaper ved overflaten på både festematerialet og bakterien kan spille inn på biofilmproduksjonen.

Ulike stammer viste variasjoner i toleranse overfor desinfeksjonsmidlet benzalkonium klorid. Årsaken til denne variasjonen er fortsatt uklar, da hverken *qac*-gen eller sammensetning av matriks kunne forklare forskjellen i toleranse. Dermed ser det ut som det er flere faktorer som har betydning for enkelte stafylokokkers resistens overfor kvartære ammoniumforbindelser.

At det eksisterer toleranse overfor kvartære ammoniumforbindelser hos mange arter/stammer av *Staphylococcus* og at ulike enzymer har vist seg å ha en oppløsende effekt på biofilm produsert av stafylokokker, er viktig kunnskap i utarbeidelse av bedre metoder for bekjempelse av stafylokokker og deres biofilmer i næringsmiddelindustrien.

7 Forslag til videre arbeid

Etter endt oppgave står fortsatt mange ubesvarte spørsmål igjen. For å komme enda nærmere bekjempelse av biofilm kan det forskes videre på følgende spennende felt;

- Eksponere flere arter/stammer av *Staphylococcus* og muligens andre bakterier for enzymer rettet mot matrikskomponenter.
- Analysere den kjemiske sammensetningen av biofilm-matriks til stammer med ulik enzymrespons.
- Undersøke hvilken enzymkonsentrasjon som må til for å oppnå effekt.
- Dyrke biofilm på ulike materialer under ulike betingelser.
- Undersøke en mulig rolle av eDNA i nye og eldre biofilmer, og se om eDNA er mer fremtredende i visse typer biofilm-matriks (polysakkarid vs. protein).
- Undersøke biofilmdannelse og effekt av enzymer under andre forhold (temperatur og vekstmedium).
- Teste bruk av enzymer som vaskemidler på stålkuponger.
- Teste flere stammer med ulik enzymrespons for toleranse overfor kvartære ammoniumforbindelser, for å undersøke mekanismer bak toleransen.
- Undersøke relevansen av *qacA* i toleransen overfor benzalkoniumklorid i biofilm og suspensjon, ved å klonе *qacA* i *Staphylococcus cohnii* MF1844 og fjerne genet i *Staphylococcus capitis* MF1872.

8 Referanser

- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D. & Camper, A. K. (2011). Comparing the Chlorine Disinfection of Detached Biofilm Clusters with Those of Sessile Biofilms and Planktonic Cells in Single- and Dual-Species Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (20): 7176-7184.
- Boles, B. R. & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*, 19 (9): 449-455.
- Cabeca, T. K., Pizzolitto, A. C. & Pizzolitto, E. L. (2012). ACTIVITY OF DISINFECTANTS AGAINST FOODBORNE PATHOGENS IN SUSPENSION AND ADHERED TO STAINLESS STEEL SURFACES. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (3): 1112-1119.
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. B. & Jabbouri, S. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (1): 125-132.
- Chiweshe, A. & Crews, P. C. (2000). Influence of household fabric softeners and laundry enzymes on filling and breaking strength. *Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter*, 32 (9): 41-47.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. & Beachey, E. H. (1985). ADHERENCE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI TO PLASTIC TISSUE-CULTURE PLATES - A QUANTITATIVE MODEL FOR THE ADHERENCE OF STAPHYLOCOCCI TO MEDICAL DEVICES. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (6): 996-1006.
- Cloete, E., Molobela, I., Van Der Merwe, A. & Richards, M. (2009). Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. I: *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 3-31. Cambridge: Woodhead.
- Comlekcioglu, U., Tutus, A., Cicekler, M., Gunes, M. & Aygan, A. (2014). Application of recombinant xylanase from *Orpinomyces* sp in elemental chlorine-free bleaching of kraft pulps. *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (1): 8941-8950.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. & Gotz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, 67 (10): 5427-5433.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, I. L. & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183 (9): 2888-2896.

- Darwish, S. F. & Asfour, H. A. E. (2013). Investigation of Biofilm Forming Ability in Staphylococci Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *Scientific World Journal*.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (8): 1387-1392.
- Flemming, H. C. (1998). Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer Degradation and Stability*, 59 (1-3): 309-315.
- Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flaegstad, T. & Sollid, J. E. (2009). Biofilm Formation by Staphylococcus haemolyticus. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (4): 1172-1180.
- Garza-Gonzalez, E., Morfin-Otero, R., Martinez-Vazquez, M. A., Gonzalez-Diaz, E., Gonzalez-Santiago, O. & Rodriguez-Noriega, E. (2011). Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of Staphylococcus cohnii, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus sciuri. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 43 (11-12): 930-936.
- Gilan, I. & Sivan, A. (2013a). Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete Rhodococcus ruber C208. *Fems Microbiology Letters*, 342 (1): 18-23.
- Gilan, I. & Sivan, A. (2013b). Extracellular DNA Plays an Important Structural Role in the Biofilm of the Plastic Degrading Actinomycete Rhodococcus ruber. *Advances in microbiology*: 543-551.
- Gotz, F., Bannerman, T. & Schleifer, K. H. (2006). *The Genera Staphylococcus and Micrococcus*. Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol 4, Third Edition: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 5-75 s.
- Granum, P. E. (2008). *Industrielt renhold*. Oslo SN - 978-82-7725-147-9: Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi, Norges veterinærhøgskole. 48 s.
- Gross, M., Cramton, S. E., Gotz, 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.
- HACH. *Chlorine chemistry*. Tilgjengelig fra: <http://www.hach.com/DisinfectionSeries02> (lest 06.05.2014).
- Hagesæther, E. L. (1986). Næringsmiddelhygiene. I: *Næringsmiddelhygiene*, s. 35-56. Oslo: Yrkeslitteratur as.
- Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. L. (1995). RESISTANCE TO QUATERNARY AMMONIUM-COMPOUNDS IN STAPHYLOCOCCUS SPP ISOLATED FROM

THE FOOD-INDUSTRY AND NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF THE RESISTANCE PLASMID PST827. *Journal of Applied Bacteriology*, 79 (2): 149-156.

- Heir, E. (1998). *Quaternary ammonium compound resistance genes in staphylococci from the food industry*. Ås.
- Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. L. (1998). The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *Fems Microbiology Letters*, 163 (1): 49-56.
- Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. L. (1999a). Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 48 (3): 211-219.
- Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. L. (1999b). The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (3): 378-388.
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B. J., Preston, J. F. & Romeo, T. (2005). Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187 (1): 382-387.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. & Kaplan, J. B. (2008). 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.
- Jaglic, Z. & Cervinkova, D. (2012). Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role: a review. *Veterinarni Medicina*, 57 (6): 275-281.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S. (2006). Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *Fems Microbiology Letters*, 255 (1): 11-16.
- Koller, S., Huber, H., Cernela, N., Stephan, R. & Zweifel, C. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus lentus* strains isolated from chicken carcasses and employees of a poultry abattoir. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 62 (4): 136-140.
- Korber, D. R., Mangalappalli-Illathu, A. K. & Vidovic, S. (2009). Biofilm formation by food spoilage microorganisms in food processing environments. I: *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 169-192. Cambridge: Woodhead.
- Langsrud, S. (2009). Biofilm formation by Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus* spp. in food processing environments. I: *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 250-264. Cambridge: Woodhead.

- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R. & Lasa, I. (2006). Biofilm-associated protein. *C. R. Biologies*, 329 (11): 849–857.
- Ledsaak, O. E. (2013). *Hemming og frigjøring av biofilmer for Staphylococcus spp. - med vekt på produksjonsmiljø for mat*. Ås: Nofima. Upublisert manuskript.
- Loes, A. N., Ruyle, L., Arvizu, M., Gresko, K. E., Wilson, A. L. & Deutch, C. E. (2014). Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 58 (1): 31-41.
- Mazal, C. & Sieger, B. (2010). *Staphylococcus lentus*: The troublemaker. *International Journal of Infectious Diseases*, 14: E397-E397.
- McDonnell, G. & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1): 147-+.
- 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 (1): 39-50.
- Moretro, 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.
- Myszka, K. & Czaczyk, K. (2011). Bacterial biofilms on food contact surfaces. *Polish journal of food and nutrition science*, 61 (3): 173-180.
- Nam, Y. D., Chung, W. H., Seo, M. J., Lim, S. I. & Yi, S. H. (2012). Genome Sequence of *Staphylococcus lentus* F1142, a Strain Isolated from Korean Soybean Paste. *Journal of Bacteriology*, 194 (21): 5987-5987.
- Norwood, D. E. & Gilmour, A. (1999). Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (4): 576-582.
- O'Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Fems Microbiology Letters*, 270 (2): 179-188.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Bacterial Biofilms*, 322: 207-228.
- Papa, R., Parrilli, E., Sannino, F., Barbato, G., Tutino, M. L., Artini, M. & Selan, L. (2013). Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Research in Microbiology*, 164 (5): 450-456.
- Peña, S. T. (2010). Biofilms and their impact on food industry. *VISAVET Outreach Journal*.

- Piessens, V., De Vliegher, S., Verbist, B., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M. & Van Coillie, E. (2012). Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *Journal of Dairy Science*, 95 (12): 7027-7038.
- Potter, A., Ceotto, H., Giambiagi-DeMarval, M., dos Santos, K. R. N., Nes, I. F. & Bastos, M. D. D. (2009). The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. *Journal of Microbiology*, 47 (3): 319-326.
- Qin, N., Ding, W. C., Yao, J., Su, K. K., Wu, L. J. & Li, L. J. (2012). Genome Sequence of *Staphylococcus capitis* QN1, Which Causes Infective Endocarditis. *Journal of Bacteriology*, 194 (16): 4469-4470.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K. M., 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.
- Rohde, H., Frankenberger, S., Zahringer, U. & Mack, D. (2010). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*, 89 (1): 103-111.
- Rørvik, L. M. & Granum, P. (2007). *Staphylococcus aureus*. I: *Matforgiftning: næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, s. 235-245. Kristiansand: Høyskoleforl.
- Schwach, T. S. & Zottola, E. A. (1984). SCANNING ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY ON SOME EFFECTS OF SODIUM-HYPOCHLORITE ON ATTACHMENT OF BACTERIA TO STAINLESS-STEEL. *Journal of Food Protection*, 47 (10): 756-759.
- Sen, S., Dasu, V. V., Mandal, B. & Rajendran, K. (2014). Enzymatic removal of burnt-on protein residues from solid surface: A potential food equipment cleanser. *Food Control*, 40: 314-319.
- Sousa, C., Henriques, M., Teixeira, P. & Oliveira, R. (2009). Relevance of Cell Wall and Extracellular Matrix Proteins to *Staphylococcus Epidermidis* Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 23 (12): 1657-1671.
- Srey, S., Jahid, I. K. & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31 (2): 572-585.
- Stainless Processing, I. *Austenitic grades*. Tilgjengelig fra: <http://www.spiusa.com/Ref001/austenitic.html> (lest 09.05.2014).

- Stanga, M. (2010). *Sanitation: cleaning and disinfection in the food industry*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Sundheim, G., Hagtvedt, T. & Dainty, R. (1992). RESISTANCE OF MEAT ASSOCIATED STAPHYLOCOCCI TO A QUARternary AMMONIUM COMPOUND. *Food Microbiology*, 9 (2): 161-167.
- Sundheim, G., Langsrud, S., Heir, E. & Holck, A. L. (1998). Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41 (3-4): 235-239.
- Sundheim, G. & Dyrnes, U. (1999). *Renhold i næringsmiddelindustrien*. Ås: Matforsk. 104 s.
- Temiz, M., Duran, N., Duran, G. G., Eryilmaz, N. & Jenedi, K. (2014). Relationship between the resistance genes to quaternary ammonium compounds and antibiotic resistance in staphylococci isolated from surgical site infections. *Medical Science Monitor*, 20: 544-550.
- Tormo, M. A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, M. & Penades, J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology-Sgm*, 151: 2465-2475.
- Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penades, J. R. & Lasa, I. (2012). Bap, a Biofilm Matrix Protein of Staphylococcus aureus Prevents Cellular Internalization through Binding to GP96 Host Receptor. *Plos Pathogens*, 8 (8).
- Van Houdt, R. & Michiels, C. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (4): 1117-1131.
- Vazquez-Sanchez, D., Cabo, M. L., Ibusquiza, P. S. & Rodriguez-Herrera, J. J. (2014). Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of Staphylococcus aureus isolated from fishery products. *Food Control*, 39: 8-16.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. A., Fischer, E. R. & Otto, M. (2003). Quorum-sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermidis. *Journal of Infectious Diseases*, 188 (5): 706-718.
- Wang, X., Preston, J. F. & Romeo, T. (2004). The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186 (9): 2724-2734.
- www.bacterio.net. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. Tilgjengelig fra: <http://www.bacterio.net/> (lest 08.05.2014).
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F. & Hacker, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating

insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology*, 32 (2): 345-356

9 Vedleggsliste

Vedlegg 1 Tillaging av medier

Vedlegg 2 Løsninger benyttet som løsningsmiddel for kjemiske stoffer benyttet i forsøk 1

Vedlegg 3 Rådata fra forsøkene

Vedlegg 4 Bilder av stålkuponger behandlet med 200 ppm BC

Vedlegg 5 Statistiske beregninger fra MiniTab

Vedlegg 1: Tillaging av medier

Agar/buljong	Medie	Fork.	Tillaging	Oppbevaring
Agar	Tryptone Soya Agar	TSA	40 g TSA løses i 1 liter destillert vann, etterfulgt av 15 min autoklaving ved 121 °C	4 °C
	Tryptone Soya Broth	TSB	30 g TSB løses i 1 liter destillert vann, etterfulgt av 15 min autoklaving ved 121 °C.	Romtemp.
Buljong	Tryptone Soya Broth + 0,26 % NaCl + 0,33 % glukose	TSBNG	12 g TSB + 1,04 g NaCl + 1,32 g glukose løses i 400 ml destillert vann, etterfulgt av 15 min autoklaving ved 121 °C	Romtemp.
	Difco™ D/E Neutralizing Broth	D/E Broth	39 g D/E broth løses i 1 liter destillert vann, etterfulgt av 15 min autoklaving ved 121 °C	4 °C

Vedlegg 2: Løsninger benyttet som løsningsmiddel for kjemiske stoffer benyttet i forsøk 1

Løsning nr.	Antall ml løsning tilberedt	Innhold løsning
1	10	40 mM NaIO ₄ (natriumperiodate/natriummetaperiodate) løst i dH ₂ O
2	100	20 mM Tris HCl* (pH 7,5) med 100 mM NaCl
3	100	150 mM NaCl + 1 mM CaCl ₂
4	400	Phosphate Buffered Saline (PBS) løst i dH ₂ O

*Tris HCl lages ved å lage en 1 molarløsning av Trizma base, justere pH med HCl til ønsket pH, for deretter å etterfylle med vann til ønsket mengde.

Trizma base og CaCl₂ er fra Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA.

PS: Målene indikerer hvor mye som ble tillaget av hver løsning, ikke hvor mye som ble benyttet som løsningsmiddel til stamløsningene.

Stamløsninger for nedbrytning av biofilm i mikrotiterbrett

Stamløsning	Konsentrasjon	Løsningsmiddel
Dispersin B	50 µg/ml	Løsning 4
Proteinase K	100 µg/ml	Løsning 2
Trypsin	100 µg/ml	Løsning 2
DNase	100 µg/ml	Løsning 3
NaIO ₄	40 mM	Løsning 1
Hypokloritt (pH 12)*	0,03 %	dH ₂ O

*Hypokloritt ble justert til pH 12 ved tilsetning av NaOH. Se tillaging av hypoklorittløsning for fremgangsmåte.

Tillaging hypoklorittløsning: en uåpnet flaske med klorin (Lilleborg) ble benyttet som hypoklorittløsning. Konsentrasjonen på ren klorin ligger på 44 000 µg/ml = 4,4 % (pH 12,5). I dette forsøket ble det benyttet en konsentrasjon på 0,03 % hypokloritt = 300 µg/ml (pH 12). For å oppnå riktig pH-verdi ble følgende fremgangsmåte benyttet:

- Det ble laget en stokkløsning på rundt 0,06 % i dH₂O
- pH ble justert til rundt 12,1 ved tilsetning av NaOH
- Det ble tilsatt ytterligere med vann for å oppnå en endelig konsentrasjon på 0,03 %
- pH på løsning ble målt. Denne skulle ligge på rundt 12 i en 0,03 % løsning. Hvis dette ikke var tilfellet måtte det lages en ny løsning med justert NaOH tilsetning.

Vedlegg 3 Rådata fra forsøkene

	Løsnings middel	Stamme								
		MF 1872	MF 1890	MF 2601	MF 1844	MF 1871	MF 1789	MF 3675	MF 3714	MF 1904
Gjentak 1	Dispersin	0,0177	0,0056	0,0797	0,6564	0,02407	0,0727	0,0504	0,0141	-0,0189
	PBS	0,6998	0,9038	1,7958	1,181	0,3924	0,4298	0,1142	0,0392	-0,0114
	Proteinase	0,5447	0,6337	2,1427	0,0307	0,3921	0,2781	0,4554	0,0377	-0,0176
	Trypsin	0,6117	0,9407	2,3251	0,0484	0,4081	0,4841	0,1034	0,0327	-0,0149
	DNase	0,8014	0,9124	2,0924	0,7734	0,5597	0,4014	0,0737	0,0191	-0,0166
	NaIO4*	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Klorin	0,0574	0,0614	0,03306	0,0447	0,1017	0,0271	0,0481	0,0344	-0,00127

	Løsnings middel	Stamme								
		MF 1872	MF 1890	MF 2601	MF 1844	MF 1871	MF 1789	MF 3675	MF 1904	
Gjentak 2	Dispersin	0,0333	0,0323	0,1866	1,0279	0,1159	0,0746	0,0403	0,0183	
	PBS	0,4712	0,469	2,0146	1,0504	0,3754	0,1464	0,093	0,0296	
	Proteinase	0,4276	0,5399	2,3893	0,0123	0,4903	0,2036	0,1259	0,0206	
	Trypsin	0,4173	0,4989	2,4309	0,0096	0,5189	0,2389	0,1333	0,0119	
	DNase	0,5423	0,5906	2,1143	0,6113	0,6016	0,2409	0,1536	0,0453	
	NaIO4	0,6063	0,6903	0,9303	0,7386	0,8753	0,3646	0,2349	0,0989	
	Klorin	0,0456	0,0269	0,0319	0,0216	0,0476	0,0646	0,0683	0,0873	

*NaIO4 ble kun benyttet ved gjentak 2

Sonnktert løsnng - kuponger overført til 6 ml Dey Engley Broth etter 5 min i desinfeksjonsløsning, etterfulgt av sonlkerng i 10 min

		Log cfu/ml																
		200 ppm BC						0.1 % Climax SU										
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak*	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak
MF1872	n.v.	7.1	7.6	7.49	7.34	7.71	4.73	n.v.	5.29	<1.3	<1.3	<1.3	7.57	n.v.	7.85	7.53	7.41	7.71
MF1844	n.v.	3.89	1.6	4.92	2.99	2	n.v.	1.6	<1.3	<1.3	<1.3	<1.3	n.v.	6.1	6.84	6.96	6.68	6.8

* 0.2 % Climax SU

		Log cfu/kupong																
		200 ppm BC						0.1 % Climax SU										
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak
MF1872	n.v.	7.88	8.37	8.27	8.12	8.49	5.51	n.v.	6.17	<2.08	<2.08	<2.08	8.35	n.v.	8.64	8.31	8.18	8.48
MF1844	n.v.	4.67	2.38	5.69	3.77	2.77	n.v.	2.38	<2.08	<2.08	<2.08	<2.08	n.v.	6.87	7.61	7.74	7.46	7.58

n.v. = no value

Suspensjonsløsning - 6ml desinfeksjonsløsning blandet med 34 ml Dey Engley Broth

		Log cfu/ml																
		200 ppm BC						0.1 % Climax SU										
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak*	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak
MF1872	n.v.	4.91	6.08	5.21	5.02	4.98	2.62	n.v.	<1.3	<1.3	<1.3	<1.3	2.15	n.v.	6.42	6.4	5.72	5.83
MF1844	n.v.	3.05	3	2.49	2.4	1.95	n.v.	<1.3	<1.3	<1.3	<1.3	<1.3	n.v.	5.59	5.33	5.59	6.37	5.77

		Log cfu/40 ml																
		200 ppm BC						0.1 % Climax SU										
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak*	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	4. gjentak	5. gjentak	6. gjentak
MF1872	n.v.	7.1	6.51	6.82	5.8	6.58	4.23	n.v.	<2.9	<2.9	<2.9	<2.9	3.75	n.v.	8.03	8	6.49	7.43
MF1844	n.v.	4.66	4.6	4.09	4	3.56	n.v.	<2.9	<2.9	<2.9	<2.9	<2.9	n.v.	7.19	6.93	7.19	7.2	7.37

n.v. = no value

Desinfeksjonsforsøk med 200 ppm BC - 4 stammer Sonikert løsning

Log cfu/ml						
	200 ppm BC			Kontroll - dH2O		
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1.gjentak	2. gjentak	3. gjentak
MF1862	5,05	7,64		5,78	8,14	
MF1871	7,38	7,98	7,78	8,18	8,01	8,12
MF2051	7,03	7,76	7,45	7,41	7,64	7,61
MF2052	7,68	7,88	7,5	7,49	7,81	7,6

Log cfu/kupong						
	200 ppm BC			Kontroll - dH2O		
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1.gjentak	2. gjentak	3. gjentak
MF1862	5,82	8,42		6,56	8,92	
MF1871	8,16	8,76	8,56	8,96	8,79	8,9
MF2051	7,81	8,54	8,23	8,19	8,42	8,38
MF2052	8,45	8,66	8,28	8,27	8,59	8,38

Suspensjonsløsning - 4 stammer

Log cfu/ml						
	200 ppm BC			Kontroll - dH2O		
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1.gjentak	2. gjentak	3. gjentak
MF1862	3,05	2,17		5,36	4,82	
MF1871	3,96	4,13	4,22	6,89	6,8	6,52
MF2051	6,1	5,97	6,02	6,46	6,51	6,75
MF2052	6,79	6,61	6,56	6,98	6,89	6,71

Log cfu/40 ml						
	200 ppm BC			Kontroll - dH2O		
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1.gjentak	2. gjentak	3. gjentak
MF1862	4,65	3,78		6,96	6,43	
MF1871	5,56	5,73	5,82	8,49	8,4	8,13
MF2051	7,7	7,57	7,62	8,06	8,11	8,35
MF2052	8,39	8,21	8,17	8,58	8,49	8,31

Suspensjonstest; 10 ppm og 30 ppm BC på MF1844 og MF1872 (200 ppm BC på MF1872)

Log cfu/ml										
	10 ppm BC			30 ppm BC			dH ₂ O - Kontroll			200 ppm BC
Stamme	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1. gjentak	2. gjentak	3. gjentak	1. gjentak
MF1844	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3	6,08	6,03	6,04	
MF1872	5,72	5,08	4,73	5,08	4,12	3,63	5,86	5,42	5,44	<1,3

Vedlegg 4 Bilder av stålkuponger behandlet med 200 ppm BC



Figur 3 Mikroskopering av biofilm, fra stamme MF1844, på stålkupong. Bildene viser en stålkupong behandlet med 200 ppm BC, etterfulgt av sonikering.



Figur 4 Mikroskopering av biofilm, fra stamme MF1872, på stålkupong. Bildene viser en stålkupong behandlet med 200 ppm BC, etterfulgt av sonikering.

Vedlegg 5 Statistiske beregninger fra MiniTab

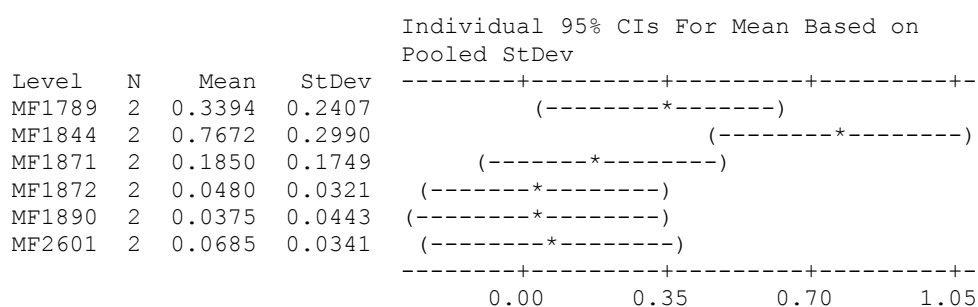
Forsøk 1 – Oppløsning av biofilm i mikrotiterbrett

Er det forskjeller mellom stammenes biofilm i toleranse overfor dispersin?

One-way ANOVA: Dispersin versus Stamme_Dispersin

Source	DF	SS	MS	F	P
Stamme_Dispersin	5	0.7962	0.1592	5.25	0.034
Error	6	0.1821	0.0303		
Total	11	0.9783			

S = 0.1742 R-Sq = 81.39% R-Sq(adj) = 65.88%



Pooled StDev = 0.1742

Grouping Information Using Tukey Method

Stamme_Dispersin	N	Mean	Grouping
MF1844	2	0.7672	A
MF1789	2	0.3394	A B
MF1871	2	0.1850	A B
MF2601	2	0.0685	B
MF1872	2	0.0480	B
MF1890	2	0.0375	B

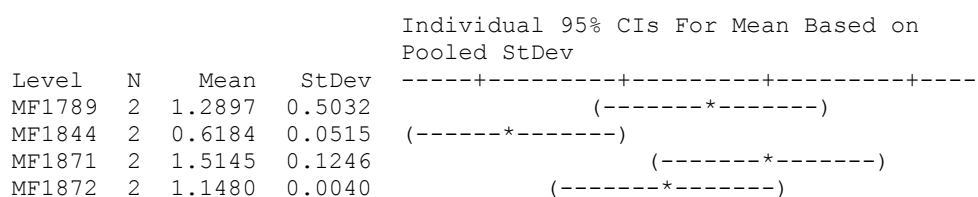
Means that do not share a letter are significantly different.

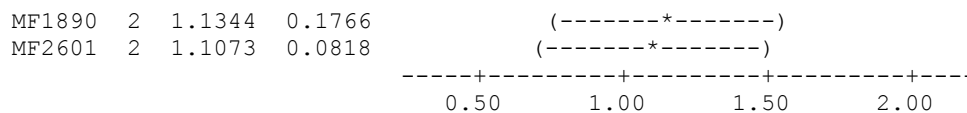
Er det forskjeller mellom stammenes biofilm i toleranse overfor DNase?

One-way ANOVA: DNase versus Stamme

Source	DF	SS	MS	F	P
Stamme_Dispersin	5	0.8714	0.1743	3.38	0.085
Error	6	0.3092	0.0515		
Total	11	1.1807			

S = 0.2270 R-Sq = 73.81% R-Sq(adj) = 51.98%





Pooled StDev = 0.2270

Grouping Information Using Tukey Method

Stamme_Dispersin	N	Mean	Grouping
MF1871	2	1.5145	A
MF1789	2	1.2897	A
MF1872	2	1.1480	A
MF1890	2	1.1344	A
MF2601	2	1.1073	A
MF1844	2	0.6184	A

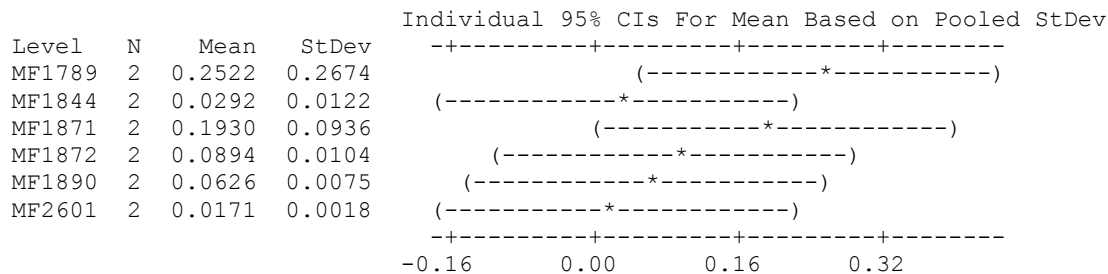
Means that do not share a letter are significantly different.

Er det forskjeller mellom stammenes biofilm i toleranse overfor klorin?

One-way ANOVA: Klor versus Stamme

Source	DF	SS	MS	F	P
Stamme_Dispersin	5	0.0897	0.0179	1.34	0.363
Error	6	0.0806	0.0134		
Total	11	0.1703			

S = 0.1159 R-Sq = 52.68% R-Sq(adj) = 13.25%



Pooled StDev = 0.1159

Grouping Information Using Tukey Method

Stamme_Dispersin	N	Mean	Grouping
MF1789	2	0.2522	A
MF1871	2	0.1930	A
MF1872	2	0.0894	A
MF1890	2	0.0626	A
MF1844	2	0.0292	A
MF2601	2	0.0171	A

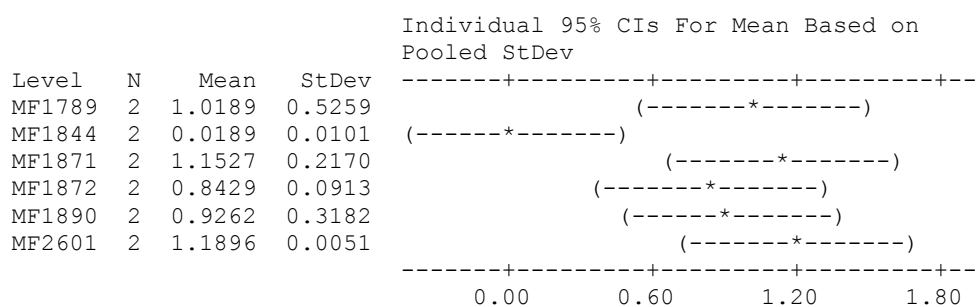
Means that do not share a letter are significantly different.

Er det forskjeller mellom stammenes biofilm i toleranse overfor proteinase?

One-way ANOVA: proteinase versus Stamme

Source	DF	SS	MS	F	P
Stamme_Dispersin	5	1.8634	0.3727	5.16	0.035
Error	6	0.4333	0.0722		
Total	11	2.2967			

S = 0.2687 R-Sq = 81.13% R-Sq(adj) = 65.41%



Pooled StDev = 0.2687

Grouping Information Using Tukey Method

Stamme_Dispersin	N	Mean	Grouping
MF2601	2	1.1896	A
MF1871	2	1.1527	A
MF1789	2	1.0189	A B
MF1890	2	0.9262	A B
MF1872	2	0.8429	A B
MF1844	2	0.0189	B

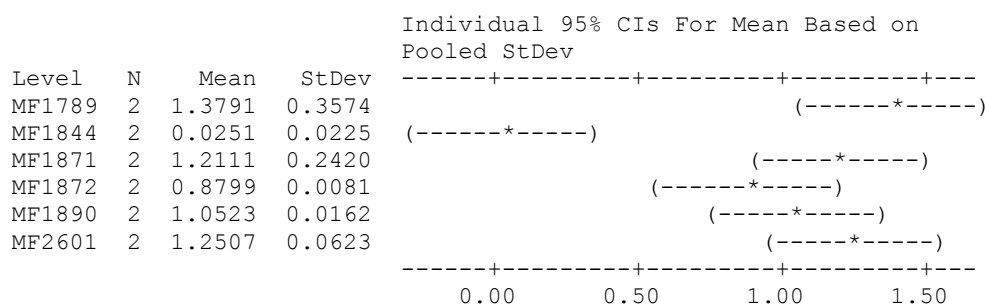
Means that do not share a letter are significantly different.

Er det forskjeller mellom stammenes biofilm i toleranse overfor trypsin?

One-way ANOVA: trypsin versus Stamme

Source	DF	SS	MS	F	P
Stamme_Dispersin	5	2.4240	0.4848	15.23	0.002
Error	6	0.1910	0.0318		
Total	11	2.6151			

S = 0.1784 R-Sq = 92.69% R-Sq(adj) = 86.61%



Pooled StDev = 0.1784

Grouping Information Using Tukey Method

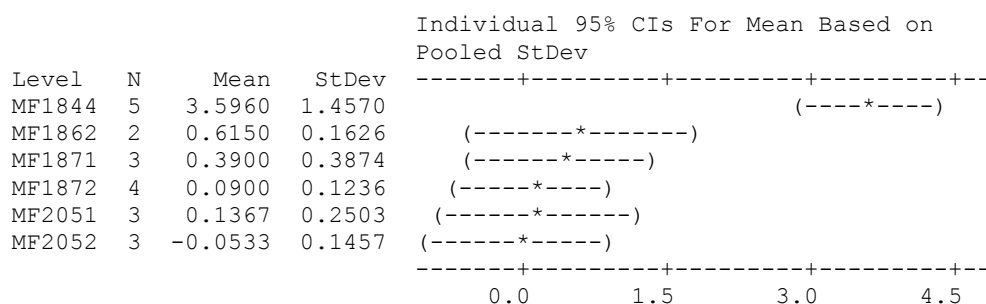
Stamme_Dispersin	N	Mean	Grouping
MF1789	2	1.3791	A
MF2601	2	1.2507	A
MF1871	2	1.2111	A
MF1890	2	1.0523	A
MF1872	2	0.8799	A
MF1844	2	0.0251	B

*Forsøk 2 – Desinfeksjons av biofilm på stål***Sammenlikning av ulike stammer - drap av bakterier i biofilm med 200 ppm BC**

One-way ANOVA: Drap biofilm versus Bakterie

Source	DF	SS	MS	F	P
Bakterie	5	43.937	8.787	13.62	0.000
Error	14	9.032	0.645		
Total	19	52.968			

S = 0.8032 R-Sq = 82.95% R-Sq(adj) = 76.86%



Pooled StDev = 0.8032

Grouping Information Using Tukey Method

Bakterie	N	Mean	Grouping
MF1844	5	3.5960	A
MF1862	2	0.6150	B
MF1871	3	0.3900	B
MF2051	3	0.1367	B
MF1872	4	0.0900	B
MF2052	3	-0.0533	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Er det forskjell mellom MF2051 og MF2052 i toleranse overfor 200 ppm BC

Results for: Drap 200 ppm BC biofilm

Paired T-Test and CI: 2051; 2052

Paired T for 2051 - 2052

N	Mean	StDev	SE Mean
---	------	-------	---------

2051	3	0.137	0.250	0.144
2052	3	-0.053	0.146	0.084
Difference	3	0.190	0.333	0.192

95% CI for mean difference: (-0.637; 1.017)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 0.99 P-Value = 0.427

Forsøk 3 – Suspensjonstest med BC

Har MF1872 lavere drap enn log 4.5?

One-Sample T: 10 ppm

Test of mu = 4.5 vs < 4.5

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Upper Bound	T	P
10 ppm	3	0.397	0.289	0.167	0.884	-24.58	0.001

One-Sample T: 30 ppm

Test of mu = 4.5 vs < 4.5

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Upper Bound	T	P
30 ppm	3	1.297	0.515	0.297	2.165	-10.77	0.004

Er drapet signifikant større ved 30 ppm sammenlignet med 10 ppm?

Paired T-Test and CI: 30 ppm; 10 ppm

Paired T for 30 ppm - 10 ppm

	N	Mean	StDev	SE Mean
30 ppm	3	1.297	0.515	0.297
10 ppm	3	0.397	0.289	0.167
Difference	3	0.900	0.236	0.136

95% CI for mean difference: (0.314; 1.486)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 6.61 P-Value = 0.022



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no