



Forord

Denne oppgaven ble utført innen matvitenskap ved Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Oppgaven utgjør 30 studiepoeng, og ble gjennomført i løpet av perioden januar-mai 2015.

Jeg ville ha en masteroppgave som engasjerte meg, og som samtidig gjorde at jeg kunne benytte meg av alt jeg har lært i løpet av årene på matvitenskap. Dermed falt valget lett på en oppgave innen meieriteknologi. Tilfeldigheter, men også entusiasmen til hovedveilederen min Judith Narvhus, vinklet meg inn mot arbeidet med å undersøke den myteomspunne sammenhengen mellom tettegras og tettemelk. Jeg vil derfor takke Judith for hennes entusiasme og for alle de gode faglige samtalene. Jeg vil også takke min andre veileder, Davide Porcellato, for god hjelp med det praktiske arbeidet og for at du alltid tok deg tid til å svare på mine mange spørsmål. Ikke minst vil jeg takke dere begge for et veldig hyggelig samarbeid. Jeg vil også takke alle dere som hjalp meg på laboratoriet. Dere gjorde hverdagen min mye lettere, og også mye hyggeligere. Til slutt vil jeg takke TINE for økonomisk støtte.

Ås, mai 2015

Sammendrag

Tettemelk er et tradisjonelt syrnet melkeprodukt i Norge, med en karakteristisk trådtrekkende og tyktflytende konsistens. I dag omsettes dette produktet i dagligvarebutikkene som Tjukkmjølk, produsert av Rørosmeieriet. Det er vist at produksjon av eksopolysakkarider (EPS) er årsaken til denne spesielle konsistensen, og i tettekulturen er det stammer av *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* som produserer EPS. Hvordan denne melkesyrebakterien har blitt en del av den tradisjonelle tettekulturen er uklart. Tradisjonen forteller at tettegras har vært en viktig komponent i utviklingen av tettemelk, og at tettemelk ble dannet ved å inokulere melk med blader fra tettegras. Dette gir grunn til å tro at EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* kan befinne seg på denne planten, og at det dermed er tilsetning av tettegras i melk som har gitt opphav til dette spesielle produktet.

Fokuset i denne oppgaven var å påvise en eventuell sammenheng mellom tettegras og tettemelk. Tradisjonelle mikrobiologiske og moderne molekylære metoder er tatt i bruk for å forsøke å finne EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* direkte på tettegras. Begge metodene viste tegn på at tettegras har en kompleks mikrobiota.

Mikrobiologiske metoder i form av utspredning av plantemateriale på næringsagar, resulterte i mangfoldig vekst. 13 av de totalt 78 koloniene som ble rendyrket ble identifisert ved sekvensering, men ingen av disse var *L. lactis* subsp. *cremoris*.

De molekylære metodene viste alle tegn på at laktokokker kan befinne seg på tettegras. DNA fra tettegras ble amplifisert i polymerasekjedereaksjonen (PCR) med egenkonstruerte EPS-primersett, som amplifiserte EPS-operonet til laktokokker. PCR-produkt ble påvist ved gelelektroforese i 19 og 21 av totalt 22 prøver med henholdsvis primersett 2 og 3. Amplifisert EPS-operon i DNA fra 13 av de totalt 22 prøvene ble identifisert som EPS-produserende laktokokker eller *L. lactis* subsp. *cremoris*.

ARISA viste tegn til en kompleks mikrobiota på tettegras, og det ble oppdaget at antallet ulike mikroorganismer på tettegras fra ulike steder i landet varierte fra 11 til 35. ARISA-profilene viste at DNA fra alle prøvene dannet en topp med ITS-lengde 580, en topp som kan tilsvare laktokokker. Denne toppen var dominerende i profilene til alle de 22 prøvene, og i profilene til renkulturene med EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris*, *ARI*, *BF2* og *Tett*. ARISA viste også få signifikante forskjeller i mikrobiotaen til blader fra ulike steder, noe som kan tyde på at denne planten har en særegen mikrobiota uavhengig av geografisk opprinnelse.

Abstract

Tettemelk is a traditional Norwegian fermented milk product, with a characteristic ropy and viscous consistency. It has been shown that the production of exopolysaccharides (EPS) by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* is responsible for this special consistency in tettemelk. How this lactic acid bacteria have become part of the traditional starter culture is unclear. Folk tales tells that butterwort has been an important component in the development of tettemelk, and that ropy milk was first produced by inoculating milk with leaves from butterwort. This gives reason to believe that the EPS-producing *L. lactis* subsp. *cremoris* can exist as a part of this plant's microbiota, and that addition of butterwort to milk has given rise to this particular product.

The focus of this thesis was to study the possible correlation between butterwort and tettemelk. Traditional microbiological and modern molecular methods was used to try to find EPS-producing *L. lactis* subsp. *cremoris* directly on butterwort. Both methods showed signs that butterwort has a complex microbiota.

The use of microbiological methods, where plant material were spread on agar plates, resulted in diversified growth. A total of 78 colonies were selected for cultivation. 13 of the these were identified by sequencing, but none of them was *L. lactis* subsp. *cremoris*.

The molecular methods all showed signs that lactococci may be a part of the micobiota of butterwort. DNA from butterwort was amplified in the polymerase chain reaction (PCR) with special EPS primers which amplifies the EPS operon of lactococci. In a total of 22 samples PCR product was detected by gel electrophoresis in 19 and 21 of the samples by the use of primer sets 2 and 3 respectively. The amplified EPS operon from 13 of the 22 samples were identified as EPS producing lactococci or *L. lactis* subsp. *cremoris*.

ARISA showed signs of a complex microbiota on butterwort, and it was discovered that the number of different microorganisms on butterwort from various places in the country ranged from 11 to 35. The ARISA profiles showed that DNA from all the samples formed a peak with ITS length 580, a length that can possibly correspond to lactococci. This peak was dominant in the profiles of all the 22 samples, and in the profiles of the pure cultures of EPS-producing *L. lactis* subsp. *cremoris*, *ARI*, *BF2* and *Tett*. ARISA showed few significant differences in the microbiota of leaves from different places, which may indicate that this plant has a distinctive microbiota regardless of geographic origin.

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1. Melk.....	1
1.2. Melkesyrebakterier	1
1.3. Lactococcus lactis.....	2
1.4. Exopolysakkarider (EPS) produsert av melkesyrebakterier	3
1.5. Metoder for å fremme vekst av melkesyrebakterier	4
1.6. Fremstilling av syrnet melk	5
1.7. Tettegras	6
1.8. Tette melk.....	7
1.9. Metoder for identifisering av mikroorganismer	9
1.10. Polymerasekjedereaksjonen (PCR)	10
1.11. Gelelektroforese.....	11
1.12. ARISA	11
1.13. Hensikt.....	12
2. Materiale og metoder	13
2.1. Innsamling av prøver	13
2.2. Mikrobiologiske metoder	15
2.2.1. Tillaging av vekstmedium.....	15
2.2.2. Renkulturer	15
2.2.3. Undersøkelser av bakterier på tetteblader	15
2.3. Oppsamling av bakterieceller til molekylær analyse.....	16
2.3.1. Fra renkulturer	16
2.3.2. Fra bladprøver	17
2.4. Molekylære metoder.....	17
2.4.1. DNA-ekstraksjon	17
2.4.2. Konstruksjon av primere.....	18
2.4.3. Qubit Assay.....	19
2.4.4. Polymerasekjedereaksjonen (PCR).....	20
2.4.5. Gjennomføring av gelelektroforese	21
2.4.6. Rensing av PCR-produkt	22
2.4.7. Sekvensering	22
2.4.8. ARISA.....	22
3. Resultater.....	24
3.1. Resultater fra mikrobiologiske kulturavhengige undersøkelser	24

3.1.1. Undersøkelse av bakterievekst.....	24
3.1.2. Rendyrkede kulturer.....	25
3.2. Resultater fra molekylære kulturuavhengige undersøkelser.....	28
3.2.1. PCR med EPS-primersett.....	28
3.2.2. Sekvensering av PCR-produkter fra bladprøver	29
3.2.3. ARISA-resultater	31
3.3. Sammenligning av resultater	37
4. Diskusjon.....	40
4.1. EPS-produserende <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> på tettegras	41
4.2. Undersøkelse av mikrobiotaen på tettegras	45
5. Oppsummering	52
6. Fremtidig arbeid	53
7. Kilder.....	54

1. Introduksjon

1.1. Melk

Melk er en næringsrik råvare, som produseres av hunnpattedyr som næring til nyfødte. Komponentene i melk inkluderer vann, fett, proteiner, karbohydrater, mineraler, organiske syrer og andre spor-elementer. Fettet består hovedsakelig av triglyserider, i tillegg til noe mono- og diglyserider samt kolesterol, fosfolipider og frie fettsyrer. I melken er fettet fordelt i fettkuler, med hydrofobe triglyserider i kjernen og fosfolipidenes hydrofile hode på overflaten ut mot vannfasen. Proteinene i melk er kaseiner, myseproteiner og enzymer (Walstra et al. 2006a). Kasein utgjør fire femtedeler av den totale mengden protein, og eksisterer i melken som kaseinmiceller bestående av proteiner, vann og salter. De fire typene kaseinproteiner er α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein. Den nøyaktige strukturen til kaseinmicellen er uklar, men totalt sett befinner β -kasein seg hovedsakelig i kjernen av micellen mens κ -kasein befinner seg på overflaten. α -kasein er fordelt både i de innerste og ytterste lagene. C-terminalenden til κ -kasein har en hydrofil negativt ladd hale, og disse kaseinene danner dermed en hydrofil overflate mot vannfasen. Myseproteinene i melk er hydrofile proteiner som følgelig er løst i vannfasen i melken. Laktose er et disakkarid bestående av en glukose- og en galaktose-enhet, og dette sukkeret utgjør størstedelen av karbohydratene i melk (Walstra et al. 2006b).

1.2. Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier har lenge hatt stor betydning i matproduksjon, og fermentering ved hjelp av melkesyrebakterier har vært viktig for at maten skal få økt holdbarhet (Cavanagh et al. 2015). I dagens samfunn blir melkesyrefermentering benyttet over hele verden ved produksjon av mange ulike matvarer (Kleerebezem et al. 2002). Det er ikke lenger like nødvendig å produsere mat med lang holdbarhet, og melkesyrefermentering blir nå i større grad benyttet for å oppnå matvarer med endrede sensoriske og ernæringsmessige egenskaper. Melkesyrefermentering benyttes ved bearbeiding av flere ulike råvarer, slik som kjøtt og grønnsaker, men det er melkesyrefermentering av meieriprodukter som har blitt mest studert (Ruas-Madiedo et al. 2002a).

Gruppen med melkesyrebakterier inkluderer mange ulike arter, som alle deler noen felles egenskaper (Bolotin et al. 2001). Melkesyrebakterier er lufttolerante anaerobe, Gram-positive, ikke-sporedannende staver eller kokker, og de er katalase- og oksidase-negative (Adams & Moss 2008a). De danner energi ved fermentering av karbohydrater til melkesyre i matvaren, og i melk er laktose den største karbohydratkilden (Walstra et al. 2006c). Det er produksjonen

av melkesyre som er hovedårsaken til at fermenterte matvarer har forlenget holdbarhet, da redusert pH inhiberer vekst av andre mikroorganismer (Adams & Moss 2008a). Vekst av melkesyrebakterier i melk vil også føre til lavt redoks-potensial samt dannelse av ulike komponenter med inhiberende effekter, slik som etanol, hydrogenperoksid (H₂O₂) og i noen tilfeller antimikrobielle peptider kjent som bakteriosiner. Alle disse faktorene vil bidra til ulevelige forhold for mange patogene og kvalitetsødeleggende mikroorganismer (Walstra et al. 2006c).

Melkesyrebakteriene klassifiseres som homo- eller heterofermentative, avhengig av hvilken reaksjonsvei de benytter for å fermentere glukose. Homofermentative melkesyrebakterier benytter den glykolytiske reaksjonsveien, kjent som Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Adams & Moss 2008a), og ved ren homofermentering vil melkesyre være det eneste biproduktet som dannes. Homofermentative melkesyrebakterier danner to mol melkesyre og to mol ATP ved fermentering av ett mol glukose. Heterofermentative melkesyrebakterier benytter fosfoketolase-reaksjonsveien. Ved heterofermentering dannes det andre biprodukter i tillegg til melkesyre, slik som etanol/eddiksyre og karbondioksid (CO₂). Dette gir et lavere energiutbytte, og ved heterofermentering av ett mol glukose dannes det kun ett mol ATP (Walstra et al. 2006c).

1.3. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis er en homofermentativ melkesyrebakterie, som eksisterer i form av kokker i kjeder (Cavanagh et al. 2015). Denne melkesyrebakterien er ofte inkludert i mesofile DL-kulturer som benyttes ved produksjon av fermenterte meieriprodukter, slik som ost og rømme (Walstra et al. 2006c). *L. lactis* danner melkesyre i disse produktene, noe som resulterer i redusert pH, i tillegg til at de bidrar til nedbrytning av melkeproteiner. I de kommersielle syrekulturene finnes bestemte stammer av *L. lactis*, men det eksisterer også ville typer av denne organismen da den har evnen til å vokse i mange ulike miljøer. Stammer av *L. lactis* har blitt isolert fra planter, dyr og rå melk, og trolig har stammene som benyttes i dagens syrekulturer opprinnelse fra ville stammer fra planter. Disse ville stammene kan ha kommet i kontakt med melk via beite og fôr til kyrne eller via høyet som ble brukt til strø, og deretter kan de ha tilpasset seg til å vokse i melk (Cavanagh et al. 2015). *L. lactis* som benyttes i syrekulturer er godt tilpasset livet i melk, og er kjent for å vokse raskt i tillegg til å gi rask dannelse av melkesyre (Bolotin et al. 2001).

Tilpasningsdyktigheten til *L. lactis* kan skyldes at mange av genene til denne bakterien er lokalisert på plasmider. *L. lactis* har generelt sett små genomer, men de kan ha flere plasmider

som kan øke genom-størrelsen med opptil 200 kb. Genene på mange plasmider koder for egenskaper som kan gi konkurransefortrinn ved ulike vekstforhold. Det finnes flere underarter av *L. lactis*, og foreløpig er fire underarter blitt definert som *lactis*, *cremoris*, *hordniae* og *tractae*. Av disse er det de to førstnevnte som har størst betydning i meieri-sammenheng. Forskjellene mellom underartene *lactis* og *cremoris* er at sistnevnte ikke kan vokse ved 40°C eller i saltkonsentrasjoner på over 4% NaCl, i tillegg til at den ikke har evnen til å bryte ned aminosyren aginin eller til å danne γ -aminosmørsyre (GABA) (Cavanagh et al. 2015). Noen stammer av *L. lactis* subsp. *lactis* og *cremoris* har evnen til å danne eksopolysakkarider (EPS), og syrekulturer som inneholder disse stammene gir melkeprodukter med økt viskositet og en slimete/trådtrekkende konsistens (Faye et al. 2012). Det er *eps*-genene i disse *L. lactis* som koder for EPS-produksjon. Hos noen stammer av *L. lactis* befinner *eps*-genene seg i genomet, mens hos andre er disse genene lokalisert på store plasmider (Kleerebezem et al. 2002).

1.4. Eksopolysakkarider (EPS) produsert av melkesyrebakterier

Mange bakterier, inkludert enkelte melkesyrebakterier, har evnen til å produsere ekstracellulære polysakkarider. Slike polysakkarider kalles eksopolysakkarider, eller EPS, og det blir dannet to ulike typer. Den ene typen kalles kapsulære polysakkarider (CPS), fordi de er festet til celleveggen som kapsler. Den andre typen skilles ut av cellen, og danner et slimete/trådtrekkende ekstracellulært miljø. Sistnevnte blir heretter omtalt som EPS. EPS blir delt inn i klasser avhengig av om polysakkaridet består av én type monosakkarid eller om det er bygd opp av flere repeterende sukkerenheter (Degeest et al. 2001), henholdsvis homo- og hetero-EPS.

Homo-EPS syntetiseres utenfor cellen (De Vuyst & Degeest 1999), der spesifikke ekstracellulære glykosyltransferaser (GTF) eller fruktosyltransferaser (FTF) katalyserer EPS-syntesen. Begge enzymene bruker sukrose som spesifikt substrat i dannelsen av EPS, og hydrolyse av sukrose danner tilstrekkelig energi for å drive prosessen (Harutoshi 2013). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Streptococcus salivarius* og *Lactobacillus reuteri* er kjent for å danne homo-EPS fra sukrose. Førstnevnte produserer dextran, mens de to andre produserer levan.

Syntesen av hetero-EPS er mer komplisert. Monosakkarider i cellen blir konvertert til sukkernukleotider, og disse blir polymerisert til de repeterende sukkerenhetene som hetero-EPS består av. Det er enzymet glykosyl pyrofosforylase som katalyserer disse polymeriseringsreaksjonene. Til slutt blir sukkerenhetene transportert ut av cellen, der de blir

polymerisert til hetero-EPS av glykosyltransferaser. Det finnes store variasjoner i den kjemiske sammensetningen til ulike hetero-EPS (Harutoshi 2013), men D-galaktose, D-glukose og L-rhamnose er nesten alltid inkludert (De Vuyst & Degeest 1999). Mange homofermentative melkesyrebakterier, slik som *L. lactis* subsp. *cremoris*, er kjent for å danne hetero-EPS (Harutoshi 2013).

Bruken av EPS-produserende melkesyrebakterier i produksjon av fermenterte meieriprodukter har fått økt oppmerksomhet den siste tiden. Flere forbrukere ønsker mat uten innhold av tilsetningsstoffer, og dette øker interessen for naturlige konsistensgivende midler slik som EPS. EPS i fermenterte meieriprodukter kan gi økt viskositet og redusert grad av synerese, noe som totalt sett vil bidra til forbedrede tekstur- og reologi-egenskaper i produktene (Ruas-Madiedo et al. 2002b). Melkesyrebakterier danner relativt små mengder EPS sammenlignet med andre EPS-produserende mikroorganismer. *L. lactis* subsp. *cremoris* kan danne 80-600 mg/L hetero-EPS, mens *Xanthomas campestris* kan danne opptil 30-50 g/L xanthan-gummi. Bruken av melkesyrebakterier er likevel fordelaktig da disse er GRAS-organismer («generally recognized as safe»), og kan benyttes direkte i produktet (Harutoshi 2013). Den økte oppmerksomheten skyldes også at EPS trolig kan ha helsebringende egenskaper, slik som å virke kolesteroldempende samt ha evnen til å hemme utviklingen av kreft (Ruas-Madiedo et al. 2002a). EPS kan også betraktes som prebiotisk. Prebiotiske komponenter defineres som ufordøyelige komponenter i maten som virker helsebringende hos verten ved å fremme vekst av og/eller aktivitet til spesifikke bakterier i tarmen. Disse helseeffektene er ikke helt sikre, og mer forskning på området kreves for å definere næringsmidler med innhold av EPS-produserende melkesyrebakterier som funksjonell mat som fremmer human helse (Ruas-Madiedo et al. 2002a).

1.5. Metoder for å fremme vekst av melkesyrebakterier

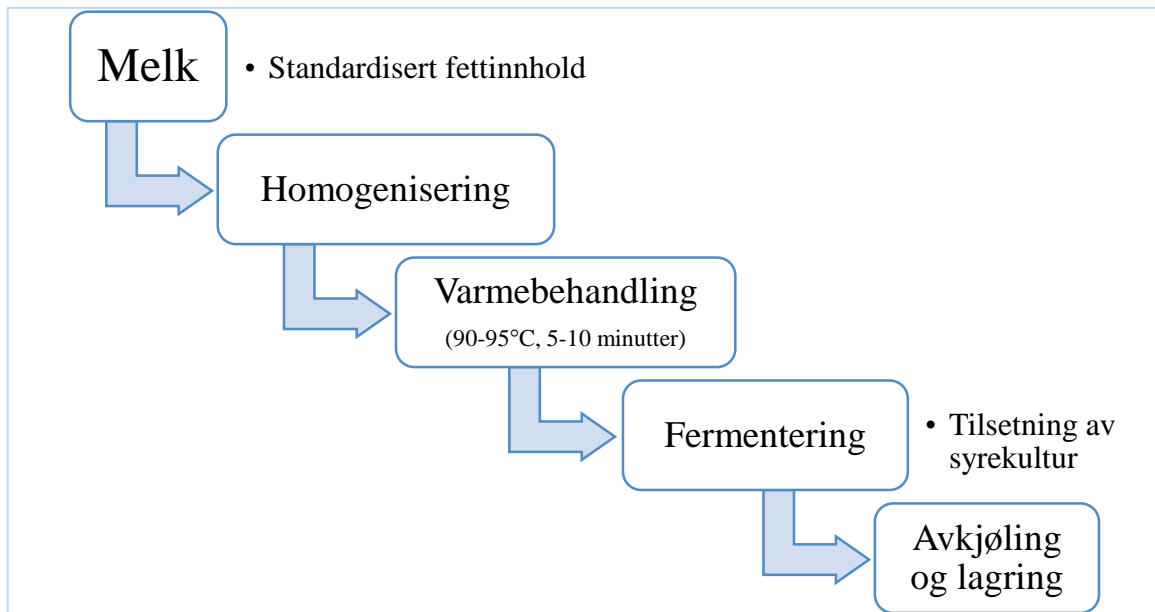
For å kunne fremme vekst og isolere en bestemt type mikroorganisme kan det benyttes såkalte selektive eller elektive (utvelgende) vekstmedium for den aktuelle organismen. Selektive medier er inhiberende medier, da de inneholder en eller flere inhiberende komponenter. Denne typen vekstmedium er satt sammen på en slik måte at de vil inhibere de fleste former for mikrobiell vekst, men samtidig virke mindre inhiberende på slekten eller slektene det er ønskelig å isolere. Elektive medium er satt sammen på en måte som gir optimale vekstforhold for enkelte mikroorganismer. Hensikten med elektive vekstmedium er å gi de ønskede mikroorganismene konkurransefordeler, slik at de kan utkonkurrere andre mer dominerende organismer (Adams & Moss 2008b).

I mange tilfeller er det ønskelig med vekstmedier som fremmer vekst av melkesyrebakterier. Melkesyrebakterier vil generelt sett vokse langsommere og danne mindre kolonier enn mange andre mikroorganismer, og de vil dermed være i fare for å bli utkonkurrert med mindre det blir benyttet vekstmedium som er elektive eller selektive (Reuter 1985). Når melkesyrebakteriene har begynt å vokse vil de ha en fordel i at de produserer melkesyre, noe som inhiberer vekst av mange andre mikroorganismer. Det finnes flere elektive vekstmedium for melkesyrebakterier (Schillinger & Holzapfel 2012). Blant disse er M17, som ble utviklet for å fremme vekst av kokker. I tillegg til å inneholde optimale næringsstoffer for laktokokker inneholder M17 også 1,9% β -dinatrium-glycerofosfat (GP), en komponent som bidrar til økt bufferkapasitet. Økt bufferkapasitet tillater mer vekst uten betraktelig reduksjon i pH (Terzaghi & Sandine 1975). Elektive vekstmedier kan gjøres mer selektive ved å tilsette inhiberende komponenter eller ved å endre vekstforholdene på andre måter, som å modifisere pH eller lignende. M17 skal gjøre det mulig å isolere laktokokker, men dette mediet er ikke fullstendig selektivt (Schillinger & Holzapfel 2012). Ellers kan vekst av melkesyrebakterier også fremmes ved å fjerne tilgang til oksygen, da disse bakteriene er i stand til å vokse anaerobt (Reuter 1985).

1.6. Fremstilling av syrnet melk

Det finnes mange ulike varianter av fermenterte meieriprodukter, og forskjellene er avhengige av fremstillingsmetode, hvilket dyr melken stammer fra og hvilke mikroorganismer syrekulturen består av. Ulike fermenterte meieriprodukter, slik som forskjellige former for ost og syrnet melk, blir produsert rundt om i hele verden (Robinson & Tamime 2008).

Fremstilling av syrnet melk inkluderer en form for varmebehandling, tilsetning av en bestemt syrekultur, fermentering, avkjøling og pakking. Flytskjema for en generell produksjon av fermenterte meieriprodukter er gitt i **Figur 1**. Før prosessering begynner blir fettinnholdet i melken standardisert, og noen ganger blir den også homogenisert før varmebehandling for å finfordele fettkulene i melken. Varmebehandlingen som benyttes ved fremstilling av syrnet melk foregår ofte ved høyere temperaturer og over lengre tid enn vanlig pasteurisering. Vanligvis i industrien benyttes temperaturer i området 90-95°C, over en periode på 5-10 minutter. Denne kraftige varmebehandlingen gjør at over 80% av myseproteinene denaturerer. Ved denaturering folder de globulære myseproteinene seg ut, og binder seg til κ -kaseinet. Dermed vil også myseproteinene inngå i gelnettverket som dannes i løpet av fermenteringen, slik at det dannes en tettere gel. Etter varmebehandlingen blir melken avkjølt og podet med syrekultur, og produktet overføres enten til inkubasjonstanker eller pakkes i emballasje for



Figur 1: Generelt flytskjema for produksjon av fermenterte melkeprodukter.

fermentering. Fermenteringen foregår ved ulike temperaturer og over ulik tid avhengig av hvilken syrekultur som benyttes (Nilsson et al. 2008). I løpet av fermenteringen blir pH redusert i melken som følge av at melkesyrebakteriene i syrekulturen danner melkesyre. pH i usyrnet melk er omtrent 6,7 (Walstra et al. 2006c), og når pH reduseres gradvis vil stabiliteten til kaseinmicellene i melken bli redusert som følge av at kolloidalt kalsiumfosfat (CCP) frigjøres fra micellen. Videre reduksjon i pH vil redusere stabiliteten ytterligere, og ved pH 4,6, vil kaseinmicellene aggregere og danne et gelnettverk (Lucey & Singh 1997). Dette er det isoelektriske punktet til kaseinene. Ved dette punktet er de negative ladningene til κ -kaseinene på overflaten av kaseinmicellene nøytralisert, og dermed finnes det ikke lenger frastøtende krefter mellom micellene som hindrer dem i å aggregere (Robinson et al. 2008). Dannelsen av en slik syregel fører til økt viskositet i syrnede melkeprodukter (Lucey & Singh 1997). Når fermenteringen er fullført blir produktet kjølt ned for å redusere aktiviteten til syrekulturen (Robinson et al. 2008).

1.7. Tettegras

Pinguicula vulgaris er en kjøttetende plante som vokser i Europa, nordlige deler av Asia, Nord-Amerika og på Grønland. I Norge er den kjent som blant annet tettegras (Haug 1996).

Figur 2 viser bilder av tettegras. Tettegras vokser på fuktig gressmark, og ofte i næringsfattig jord. Planten danner en rosett av lysegrønne blader, som ligger tett til jordoverflaten. På overflaten av bladene finnes kjertler som inneholder fordøyelsesenzymer. Noen kjertler er lokalisert direkte på bladet, og disse er hovedsakelig involvert i fordøyelsen av insektene og i å ta opp nyttige metabolitter. Andre kjertler befinner seg på små stilker som vokser opp fra



Figur 2: Tettegras (*Pinguicula vulgaris*). Bilene ble tatt i løpet av sommeren 2014, i forbindelse med innsamlingen av tetteblader.

bladene, og disse skiller også ut klissete mucopolysakkarider som insektene setter seg fast i (Aldenius et al. 1983). Enzymene på overflaten av tettegras-bladene kan også få melk til å koagulere, og dette har gitt tettegraset mange ulike navn rundt om i Europa. I Skottland er planten kjent som *thickening grass* og i Frankrike har den blitt kalt *caille-lait*. Begge disse navnene kan forbindes med bruken av løpe. Navn som *ystegras* og *kjesegras* har blitt brukt i Norge, noe som også viser til den koagulerende evnen til tettegras (Furuset 2008).

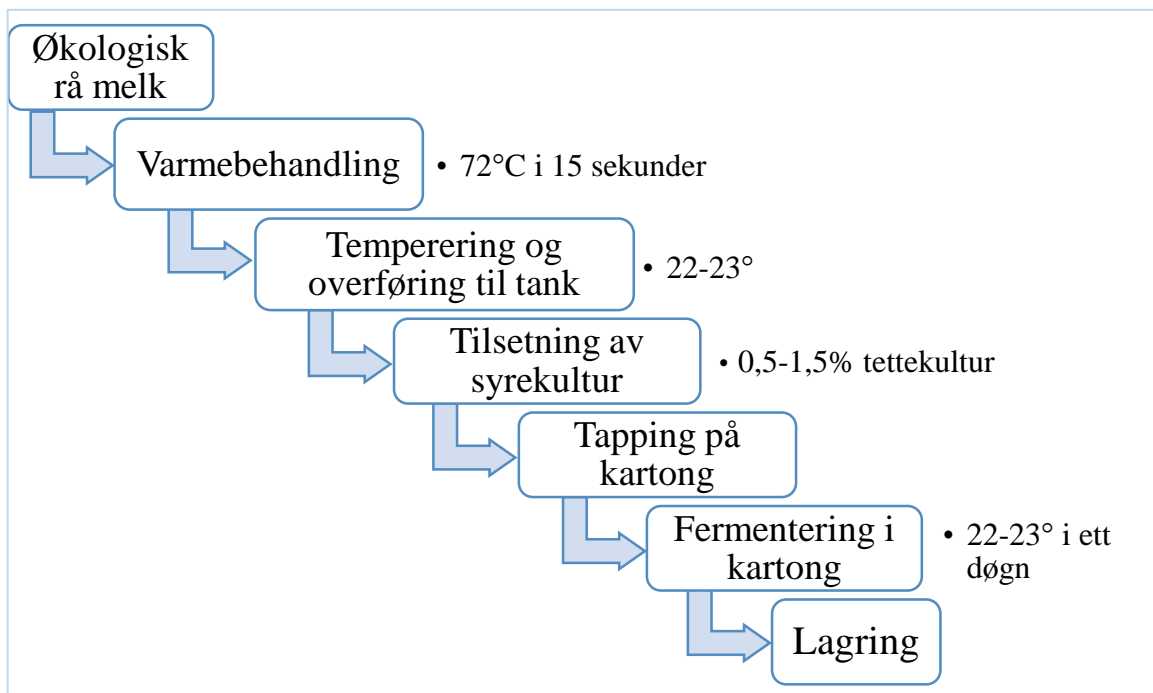
1.8. Tettemelk

Tettemelk er et tradisjonelt fermentert melkeprodukt i Norge, med en karakteristisk trådtrekkende og viskøs konsistens (Faye et al. 2012) i tillegg til en mild syrlig smak og lav grad av synerese. Den spesielle trådtrekkende og svært viskøse konsistensen til tettemelk skyldes at tettekulturen inneholder melkesyrebakterien *L. lactis* subsp. *cremoris*, som har evnen til å danne EPS (Fondén et al. 2008). Denne sammenhengen ble oppdaget allerede i 1899, av den svenske bakteriologen Gerda Troili-Peterson (Furuset 2008). Tettemelk sies å ha helsefremmende egenskaper, både som følge av EPS-innhold (Faye et al. 2012) og som følge av dannelsen av det blodtrykksdempende stoffet GABA under lagring (Magri 2014). Likevel kreves videre forskning på tettemelk og betydningen av EPS-produserende laktokokker før tettemelk kan bli anerkjent som funksjonell mat (Faye et al. 2012). Bruk av trådtrekkende syrekulturer har vært typisk i Norden. I Sverige og Finland har varianter av tettemelk vært i kommersiell produksjon lenge, kjent som henholdsvis långfil og viili (Haug 1996).

Tradisjonelt sett ble tettemelk produsert til eget bruk rundt på gårdene på landsbygda, og hver gård hadde sin egen tettekultur, eller «tette». Tettemelk ble lagd ved å sile melk gjennom et klede innsatt med tette, og deretter la melken stå i noen dager til det ble dannet tettemelk. En liten del av den nye tettemelken ble satt til sides, slik at den kunne brukes som tette ved neste

produksjon (Furuset 2008). I tidligere tider var produksjon av tettemelk en nødvendighet for å øke holdbarheten til melken. Det ble produsert mest melk om sommeren som følge av at kyrne var på beite, og produksjonen av tettemelk var en metode for å bevare melk fra sommeren til bruk i løpet av vinteren (Haug 1996). Ferdig tettemelk kunne lagres i flere måneder (Fondén et al. 2008). I dag omsettes tettemelk i dagligvarebutikkene som Tjukkmjøl, produsert av Rørosmeieriet (Furuset 2008). Tjukkmjøl produseres fra økologisk rå melk. Melken pasteuriseres ved 72°C i 15 sekunder. Avkjølt melk blir overført til en inkubasjonstank, der den blir temperert til 20-23°C og podet med 0,5-1,5% tettekultur.

Flytskjema for produksjon av Tjukkmjøl ved Rørosmeieriet er gitt i **Figur 3**. Pakking skjer



Figur 3: Flytskjema for produksjon av Tjukkmjøl ved Rørosmeieriet.

samme dag, og fermenteringen foregår i emballasjen. Tettekulturen, eller tetten, som Rørosmeieriene benytter ved produksjon av tjukkmjøl er en blandingskultur, fremstilt fra tre utvalgte kulturer fra Bondekvinnelagene i Røros, Os og Tolga (Rørosmeieriet 2002).

Opprinnelsen til tetten er omdiskutert. Tradisjonen forteller at tetten først ble dannet ved å helle melk i en bolle med blader fra tettegras (Haug 1996). Melken ble inkubert ved 17-20°C til den koagulerte, og deretter ble en del av denne melken blandet med ny melk. Denne prosessen ble repetert flere ganger, til det ble dannet tettemelk som kunne benyttes som tette (Fondén et al. 2008). Forsøk på å lage tette på denne måten har blitt utført flere ganger (Furuset 2008), men med varierende resultater. Ingrid Haug klarte i arbeidet med sin hovedfagsoppgave å fremstille tettemelk fra tettegras plukket på Kvaløya i Troms (Haug

1996), og Therese Faye fremstilte tettemelk fra frysetørret tettegras lagret i skummetmelk i forbindelse med prosjektet «Business related biotechnology at UMB» (Faye 2010). I begge disse tilfellene ble *L. lactis* subsp. *cremoris* isolert fra den ferdige tettemelken (Faye 2010; Haug 1996). Samtidig finnes det mange fortellinger om mislykkede forsøk på å fremstille tettemelk fra tettegras, og forsøk på å påvise tilstedeværelse av *L. lactis* subsp. *cremoris* på blader av tettegras har også feilet (Furuset 2008). Som følge av dette er det flere som har foreslått at det ikke er en sammenheng mellom tettegras og tettemelk, og at bruken av tettegras i produksjon av tettemelk dermed er en myte.

1.9. Metoder for identifisering av mikroorganismer

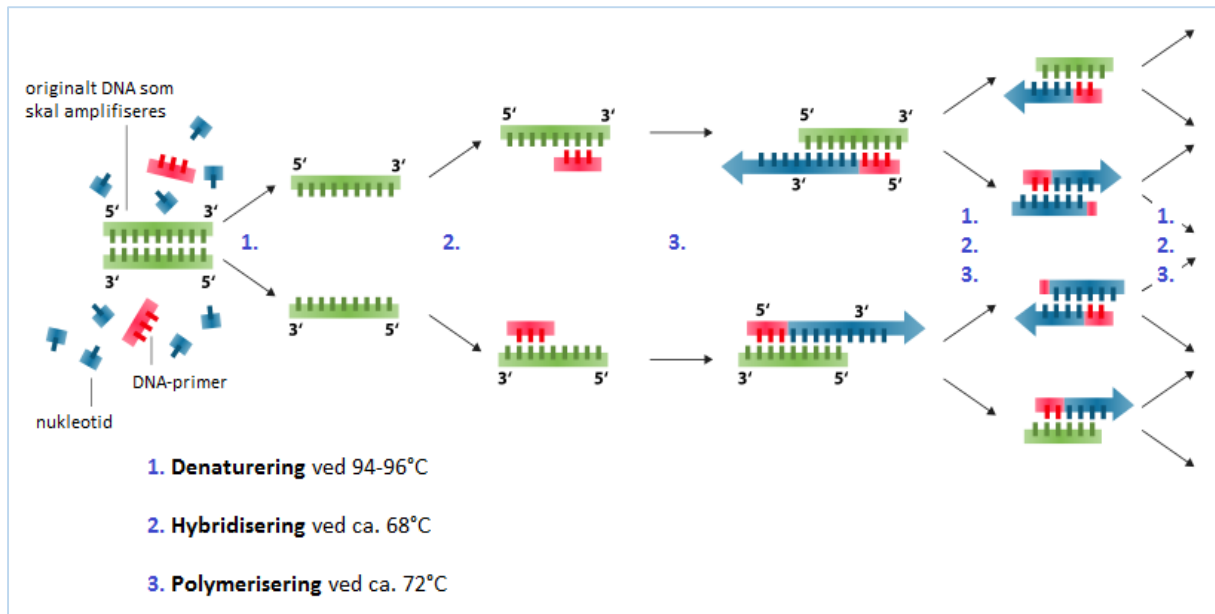
Tradisjonelt sett har mikroorganismer blitt identifisert ved bruk av klassiske mikrobiologiske metoder. Disse metodene er kulturavhengige og krever dermed kultivering av mikroorganismene, i tillegg til at de hovedsakelig bygger på fenotypisk karakterisering slik som vekstkrav, fermenteringsprofil samt morfologien til koloniene og cellene (McCartney 2002). De fenotypiske metodene er billige, og utviklingen av identifiseringsverktøy slik som API-systemet har gjort at enkelte av disse metodene er lite arbeidskrevende. Til tross for at mange fenotypiske teknikker har vist seg å fungere ved identifisering av melkesyrebakterier, er det generell enighet om at de fenotypiske teknikkene ikke alltid er pålitelige (Temmerman et al. 2004). Noen svakheter ved disse metodene er tvetydighet, dårlig reproduserbarhet, dårlig evne til å skille mellom organismer på arts-nivå (McCartney 2002), i tillegg til at de ofte tar lang tid (Kirschner et al. 2001). Disse svakhetene har gitt et behov for mer nøyaktige identifiseringsmetoder, og utviklingen av molekylære metoder har vært svaret.

Molekylære metoder gir en mer pålitelig identifisering, og har blant annet blitt benyttet ved studier av tarmflora, til identifisering av isolater og ved studier av mikrobielt mangfold i én enkelt prøve (McCartney 2002). Disse metodene bygger på DNA-basert identifisering, og gir dermed en genotypisk karakterisering av mikroorganismene. Dette gjør det mulig å identifisere ikke bare på slekts-nivå, men også på art- og stamme-nivå avhengig av hvilken metode som benyttes. Slike metoder kan kreve kultivering av organismer som det kan isoleres DNA fra, men ellers kan de være fullstendig kulturuavhengige. Uansett vil de genotypiske metodene bli mindre påvirket av variasjoner i vekstforholdene til mikroorganismene, og dette er en av fordelene ved bruk av denne typen metoder. Andre fordeler er høyere grad av diskriminerende evne, bedre reproduserbarhet (Temmerman et al. 2004) og høyere hastighet. Samtidig er det også svakheter forbundet med mange av disse metodene, slik som høye kostnader og krav til utdannet personell, noe som gjør det vanskeligere å tilpasse metodene til

rutinearbeid (Kirschner et al. 2001). Det finnes mange ulike molekylære metoder, men mange av dem baserer seg på amplifikasjon av DNA ved bruk av polymerasekjedereaksjonen (PCR) (Temmerman et al. 2004).

1.10. Polymerasekjedereaksjonen (PCR)

Polymerasekjedereaksjonen (PCR) er en metode som benyttes for å amplifisere spesifikke DNA-sekvenser (Erlich 1989). I **Figur 4** blir det gitt en visuell beskrivelse av hvordan PCR foregår (Wikipedia 2015). Reaksjonen krever to primere, som kan hybridisere til motsatte



Figur 4: Polymerasekjedereaksjonen (Wikipedia 2015).

tråder på hver sin ende av DNA-regionen det er ønskelig å amplifisere, i tillegg til et DNA-templat, deoksyribonukleotidtrifosfater (dNTP) og enzymet DNA-polymerase. Etter at primerne har hybridisert til mål-DNA på DNA-templatet kan DNA-polymerase addere dNTP til 3'-OH-enden til primerne, og dermed initiere syntese av en ny DNA-tråd på templatet. Selve prosessen inkluderer tre trinn, som bli gjentatt i flere sykler. De tre trinnene er denaturering, der DNA blir varmet opp for å separere de to trådene, hybridisering, der primere fester seg til komplementære områder på enkelt-trådet DNA og til slutt polymerisering, der DNA-polymerase forlenger 3'-OH-enden til primerne (Erlich 1989). Disse trinnene foregår ved ulike temperaturer. Denaturering skjer ved 94-98°C, deretter avkjøles reaksjonsblandingen til mellom 37 og 65°C for hybridisering, og til slutt vil polymerisering foregå ved 72°C (Adams & Moss 2008b). De nye DNA-trådene blir templat for neste syklus, og slik vil antallet kopier av mål-DNA vil øke eksponentielt. Term stabile DNA-polymeraser blir benyttet for å unngå at enzymet ikke selv blir denaturert, og Taq-polymerase fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus* har vært mye brukt (Erlich 1989).

1.11. Gelelektroforese

DNA-fragmenter med ulik lengde kan skilles fra hverandre ved bruk av gelelektroforese. Metoden innebærer at DNA blir tilsatt i brønner i den ene enden av en gel, lagd av polyakrylamid eller agarose. Når gelen med DNA blir utsatt for et elektrisk felt vil DNA begynne å migrere gjennom porene i gelen. DNA vil bevege seg mot den positive polen, da DNA er negativt ladd, og fragmenter med ulik lengde vil bli separert fra hverandre fordi de bruker ulik tid på å migrere gjennom porene. Korte fragmenter beveger seg lett gjennom porene, mens lange fragmenter bruker lang tid. Hvor langt fragmentene har migrert kan visualiseres etter elektroforesen. Ved tilsetning av fluoriserende fargestoffer til gelen kan DNA bli synlig på gelen som fluoriserende bånd. Etidiumbromid har vært mye brukt som fargestoff (Watson et al. 2008), men da dette stoffet er mutagerende har nye stoffer blitt tatt i bruk. GelRed er et rødt fluoriserende fargestoff som har omtrent det samme spektrumet som etidiumbromid, men som ikke er mutagerende. Dette fargestoffet er mer sensitivt for deteksjon av nukleinsyrer i agarosegeler enn etidiumbromid (Huang et al. 2010)

1.12. ARISA

ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis) er en metode som benyttes til å analysere total mikrobiota samt gi estimat på mikrobielt mangfold. Metoden involverer amplifisering av området mellom genene som koder for den lille 16S-rRNA- og den store 23S-rRNA-underenheten i rRNA-operonet, den såkalte «spacer-regionen». Dette området er svært konservert, og kan brukes til å skille mellom ulike bakteriearter. Amplifiseringen blir utført på prøver med total mikrobiota-DNA, ved bruk av PCR med oligonukleotid-primere som hybridiserer til de konserverte områdene. Den ene primeren er merket, slik at den er fluoriserende. Deretter følger elektroforese av PCR-produktet på en polyakrylamid-gel. Denne elektroforesen blir utført ved bruk av et automatisk system, der fluoriserende DNA-fragmenter blir detektert ved bruk av laser. Resultatene er en ARISA-profil, som viser total mikrobiota. I ARISA-profilen dannes topper, og hver enkelt topp er bygd opp av alle organismene i den aktuelle prøven som har spacer-region med én bestemt basepar-lengde (ITS-lengde). Dette gjør at ARISA kan gi et underestimat av mikrobielt mangfold, da flere mikroorganismer kan ha spacer-region med omtrent samme lengde (Fisher & Triplett 1999).

1.13. Hensikt

Den spesielle trådtrekkende og tyktflytende konsistensen til tettemelk skyldes produksjon av EPS, og det er spesielle stammer av *L. lactis* subsp. *cremoris* som danner EPS i dette produktet (Faye et al. 2012). Foreløpig er det ukjent hvordan disse melkesyrebakteriene har blitt en del av de tradisjonelle tettekulturene som benyttes i produksjon av tettemelk.

Folketradisjoner i Norge forteller at tettegras har vært en viktig komponent i utviklingen av de opprinnelige tettekulturene, og at tettemelk ble dannet ved å inokulere melken med tettegras (Fondén et al. 2008). Det har dermed blitt foreslått at de EPS-produserende laktokokkene ble overført til melk fra tettegras, og at det er slik de opprinnelige tettekulturene ble dannet. Haug (1996) og Faye (2010) klarte å danne tettemelk ved å inokulere melk med blader fra tettegras, og EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* ble isolert fra den ferdige tettemelken i begge disse tilfellene (Faye 2010; Haug 1996). Til tross for dette har det ennå ikke lyktes å isolere EPS-produserende laktokokker direkte fra tettegras.

Hypotesen som denne oppgaven bygger på er at *L. lactis* subsp. *cremoris* befinner seg på blader fra tettegras, og at disse bakteriene ble overført til de opprinnelige tettekulturene via bladene. Denne hypotesen er basert på gamle folkefortellinger som beskriver hvordan tettemelk ble dannet fra tettegras. Målet med oppgaven var å evaluere hypotesen, ved bruk av tradisjonelle mikrobiologiske og moderne molekylære metoder, samt forsøke å påvise EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* direkte på tettegras.

2. Materiale og metoder

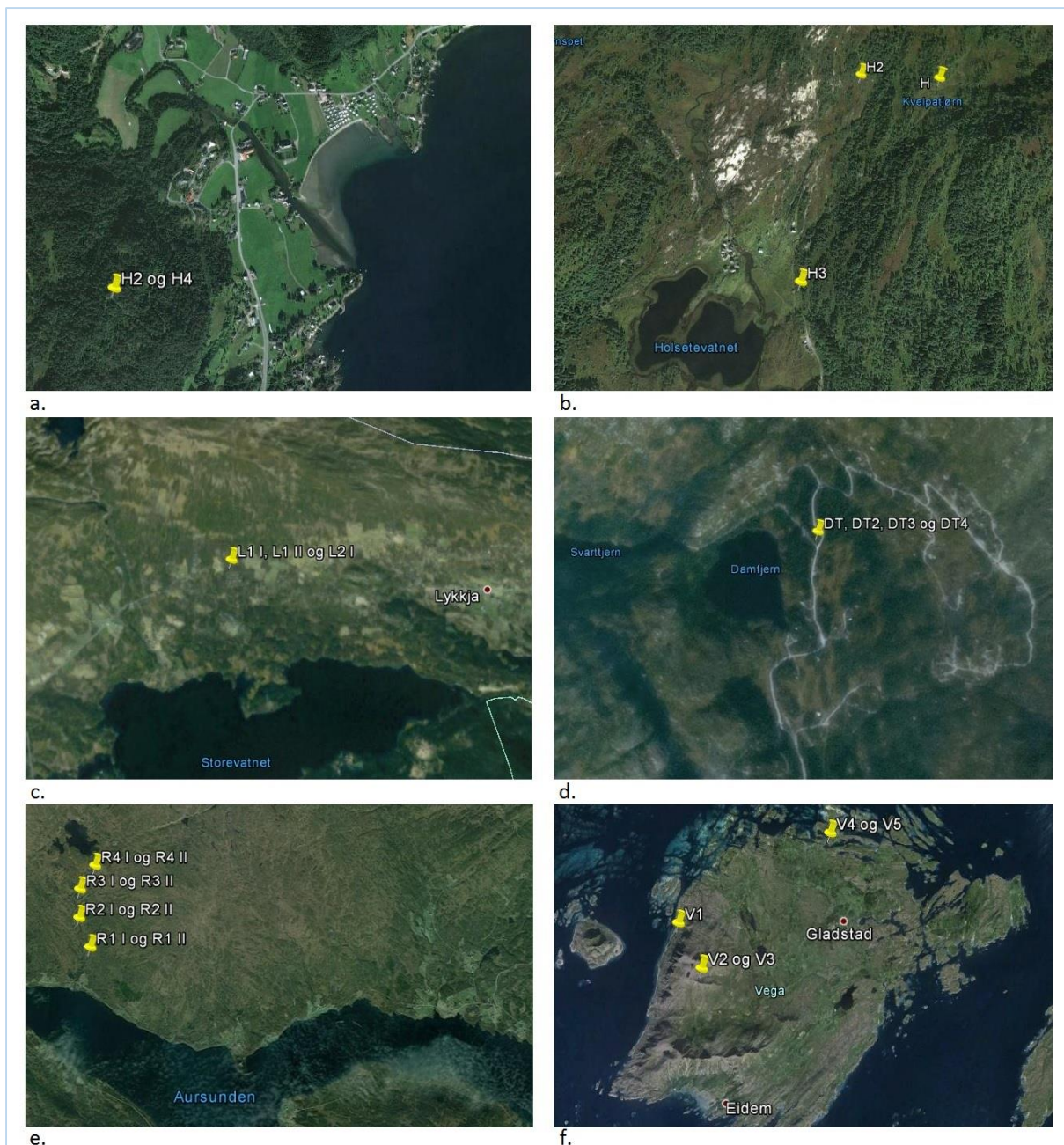
Formålet med dette arbeidet var å forsøke å påvise EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* på innsamlede blader av *P. vulgaris*. Da tilstedeværelsen av disse bakteriene på denne planten var usikker, kunne ikke forsøkene bli fullstendig planlagt før arbeidet begynte. Dette førte til at resultatene fra de innledende forsøkene bestemte den videre retningen til oppgaven, og at forsøkene ble klarlagt underveis. Det ble benyttet tradisjonelle mikrobiologiske metoder, samt molekylære metoder i løpet av det praktiske arbeidet. Alle forsøkene ble utført på meierilaboratoriet i meieribygningen ved NMBU.

2.1. Innsamling av prøver

Prøver av tettegras ble samlet inn i løpet av juli og august 2014. Det ble samlet inn blader fra Røros i Sør-Trøndelag (R1 I, R1 II, R2 I, R2 II, R3 I, R3 II, R4 I og R4 II), Lykkja i Buskerud (L1 I, L1 II og L2 I), Vega i Nordland (V1, V2, V3, V4 og V5), Strandebarm i Hordaland (H, H2, H3 og H4) og fra Damtjern på Vassfarfjellet i Buskerud (DT, DT2, DT3 og DT4). **Figur 5** viser et kart over Norge der områdene prøvene ble samlet inn fra er markert, og **Figur 6** viser mer detaljert hvor prøvene fra hvert område er samlet inn.



Figur 5: Oversiktsbilde over Norge, og hvor prøvene ble samlet inn. Markørene viser områdene, Hardanger, Damtjern, Lykkja, Røros og Vega, der prøvene ble samlet inn.



Figur 6: Oversikt over hvor tettegras-bladene ble samlet inn. a. Strandebarm i Hordaland, b. Holsete i Hordaland, c. Lykkja i Hemsedal, d. Damtjern på Vassfarfjellet, e. Ved Aursunden i Rørø, f. Vega i Nordland.

Bladene ble lagt i 50 mL-flasker med 35 mL av en blanding av Ringers-løsning (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) og glyserol (85%, Merck), blandet slik at glyserolkonsentrasjonen i blandingen var 15% (v/v). Prøvene ble fryst ned, og holdt i fryser ved -18°C frem til de skulle brukes våren 2015. Før bruk ble prøvene tint opp, og deretter ble de analysert ved bruk av mikrobiologiske og molekylære metoder.

2.2. Mikrobiologiske metoder

2.2.1. Tillaging av vekstmedium

MRS- (Merck), BHI- (Oxoid LTD, Basingstoke, England) og M17-vekstmedium med laktose (Merck) ble benyttet. Prosedyren beskrevet på boksene ble fulgt ved tillaging.

Næringsbuljong med M17 og BHI ble overført til sterile rør i avtrekkskap etter autoklaving (121°C i 15 minutter). Næringsagar ble lagd ved å tilsette 15 g Agar-Agar (Merck) per liter vekstmedium. Agaren ble autoklavert (121°C i 15 minutter), og deretter støpt i petriskåler.

2.2.2. Renkulturer

Tre renkulturer av EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* isolert fra tettemelk ble benyttet i denne studien. *ARI* ble isolert fra en frysetørket tettekultur og *BF2* ble isolert fra melk med tettegras i forbindelse med prosjektet «Business related biotechnology at UMB». Den siste kulturen, *Tett*, ble isolert fra «Tjukkmjøl» produsert av Rørosmeieriet i 2014, i forbindelse med masteroppgaven til Martina Magri (Magri 2014). Disse renkulturene ble benyttet som referansekulturer ved mikroskopering av potensielle *L. lactis* subsp. *cremoris* kolonier. Det ble også isolert DNA fra renkulturene, til bruk som positive kontroller i PCR. Kulturene ble holdt ved like ved å pode de i nye rør med M17-buljong. Rørene ble satt i inkubatorskap ved 19,5°C i to døgn, og deretter stod de på kjølerommet frem til neste poding.

2.2.3. Undersøkelser av bakterier på tetteblader

Metoden som ble benyttet for undersøkelse av bakterier på tetteblader var ikke klarlagt på forhånd. Forforsøk ble utført, og metoden ble deretter tilpasset basert på resultatene fra disse forsøkene.

2.2.3.1. Plateutspredning

I løpet av de innledende forsøkene ble prøvemateriale fra prøvene H og DT spredd ut på MRS-, M17- og BHI-skåler. M17 ble benyttet da det er elektivt for laktokokker, mens MRS er selektivt for laktobaciller (Reuter 1985). BHI ble inkludert som et generelt vekstmedium. Det ble lagd fortynningsrekker av væskeblandingen bladene var fryst i, og av blandingen med innhold av moste tetteblader. Homogenisering av tettebladene i blandingen ble utført ved bruk av en Omnimix Homogenizer (Omni International, Kennesaw, USA), på hastighet fire i to minutter. Fortynninger ble spredd ut på skåler, som deretter ble inkubert aerobt ved 19,5°C i ett døgn til det var synlig vekst på skålene. Vekst av Gram-negative stavbakterier dominerte på skålene. Det var ingen vekst på MRS-skålene, og dette mediet ble ikke benyttet videre. Prøvene H2 og DT2 ble spredd ut på samme måte som ved første forforsøk på M17- og BHI-skåler. Disse skålene ble inkubert anaerobt for å fremme vekst av de fakultativt anaerobe

melkesyrebakteriene, og for å inhibere vekst av Gram-negative aerobe stavbakterier. Anaerob inkubering ble oppnådd ved å plassere skålene i lufttette beholdere med AnaeroGen-posere 3,5 L (Oxoid). En anaerob-indikator, Microbiology Anaerobtest (Merck), ble lagt i beholderen for å gi indikasjon på om miljøet var anaerobt. Det ble observert mindre vekst på disse skålene, og en endring i dominerende mikroorganismer. I tillegg ble det observert mindre vekst på skålene der det var spredd ut prøvemateriale uten moste blader. Den endelige metoden ble etter dette besluttet å bestå av homogenisering av bladene, utspredning av passende fortyninger på M17- og BHI-skåler og anaerob inkubering ved 19,5°C i omtrent tre døgn til det var synlig vekst på skålene. Denne metoden ble benyttet for de resterende prøvene, med unntak av H3 og DT3 som det bare ble ekstrahert DNA fra.

2.2.3.2. Rendyrking av utvalgte kolonier

Koloniene som vokste frem på skålene ble undersøkt, med det formål å finne kolonier som kunne ligne *L. lactis* subsp. *cremoris*. Katalase-negative og Gram-positive kolonier ble plukket ut, og strøket ut på nye M17-skåler for rendyrking. For å undersøke om koloniene var katalase-negative ble det benyttet hydrogenperoksid (3% H₂O₂, Merck). Katalase-positive kolonier ble avslørt ved at de begynte å bruse i kontakt med H₂O₂. For å undersøke om koloniene var Gram-positive ble det benyttet kaliumhydroksid (3% KOH, Merck). Gram-negative kolonier ble avslørt ved at kolonimateriale dannet et seigt stoff i kontakt med KOH. Enkelte kolonier ble også gram-farget, og vanlig prosedyre for gram-farging ble fulgt. Koloniene ble studert i mikroskop (Leica DM750, Tyskland), for å undersøke om de var stav- eller kokkeformet. Etter to til tre omganger med rendyrking på M17-skåler ble koloniene podet i rør med M17-buljong, og inkubert videre ved 19,5°C i ett til tre døgn. Variasjonen i inkuberingstid skyldes at de ulike koloniene som ble rendyrket brukte ulik tid på å vokse. Rendyrkede kolonier som viste likhetstrekk med *L. lactis* ble podet i UHT-melk, og deretter inkubert ved 19,5°C i tre døgn. Deretter ble det lagd mikroskop-preparater farget med metylenblått, og disse ble studert i mikroskop. Det ble også målt pH i røret etter vekst.

2.3. Oppsamling av bakterieceller til molekylær analyse

Bakterieceller ble samlet inn fra alle prøvene til ekstraksjon av DNA. Ulike prosedyrer for innsamling ble benyttet avhengig av om cellene ble samlet inn fra renkulturer eller bladprøver.

2.3.1. Fra renkulturer

1 mL renkultur ble overført til et 1,5 mL Eppendorfrør. Røret ble sentrifugert ved 16000 x g i tre minutter i Centrifuge 545D (Eppendorf, Hamburg Tyskland). Dette ga dannelse av en

pellet av celler i bunnen av Eppendorfrøret. Buljongen ble helt av, og pelleten ble resuspendert i 1 mL citratløsning (2% tri-sodium citrat dihydrat, Merck) for å vaske cellene. Deretter ble røret sentrifugert på nytt ved 16000 x g i tre minutter. Supernatanten ble helt av, og pelleten ble fryst ved -18°C.

2.3.2. Fra blodprøver

Omtrent 14 mL av prøvematerialet ble overført fra Omnimix-beholderen til et sentrifugerør. Røret ble sentrifugert i Heraeus Multifuge X3R-sentrifuge (Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) ved 18,82 x g i to minutter. Dette gjorde at bladrestene la seg på bunnen av røret, slik at det ble mulig å ta ut 10 mL prøve uten bladrest og overføre dette til et nytt rør. Det nye røret ble sentrifugert ved 13380 x g i 10 minutter. Supernatanten ble helt av, og pelleten i bunnen av røret ble resuspendert i 1 mL citratløsning (Merck). Hele innholdet i røret ble overført til et 1,5 mL Eppendorfrør, og sentrifugert i Centrifuge 545D (Eppendorf) ved 16000 x g i tre minutter. Supernatanten ble helt av, og røret med pellet ble fryst ved -18°C. Det ble samlet inn celler på denne måten fra alle blodprøvene, med unntak av H2 og DT2 da det ble gjort en feil ved ekstraksjon av DNA fra disse prøvene.

2.4. Molekylære metoder

2.4.1. DNA-ekstraksjon

DNA ble ekstrahert fra pelletene ved bruk av GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Prosedyre for ekstraksjon av DNA fra Gram-positive bakterieceller ble fulgt, med noen endringer. Pelleten ble resuspendert i 200 µL lysozym-løsning. Lysozym-løsningen ble klargjort rett før bruk ved å løse lysozym i Gram-positiv lysis-løsning og mutanolysin til en konsentrasjon på 45mg/mL. Prøven ble inkubert i varmeblokk i én time ved 37°C. 20 µL RNase A-løsning ble tilsatt, og prøven ble inkubert i to minutter ved romtemperatur. Deretter ble 20 µL Proteinase K-løsning (20 mg/mL) og 200 µL Lysis-løsning C tilsatt. Prøven ble blandet på IKA® MS 1 Minishaker (Sigma-Aldrich), og deretter inkubert i en varmeblokk i 10 minutter ved 55°C. GenElute Miniprep bindekolonne ble klargjort ved å tilsette 500 µL Column Preparation-løsning, og sentrifugere kolonnen ved 12000 x g i ett minutt. Eluatet ble kastet. Prøven ble tilsatt 200 µL 96% etanol, og blandet godt, før alt prøvematerialet ble overført til bindekolonnen. Kolonnen ble sentrifugert ved 6500 x g i ett minutt. Samlerøret med eluatet ble kastet, og kolonnen ble plassert i et nytt samlerør. 500 µL Vaskeløsning 1 ble tilsatt, og kolonnen ble sentrifugert ved 6500 x g i ett minutt. Samlerøret med eluatet ble kastet, og kolonnen plassert i et nytt samlerør. 500 µL Vaskeløsning ble tilsatt kolonnen. Denne Vaskeløsningen var klargjort på forhånd ved å fortynne 90 mL

Vaskeløsning-konsentrat med 360 mL 96% etanol. Kolonnen ble sentrifugert i fire minutter ved 16000 x g. Samlerøret med eluatet ble kastet, og kolonnen ble plassert i et nytt samlerør. 100 µL Elution-løsning ble pipettert til sentrum av kolonnen, og kolonnen ble inkubert i romtemperatur i fem minutter før den ble sentrifugert ved 6500 x g i ett minutt. Deretter ble eluatet pipettert opp og tilsatt kolonnen på nytt, før kolonnen ble sentrifugert nok en gang ved 6500 x g i ett minutt. DNA ble lagret ved -18°C.

2.4.2. Konstruksjon av primere

Det ble konstruert spesifikke primere for EPS-operonet til *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Sekvensene til 13 EPS-operon fra laktokokker ble justert i forhold til hverandre i programmet Geneious (Biomatters, Auckland, New Zealand). En oversikt over sekvensene som ble benyttet er gitt i **Tabell 1**.

Tabell 1: Oversikt over sekvensene av *L. lactis* subsp. *cremoris* som ble benyttet ved design av EPS-primere.

Sekvenser fra <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactococcus lactis</i> strain AI06, complete genome • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> A76, complete genome • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pCI658 iso-IS element IS982 ORF982 gene, complete cds; exopolysaccharide production gene cluster, complete sequence; and OrfY gene, complete cds • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pEps352 EPS gene cluster, complete sequence • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147, complete genome • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KLDS 4.0325, complete genome • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 2118, complete genome • <i>Lactococcus lactis</i> exopolysaccharide biosynthesis gene cluster, complete sequence; and unknown genes. accession number NCBI AY741550 • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> EpsA (epsA), EpsB (epsB), EpsC (epsC), and undecaprenylphosphate glucosephosphotransferase (epsD) genes, complete cds, accession number NCBI: HQ665557 • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ARI, complete genome, unpublished • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> BF2, complete genome, unpublished • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Tett-isolate, complete genome, unpublished

EPS-operonene til de tre renkulturene av *L. lactis* subsp. *cremoris* isolert fra tettemelk (*ARI*, *BF2* og *Tett*) ble plukket ut. Primersekvenser ble valgt ut fra områder i EPS-operonene der sekvensene var like. Disse sekvensene ble testet ved å søke etter like sekvenser i de resterende 10 EPS-operonene, for å bekrefte at de var spesifikke for EPS-operonet. I **Tabell 2** er det gitt en oversikt over hvilke EPS-primere som ble brukt og sekvensen til disse, i tillegg til de andre primerne som ble benyttet. EPS-primere ble levert av Invitrogen (Life Technologies, Paisley, UK).

Tabell 2: Primersett og deres sekvenser. «F» gir primer forover, og «R» gir primer i revers.

Primersett	Primer	Sekvens
EPS-sett 2	380F	5'-AGAAAGGGAATTGGGTTACCCT-3'
	1623R	5'-TGAGGCTGTGTAAACTGGGG-3'
EPS-sett 3	1453F	5'-TTAAATATTGGAGAAGAAATGCAGCAGGA-3'
	2820R	5'-GGCACGTACAACAAGAACCAC-3'
ITS-sett	1406F	5'-TGYACACACCGCCCGT-3'
	23S-R	5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3'
16S-sett	1F	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	5R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

ITS-primersettet ble benyttet ved PCR av prøver til ARISA. I dette settet var 5'-enden av 1406F-primeren merket med fosforamidit (Fisher & Triplett 1999). 16S-settet amplifiserer et fragment av 16S rRNA-genet (Oremland et al. 2002), og ble benyttet ved PCR av renkulturprøver som skulle sendes til sekvensering hos GATC.

2.4.3. Qubit Assay

Qubit Assay (Life Technologies) ble benyttet for å måle mengden DNA i prøvene. Prosedyren vedlagt i pakningen ble fulgt. En arbeidsløsning ble lagd i stand med 199 µL dsDNA broad range Buffer og 1 µL dsDNA broad range Reagent til hver prøve, inkludert de to standardene. Standardene ble tillagd ved å blande 190 µL arbeidsløsning og 10 µL standard-løsning i qubit-rør. Deretter ble 3 µL DNA-prøve blandet med 197 µL arbeidsløsning i qubit-rør. Alle rørene ble blandet på Minishaker og inkubert ved romtemperatur i to minutter. Standardene og prøvene ble deretter avlest i Qubit Fluorometer (Life Technologies).

2.4.4. Polymerasekjedereaksjonen (PCR)

PCR ble gjennomført ved bruk av iProof High Fidelity PCR-sett (BioRad, Hercules, USA).

Reaksjonsblandingen ble lagd i henhold til beskrivelsen fra BioRad. Før PCR ble prøver med høy DNA-konsentrasjon fortynnet til en konsentrasjon på 20 ng/mL. Det ble benyttet QIAquick Elution Buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland) som fortynningsvæske.

Bladprøvene ble ikke fortynnet, da disse hadde lav DNA-konsentrasjon. **Tabell 3** og **Tabell 4** viser sammensetningen av reaksjonsblandingen som ble tillagd til PCR ved bruk av henholdsvis EPS-primersett og ITS- og 16S-primersettene.

Tabell 3: Tillaging av reaksjonsblanding for PCR med EPS-primersett.

Reagens	Initiell konsentrasjon	Renkulturer Én reaksjon	Bladprøver Én reaksjon
iProof HF Buffer	5X	1X4	1X4
iProof dNTP-mix	10 mM hver	200 µM hver	200 µM hver
Primer F	5 pM	0,25 µM	0,25 µM
Primer R	5 pM	0,25 µM	0,25 µM
DNA	x	20 ng	4 µL*
MiliQ-vann	x	12,4 µL	9,4 µL
iProof Polymerase	2 U/µL	0,2 U/µL	0,2 U/µL
Total mengde	x	20 µL	20 µL

*Mer DNA-prøve ble tilsatt da DNA-konsentrasjonen i bladprøvene var lav.

Tabell 4: Tillaging av reaksjonsblanding for PCR med ITS- og 16S-primersettene.

Reagens	Initiell konsentrasjon	Endelig konsentrasjon Én reaksjon ITS-primersett	Endelig konsentrasjon Én reaksjon 16S-primersett
iProof HF Buffer	5X	1X4	1X4
iProof dNTP-mix	10 mM hver	200 µM hver	200 µM hver
Primer F	5 pM	0,20 µM	0,25 µM
Primer R	5 pM	0,20 µM	0,25 µM
DNA	x	20 ng*	20 ng*
MiliQ-vann	x	12,8 µL	24,8 µL
iProof Polymerase	2 U/µL	0,2 U/µL	0,2 U/µL
Total mengde	x	20 µL	40 µL

*Gjelder for renkulturene. Ble benyttet hhv. 1 og 2 µL ekstrahert DNA for bladprøvene

PCR kjørt i C1000 Thermal Cycler (BioRad). De anbefalte syklus-tidene og temperaturene for iProof-settet ble benyttet, med ulike programmer avhengig av hvilket primersett som ble benyttet. I **Tabell 5** er det gitt en oversikt over de ulike programmene som ble brukt.

Tabell 5: Ulike PCR-programmer benyttet ved bruk av ulike primersett. Tid og temperatur for hvert trinn, samt antall repetisjoner av hvert trinn.

Program Syklus-trinn	Program2			Program4			ITS		
	Tid (sek)	Temp. (°C)	Rep.	Tid (sek)	Temp. (°C)	Rep.	Tid (sek)	Temp. (°C)	Rep.
For-denaturering	30	98	1	40	98	1	30	98	1
Denaturering	10	98	34	10	98	35	10	98	34
Hybridisering	30	57		30	55		30	55	
Polymerisering	45	72		60	72		45	72	
Siste polymerisering	300	72	1	300	72	1	300	72	1

Program2 ble benyttet ved bruk av EPS-primersettene 2 og 3, Program4 ble benyttet ved bruk av 16S-primersettet, mens ITS-programmet ble benyttet ved bruk av ITS-primersettet. For hver runde med PCR ble det inkludert én prøve med vann som negativ kontroll, og ved bruk av EPS-primersettene ble også en positiv kontroll inkludert i form av *ARI*, *BF2* eller *Tett*.

2.4.5. Gjennomføring av gelelektroforese

Gelelektroforese ble benyttet for å undersøke om amplifisering i løpet av PCR var vellykket. Agarosegel, med SeaKem LE Agarose (Lonza, Rockland, USA), tilsatt GelRed Nucleic Acid (Biotium, Hayward, USA) ble benyttet. Gelen ble montert i elektroforesekar (BioRad), og PCR-produkt tilsatt Gel Loading Dye (New England BioLabs, Ipswich, USA) ble overført til hver brønn. En liten del av PCR-produktet, 3 eller 6 µL, ble overført til hver brønn, avhengig av størrelsen på brønnene. Ladder ble tilsatt i en egen brønn, og det ble benyttet Quick load 100 bp-ladder (New England BioLabs) og Quick load 1 kb-ladder (New England BioLabs) avhengig av lengde på PCR-produkter. Gelen ble kjørt ved 80V i 30 minutter (POWER PAC 300), og deretter tatt bilde av ved bruk av Gel Doc XR-systemet (BioRad). Denne prosedyren ble fulgt for alle prøvene som ble amplifisert med PCR.

2.4.6. Rensing av PCR-produkt

Det resterende PCR-produktet, det som ikke ble tatt ut til testing på gel, ble rensset ved bruk av QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Prosedyren vedlagt i settet ble fulgt, med noen endringer. Etanol (96%) ble tilsatt Buffer PE før bruk, etter anvisning på flasken. PCR-produktet ble fortynnet med Buffer PB, til en 1:5-blanding, og deretter ble alt prøvematerialet overført til en QIAquick-kolonne i et 2 mL samlerør. Kolonnen ble sentrifugert ved 16000 x g i 60 sekunder, og de resterende sentrifugeringene ble utført på samme måte. Eluatet i samlerøret ble helt ut, og kolonnen ble plassert tilbake i det samme samlerøret. 750 µL Buffer PE ble tilsatt kolonnen før ny sentrifugering. Eluatet ble helt ut, og kolonnen ble plassert tilbake i samlerøret. Kolonnen ble sentrifugert på nytt, for å fjerne rester av vaskebufferen, og deretter ble kolonnen plassert i et 1,5 mL eppendorfrør. 30 µL Elution buffer ble overført til sentrum av membranen i kolonnen, og kolonnen ble inkubert ved romtemperatur i ett minutt før den ble sentrifugert igjen. Renset PCR-produkt ble oppbevart ved -18°C.

2.4.7. Sekvensering

Prøver med rensset PCR-produkt ble sendt til sekvensering av 16S- og EPS-operonet. 5 µL rensset PCR-produkt og 5 µL av én av primerne som ble tilsatt PCR-reaksjonsblandingen for den aktuelle prøven ble blandet i et nytt eppendorfrør. Røret ble merket med strekkode fra Lightrun, og sendt til GATC-biotech for sekvensering.

2.4.8. ARISA

Prøver til ARISA ble amplifisert ved bruk av PCR. Tillaging av reaksjonsblanding til PCR med ITS-primersettet ble gjennomført som beskrevet i **Tabell 4**, og ITS-programmet beskrevet i **Tabell 5** ble benyttet ved PCR. 10 µL av PCR-produktet ble testet for produkt ved bruk av gelelektroforese. De resterende 10 µL av hver prøve ble fortynnet til med 90 µL miliQ-vann, til en 1:10-blanding. 1 mL Hi-Di™ formamid ble tilsatt 3 µL av standarden GeneScan LIZ1200 (Applied Biosystems, California, USA), og dette ble blandet godt. Deretter ble 10 µL av blandingen overført til hver av de 96 brønnene i en MicroAmp-reaksjonsplate med strekkode. 2 µL av de fortynnede PCR-produktene ble overført til hver sin brønn, og platen ble forseglet og sentrifugert. Platen ble deretter sendt til fragmentanalyse hos FIMM (Institute for Molecular Medicine, Helsinki, Finland). Resultatene fra ARISA ble analysert ved bruk av Peak Scanner (Life Technologies). I Peak Scanner ble topper med ITS-lengder mellom 350 og 1000 og høyde over 500 enheter ansett som frittstående OTUs. ITS-lengdene til toppene ble koblet med potensielt korresponderende mikroorganismer ved bruk av informasjon fra National Center for Biotechnology Information (NCBI). Informasjon om

ITS-lengde for de aktuelle organismene funnet eksperimentelt og *in silico*, ble samlet i en tabell. Data fra ARISA ble også analysert i R og Unscrambler. ANOSIM (analysis of similarity) og hierarkisk gruppeanalyse ble utført i R og PCA (principal component analysis) ble utført i Unscrambler.

3. Resultater

3.1. Resultater fra mikrobiologiske kulturavhengige undersøkelser

Resultatene fra de mikrobiologiske undersøkelsene av tettegras-bladene består av resultatene fra plateutspredningene, og fra sekvensering av 16S-DNA fra de kulturene som ble rendyrket.

3.1.1. Undersøkelse av bakterievekst

Alle prøvene, med unntak av DT3 og H3, ble spredd på skåler med ulike næringsagarer. Det ble forsøkt å registrere antall kolonier på skålene, men dette var krevende grunnet mye vekst. Et estimat på mengden vekst på M17-skålene, samt beskrivelse av koloniene er gitt i **Tabell 6**.

Tabell 6: Estimat av vekst på M17-skåler, samt beskrivelse av koloniene som vokste frem.


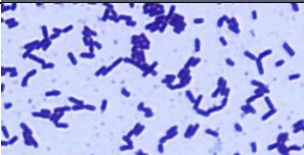
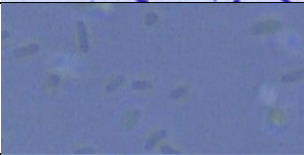
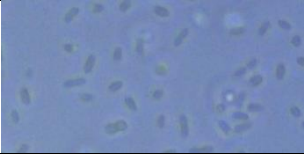



Sted	Kode	log cfu/mL	Beskrivelse
Hardanger	H	Sammenvokst	Store gule/beige sammenvokste kolonier
	H2	4,40	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	H4	Overgrodd	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
Damtjern	DT	Sammenvokst	Store gule/beige sammenvokste kolonier
	DT2	2,54	Små gjennomsiktige kolonier
	DT4	4,67	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
Røros	R1 I	4,69	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	R1 II	4,34	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	R2 I	4,34	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	R2 II	4,53	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	R3 I	2,90	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	R3 II	2,95	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	R4 I	Overgrodd	Svært små hvite/gjennomsiktige kolonier
	R4 II	4,97	Svært små hvite/gjennomsiktige kolonier
Lykkja	L1 I	2,82	Svært små matte hvite kolonier
	L1 II	4,41	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	L2 I	5,59	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
Vega	V1	2,30	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	V2	2,18	Små gjennomsiktige kolonier, noen matte hvite
	V3	Ingen vekst ved anaerobe betingelser	-
	V4		-
	V5		-

Ved registrering av vekst ble det observert at det var omtrent samme antall kolonier på BHI-skålene som på M17-skålene, og mikroskopering av koloniene fra de ulike skålene viste samme type mikroorganismer. Derfor ble M17-skålene benyttet for å estimere total mengde vekst. Det ble observert store forskjeller i antall bakteriekolonier på skålene, og på skålene med V3, V4 og V5 ble det ikke observert noe vekst ved anaerobe betingelser. Ellers ble minste antall, på log 2,18 cfu/mL, observert i V2, mens selv 10⁻⁴-fortynningene av R4 I og H4 var overgrodd. De høyeste fortynningene av H og DT var ikke overgrodd, men da koloniene var sammenvokste var det vanskelig å estimere antall kolonier. Det ble observert forskjeller mellom prøver fra ulike steder, men også mellom prøver fra samme sted. Vekst-registrering på skålene fra de første prøvene som ble undersøkt ga en indikasjon på hvilke fortynninger som var mest hensiktsmessige å benytte i senere forsøk. Det ble også observert at det var kolonier med ulikt utseende, og at de ulike koloniene brukte ulik tid på å vokse frem. De små matte hvite koloniene brukte lengre tid på å vokse frem enn de gjennomsiktige koloniene.

3.1.2. Rendyrkede kulturer

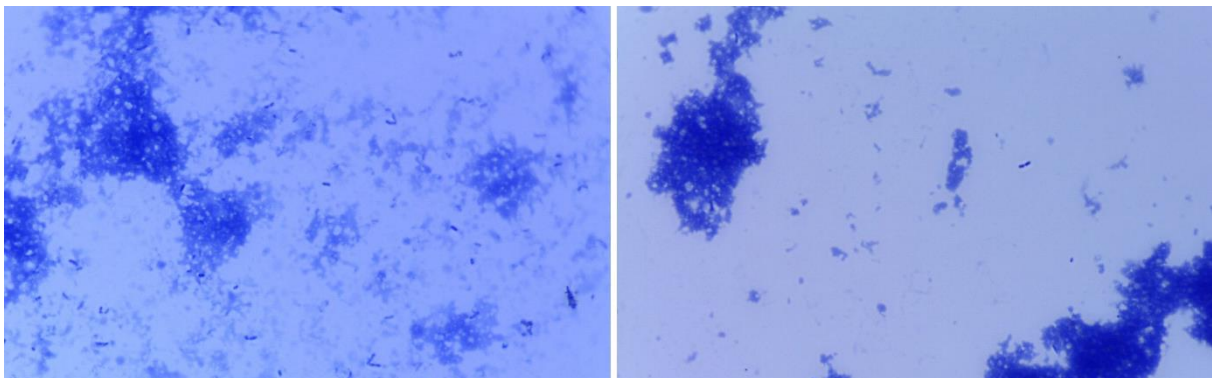
Det ble valgt ut kolonier fra de opprinnelige M17- og BHI-skålene til rendyrking på nye M17-skåler. Formålet var å finne melkesyrebakterier, som er Gram-positive og katalase-negative, og derfor ble kolonier valgt ut ved å teste deres reaksjon med KOH og H₂O₂. Koloniene ble også undersøkt i mikroskop. Kolonier som kunne være *L. lactis* subsp. *cremoris* ble plukket ut og rendyrket. Andre kolonier ble også valgt ut til rendyrking, da det var ønskelig å studere den generelle mikrobiotaen på tettebladene. Hvilken type bakterie som ble isolert ved rendyrking ble bestemt ved sekvensering av 16S-DNA fra renkulturene hos GATC. Sekvensene fra GATC ble plottet inn i nukleotid-databasen Basic Local Alignment Tool (BLAST), der det ble funnet treff med korresponderende 16S rRNA-gensekvenser. Resultatene fra sekvenseringen er gitt i **Tabell 7**. 16S-DNA fra den ene renkulturen, *ARI*, ble også sekvensert for å bekrefte identiteten.

Tabell 7: Identifikasjon av renkulturer isolert fra tettegras.

Kode for renkultur	Isolert fra:	Identifisert som:	Dekke (%)	Identitet (%)	
ARI	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	100	100	
C1	R2 I	<i>Carnobacterium divergens</i>	100	99	
C2	R2 I		100	99	
C3	R3 I		100	99	
C4	R2 II		100	99	
EB1	R4 II	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	100	99	
EB2	R4 II		100	99	
EP1	R1 II	<i>Erwinia persicina</i>	100	99	
EP2	R1 II		100	99	
EP3	R1 II		100	99	
PB1	R1 II	<i>Providencia burhodogranariae</i>	100	99	
P1	H	<i>Pseudomonas</i>	100	100	
S1	L1 I	<i>Staphylococcus warneri</i>	100	100	
S2	H2		100	100	

Treff i BLAST identifiserte renkulturene. «Dekke» angir andel (%) av sekvensen som overlapper referansesekvensen. «Identitet» gir likhet (%) mellom sekvensen og referansesekvensen i det aktuelle området. Bilder ble tatt av renkulturene i forbindelse med rendyrking. Renkulturene ble gitt navn etter organismen de ble identifisert som, «C» for *Carnobacterium*, «EP» for *Erwinia persicina* og så videre. Koloni «P1» ble isolert fra prøven H, som hadde vært inkubert aerobt. Denne typen kolonier var dominerende på H- og DT-skålene. Mikroskopering av denne og andre lignende kolonier viste motile stavbakterier, og etter Gramfarging ble det klart at de var Gram-negative. Sekvensering viste at dette var *Pseudomonas*. Det ble observert treff i BLAST med flere arter av *Pseudomonas*, blant annet *salomonii*, *meridiana* og *fluorescens*. Etter dyrking ved anaerobe betingelser ble det observert at vekst av ulike typer bakterier fra den Gram-negative og fakultativt anaerobe familien *Enterobacteriaceae* dominerte. Blant disse ble koloniene «EB1» og «EB2» identifisert som *Enterobacteriaceae bacterium*, «EP1», «EP2» og «EP3» ble identifisert som *Erwinia persicina*, mens koloni «PB1» ble identifisert som *Providencia burhodogranariae*. Noen Gram-positive og katalase-negative kolonier ble også rendyrket. Blant disse var koloniene «C1», «C2», «C3» og «C4» som alle ble identifisert som *Carnobacterium divergens*. I tillegg ble de Gram-positive og katalase-positive koloniene «S1» og «S2» identifisert som *Staphylococcus warneri*. Koloniene ble isolert fra skåler der det var mulig å plukke ut individuelle kolonier.

C. divergens og *S. warneri* viste enkelte fenotypiske trekk som kunne ligne *L. lactis* subsp. *cremoris*. Det ble derfor forsøkt å pøde renkulturene «C4» og «S2» i UHT-melk. Etter tre dager ved 19,5°C ble det observert dannelse av et koagel i røret med kultur «C4». Røret med kultur «S2» ga ikke dannelse av koagel. **Figur 7** viser bilder av koloni «C4» som vokste i melk.



Figur 7: Vekst av *C. divergens* i melk. Preparat farget med metylenblått.

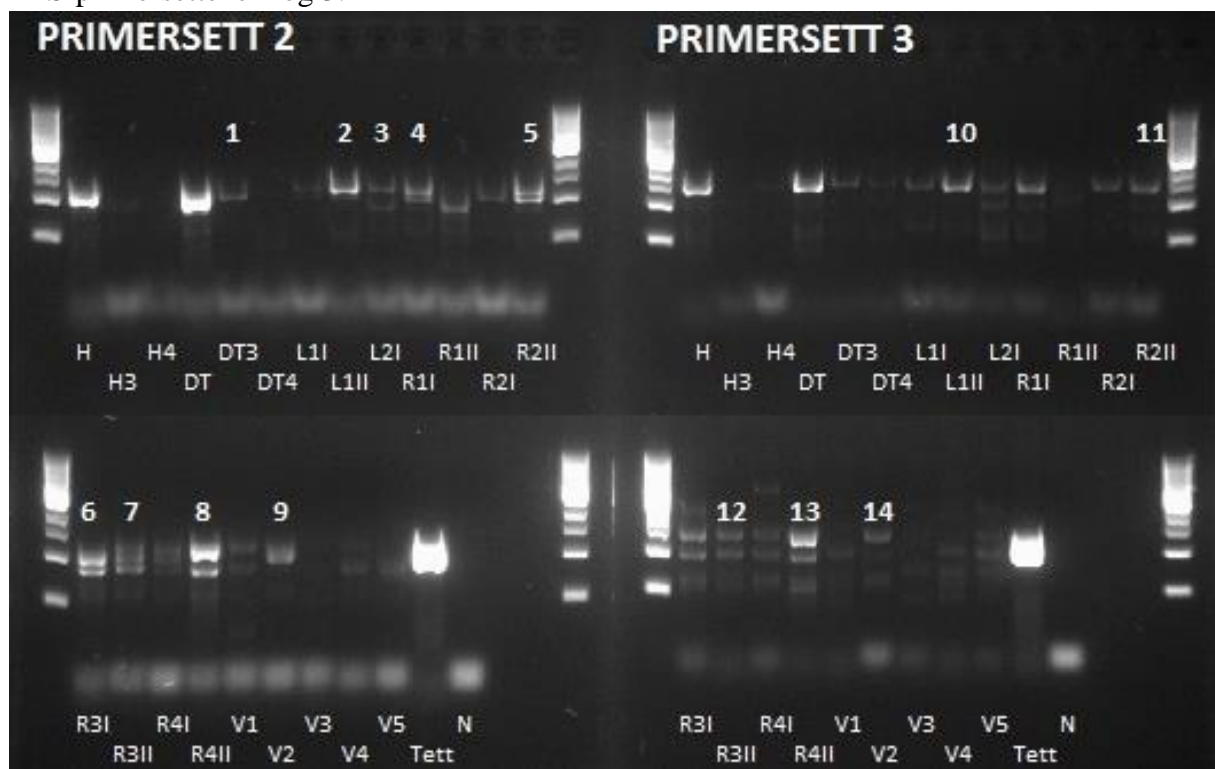
Figuren viser vekst av *C. divergens* i melk. Det ble observert lite vekst. pH ble målt i røret med melk podet med kultur «C4», og denne målingen viste pH på 6,34.

3.2. Resultater fra molekulære kulturuavhengige undersøkelser

Mikrofloraen på tettegrasbladene ble også undersøkt ved bruk av molekulære teknikker. DNA ble ekstrahert fra alle bladprøvene, med unntak av prøvene H2 og DT2 da det skjedde en feil i løpet av ekstraksjonen. Det var prøvene med ekstrahert DNA som ble analysert videre. DNA-konsentrasjonen i prøvene ble målt til å være for lav til å kunne måles (<0,010 µg/mL).

3.2.1. PCR med EPS-primersett

EPS-primersettet var konstruert til å amplifisere EPS-operonet til *L. lactis* subsp. *cremoris* dersom genet fra denne bakterien var til stede i DNA ekstrahert fra tettebladene. Disse DNA-prøvene var ekstrahert direkte fra tettebladene, og ikke fra renkulturer, så det ble antatt at de inneholdt flere typer DNA. Det ble benyttet to EPS-primersett, som hver amplifiserte en sekvens av EPS-operonet på litt over 1000 basepar. Sammen kunne de to primersettene amplifisere en større del av EPS-operonet. Gelelektroforese ble benyttet for å påvise dannelse av PCR-produkt. Primersettene var testet på renkulturene *ARI*, *BF2* og *Tett*, og da disse dannet bånd på gelen ble det antatt at primersettene fungerte til å amplifisere EPS-operonet. I **Figur 8** er det gitt en oversikt over alle prøvene som ble amplifisert ved bruk av PCR med EPS-primersettene 2 og 3.



Figur 8: Gelelektroforese av PCR-produkt ved bruk av EPS-primersett 2 og 3. Bånd ble dannet i de prøvene der amplifiseringen av DNA med EPS-primersettene var vellykket. Prøvene som ga båndene merket med tall ble sendt til sekvensering. Renkulturen *Tett* var inkludert som positiv kontroll.

Gelelektroforese av DNA fra bladprøvene amplifisert ved bruk av primersett 2 og 3 viste at PCR amplifiserte EPS-operonet i alle prøvene, men i noen prøver ga bare det ene primersettet PCR-produkt. Dette gjelder for prøvene H4, DT4 og V3 med primersett 2, og H3 med primersett 3. DNA fra renkulturen *Tett* ble tatt med som positiv kontroll. Det er tydelig forskjell mellom båndene som har blitt dannet. Båndet til renkulturen *Tett* er svært sterkt, mens DNA fra bladprøvene dannet svakere bånd. I noen tilfeller ble det dannet svært svake bånd og dette gjelder for H3, L1 I, R4 I, V1, V4 og V5 med primersett 2, og H4, DT4 og R1 II, V1, V3, V4 og V5 med primersett 3. DNA fra bladprøvene H, DT, L1 II, R1 I, R2 II, R3 I, R4 II og V2 dannet relativt sterke bånd ved bruk av begge primersettene. Enkelte av båndene i figuren er merket med tall. Disse prøvene ble sendt til sekvensering.

3.2.2. Sekvensering av PCR-produkter fra bladprøver

PCR-produktene som dannet de sterkeste båndene på gelen, i tillegg til noen av de som dannet svakere bånd, ble rensset og sendt til sekvensering hos GATC. Sekvensene fra GATC ble plottet inn i nukleotid-databasen BLAST, der det ble funnet treff med komplimentære sekvenser. Resultatene fra sekvenseringen og søk i BLAST er gitt i **Tabell 8**, i tillegg til hvilke primersett som ble benyttet ved PCR av DNA fra den aktuelle bladprøven. Prøvene som er direkte tilknyttet resultatene fra **Figur 8** er merket med tilsvarende tall, i tillegg til at tabellen også viser resultater fra tidligere sekvenseringer

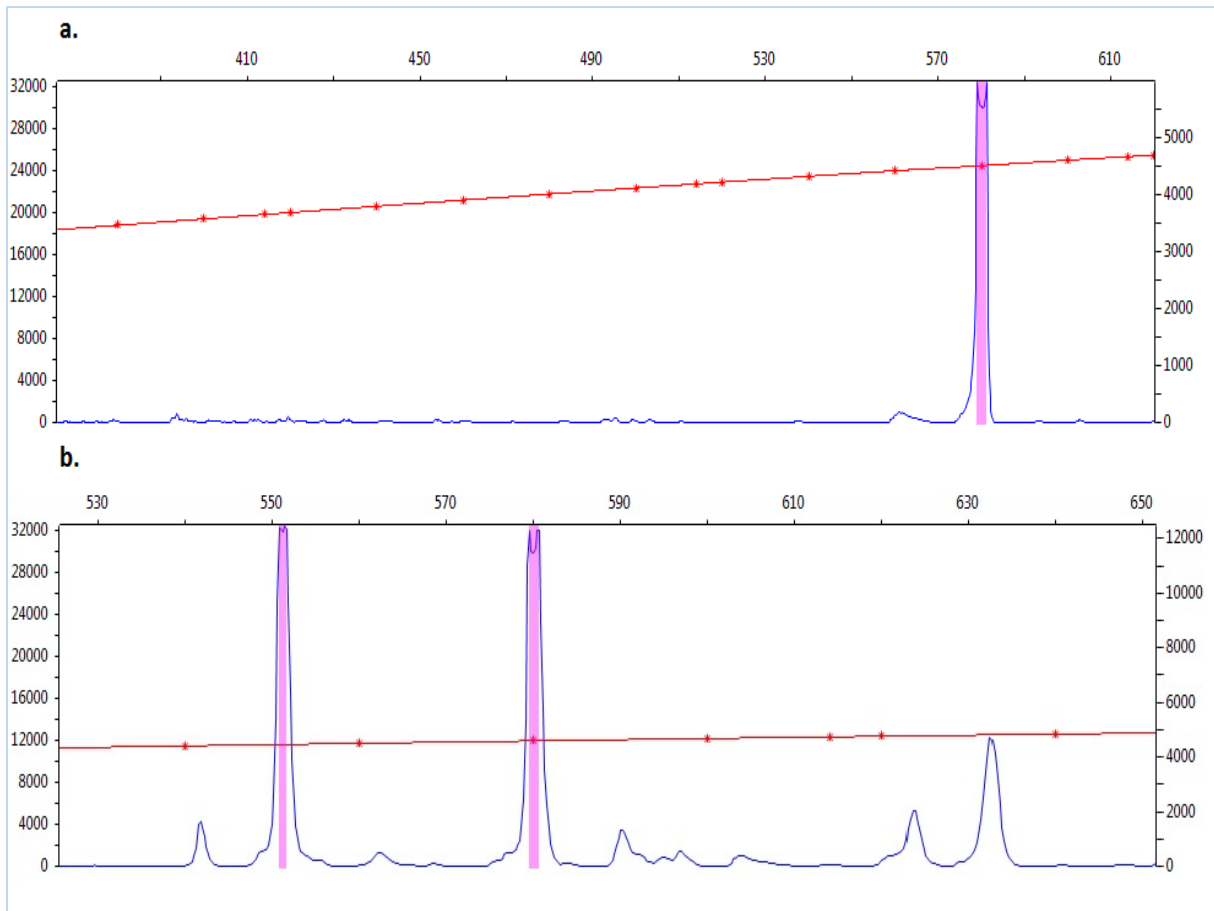
Tabell 8: Identifikasjon av DNA fra bladprøver amplifisert med EPS-primersettene 2 og 3.

Kode	Tall-kode	Primer-sett	Treff i BLAST	Identitet (%)	Dekke (%)
H		2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	100	100
		3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> EpsA (epsA), EpsB (epsB), EpsC (epsC), and undecaprenylphosphate glucosephosphotransferase (epsD) genes, complete cds	99	100
DT		2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	100	100
		3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> EpsA (epsA), EpsB (epsB), EpsC (epsC), and undecaprenylphosphate glucosephosphotransferase (epsD) genes, complete cds	100	100
DT3	1	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	99	100
DT4		2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	94	99
L1 II	2	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> EpsA (epsA), EpsB (epsB), EpsC (epsC), and undecaprenylphosphate glucosephosphotransferase (epsD) genes, complete cds	99	100
	10	3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pC1658	98	100
L2 I	3	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	85	98
R1 I	4	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	88	99
R2 II	5	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pC1658	98	100
	11	3	<i>Lactococcus lactis</i> exopolysaccharide biosynthesis gene cluster, complete sequence; and unknown genes	95	99
R3 I	6	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	88	99
R3 II	7	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	99	100
	12	3	<i>Lactococcus lactis</i> exopolysaccharide biosynthesis gene cluster, complete sequence; and unknown genes	87	98
R4 II	8	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pC1658	100	100
	13	3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pC1658	94	99
V1		2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> EpsA (epsA), EpsB (epsB), EpsC (epsC), and undecaprenylphosphate glucosephosphotransferase (epsD) genes, complete cds	99	100
		3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> EpsA (epsA), EpsB (epsB), EpsC (epsC), and undecaprenylphosphate glucosephosphotransferase (epsD) genes, complete cds	99	100
V2	9	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> plasmid pNZ4000, complete sequence	100	99
	14	3	<i>Lactococcus lactis</i> exopolysaccharide biosynthesis gene cluster, complete sequence; and unknown genes	85	97

PCR av DNA fra bladprøver viste at amplifisering av EPS-operonet var vellykket i de fleste tilfellene. Det var amplifisert DNA fra prøvene H3, H4, L1 I, R1 II, R2 I, R4 I, V3, V4 og V5 som ikke dannet kraftige nok bånd på gel til at de ble sendt til sekvensering. Primersett 2 ga god amplifisering av EPS-operonet i DNA fra prøvene H, DT, DT3, DT4, L1 II, L2 I, R1 I, R2 II, R3 I, R3 II, R4 II, V1 og V2, og sekvensering av disse PCR-produktene viste treff med sekvenser fra *L. lactis* subsp. *cremoris*. Primersett 3 ga god amplifisering av EPS-operonet i DNA fra prøvene H, DT, L1 II, R2 II, R3 II, R4 II, V1 og V2, og sekvensering av disse PCR-produktene viste også treff med sekvenser fra *L. lactis* subsp. *cremoris*. Alle treffene viste stor grad av dekke og identitet. H, DT og R4 II ble identifisert med 100% dekke og identitet, mens laveste grad av dekke og identitet, på henholdsvis 97 og 85%, ble observert for V2 amplifisert med primersett 3. Det ble observert treff med flere referansesekvenser, og i flere tilfeller var referansesekvensene plasmidsekvenser.

3.2.3. ARISA-resultater

ARISA ble benyttet til å analysere den totale mikrobiotaen på tettebladene. Alle prøvene som ble sendt til ARISA ble testet for vellykket amplifisering av spacer-regionen ved bruk av gelelektroforese. *ARI*, *BF2* og *Tett* ble også sendt til ARISA som positive kontroller. Resultatene fra ARISA ble bearbeidet i Peak Scanner. ARISA var ikke vellykket i prøvene H3 og L2 I, og dermed var det ikke noen resultater fra disse prøvene. En mulig årsak til dette kan være at DNA i disse prøvene ble degradert i løpet av frakt. H3 og L2 I ble dermed ikke inkludert i de videre bearbeidingene av ARISA-resultatene. DNA fra de resterende bladprøvene ga resultater i ARISA, og disse ble bearbeidet videre i Excel, Unscrambler og R. Bearbeiding av ARISA-resultatene i Peak Scanner viste ARISA-profilene som DNA fra de ulike bladprøvene dannet. Hver topp viser prosentandel av DNA med én bestemt lengde på spacer-regionen (ITS-lengde) i en prøve, og hver topp kan dermed vise til ulike mikroorganismer. Topper med stort areal viser til høy tilstedeværelse av den aktuelle organismen i den totale mikrobiotaen. I **Figur 9** er det gitt eksempler på topper som DNA fra *Tett* og V4 dannet, altså ARISA-profilene til disse prøvene.



Figur 9: ARISA-profil i Peak Scanner. a. Topper dannet med DNA fra renkulturen *Tett*, b. Topper dannet med DNA fra bladprøven V4.

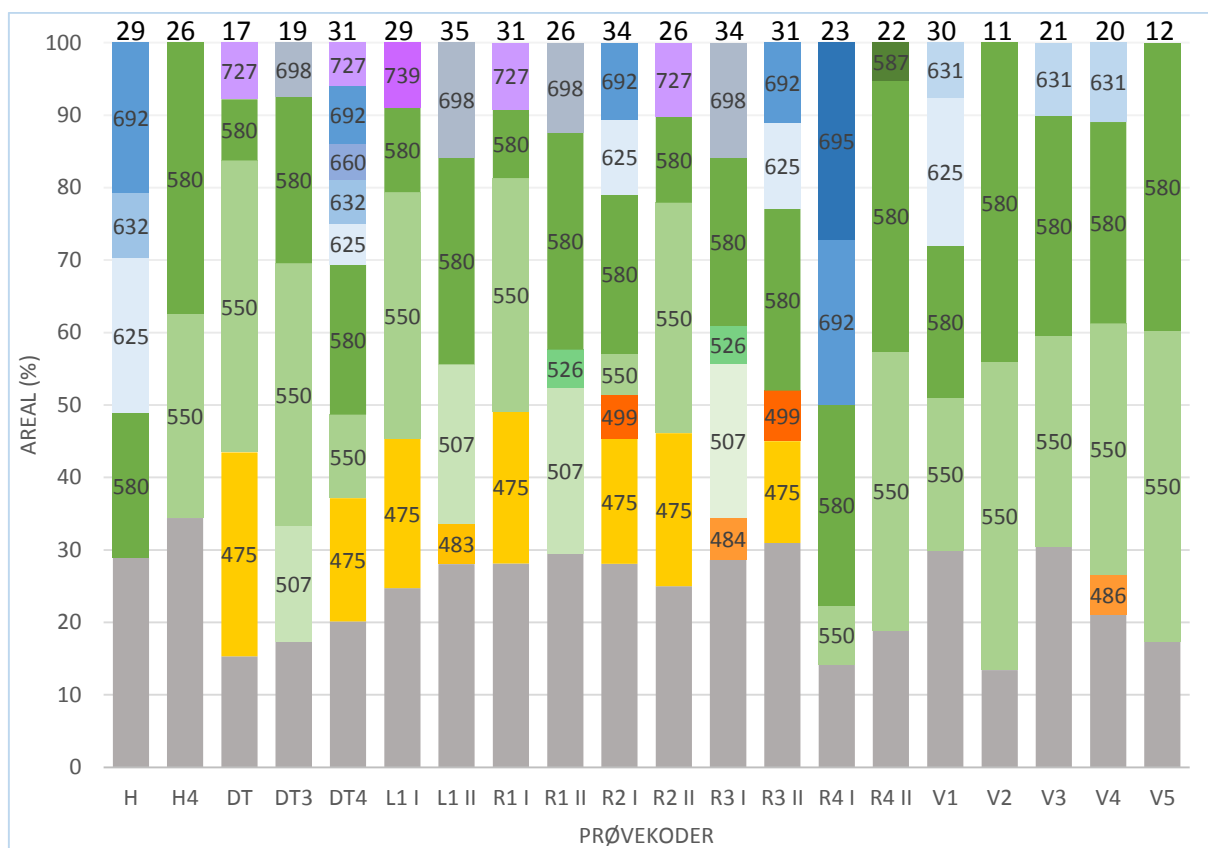
DNA fra *Tett* dannet én dominerende topp med ITS-lengde 580. Denne toppen ble også observert i ARISA-profilen til V4, men DNA fra denne bladprøven ga også dannelse av topper med andre ITS-lengder. Sistnevnte var tilfellet for DNA fra alle bladprøvene. Toppene med ITS-lengde 550 og 580 var to av de mest dominerende toppene totalt sett. DNA fra de andre renkulturene, *ARI* og *BF2*, dannet også topp med ITS-lengde 580. Ellers dannet DNA fra bladprøvene også andre topper, og noen av disse ble observert i ARISA-profilene til flere av bladprøvene. Toppene med ulike ITS-lengder kunne kobles med ITS-lengder funnet *in silico*, ved søk etter lengden på spacer-regionen til ulike organismer i NCBI. **Tabell 9** kobler enkelte topper fra ARISA-profilene med potensielt korresponderende ITS-lengder og mikroorganismer i NCBI (NCBI 2015).

Tabell 9: Kobling av ITS-lengder funnet eksperimentelt med ITS-lengder funnet *in silico* og potensielt korresponderende mikroorganismer. Informasjon er hentet fra NCBI (NCBI 2015).

ITS-lengder fra ARISA-profil			ITS-lengder funnet <i>in silico</i>			Mikroorganismer som korresponderer med ITS-lengden funnet <i>in silico</i>
580	-	-	584	-	-	<i>Lactococcus lactis</i>
550	-	-	553	-	-	<i>Streptococcus thermophilus</i>
499	507	727	499	506	727	<i>Carnobacterium</i> subsp.
660	-	-	662	-	-	<i>Staphylococcus warneri</i>
631	632	-	632	633	-	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>

Tabellen gir en indikasjon på hvilke mikroorganismer toppene i ARISA-profilene kan korrespondere med. I de fleste tilfellene samsvarer ikke ITS-lengdene funnet eksperimentelt med ITS-lengdene funnet *in silico*. Dette gjelder for alle toppene, unntatt for de med ITS-lengde 499, 727 og 632.

ARISA-resultatene viste at det var mange topper med ulike ITS-lenger, og med ulike areal. I Excel ble toppene med areal på under 5% samlet under ett, med betegnelsen «små topper», og topper med areal over 5% ble ansett som frittstående OTUs. En oversikt over de dominerende toppene angitt som lengde på spacer-regionen (ITS-lengde), i tillegg til de små toppene, i hver prøve er gitt i **Figur 10**.

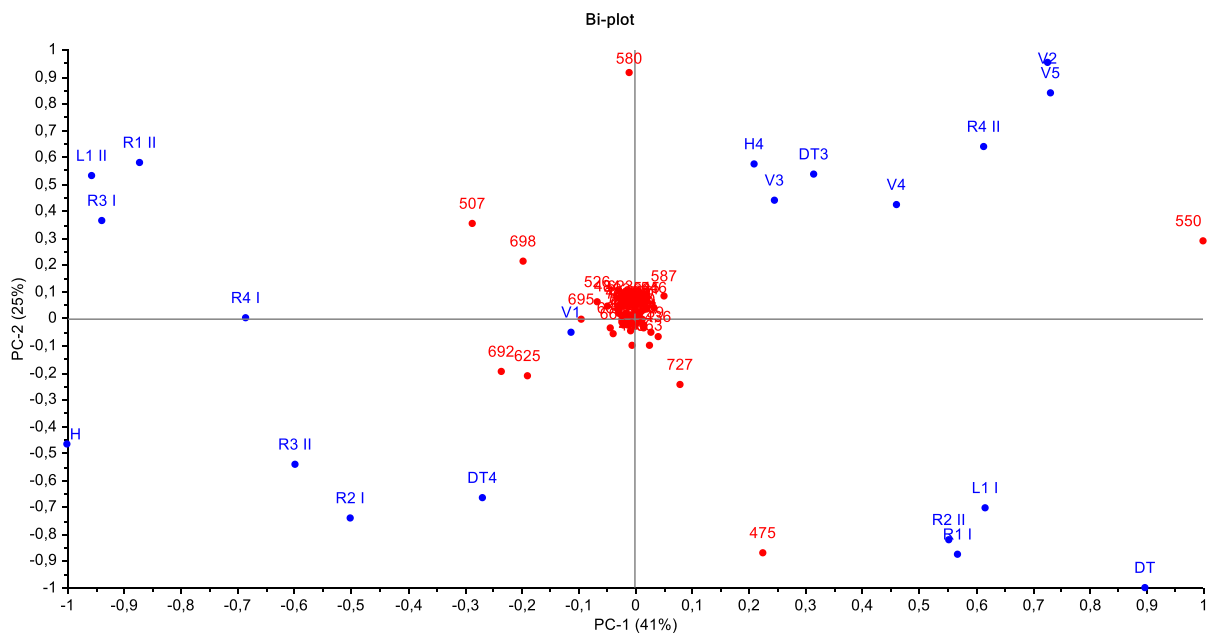


Figur 10: Dominerende topper og deres areal. Oversikt over de dominerende toppene, angitt som lengde på spacer-regionen, som ble registrert i de ulike prøvene. Gule områder er topper med lengdene 400-499, grønne områder er topper med lengdene 500-599, blå områder er topper med lengder 600-699 og fiolette områder er topper med lengder 700-799. De grå områdene gir andelen av arealet de små toppene utgjør av det totale arealet. Det totale antallet topper i hver prøve er angitt som et tall over hver stolpe. Areal er gitt i prosent (%).

Figuren viser at de små toppene (<5%) utgjør ulike andeler av totalarealet i de ulike prøvene. Mange av de dominerende toppene ble observert i flere av prøvene, og dette gjelder spesielt for toppene med ITS-lengdene 550 og 580. Blant toppene med areal under 5% i prøve R2 I er toppen med ITS-lengde 727. Over hver søyle er det totale antallet frittstående topper (OTUs) i prøvene angitt. Det ble observert ulikt antall topper i hver prøve. Vega-prøvene V2 og V5 skilte seg ut med veldig få topper sammenlignet med de andre prøvene.

Det ble også utført statistiske analyser på samtlige av resultatene fra ARISA. ANOSIM (analysis of similarity) ble utført for å undersøke om det fantes signifikante likheter mellom den totale mikrobiotaen på tetteblader fra de ulike områdene. Det var nødvendig med data fra tre prøver for å utføre ANOSIM, og dermed ble det ikke mulig å inkludere prøvene fra Hardanger og Lykkja da det manglet ARISA-resultater fra H3 og L2 I. ANOSIM ble utført med data fra Røros-, Damtjern- og Vega-prøvene, og resultatene fra denne analysen er presentert i **Tabell 10**.

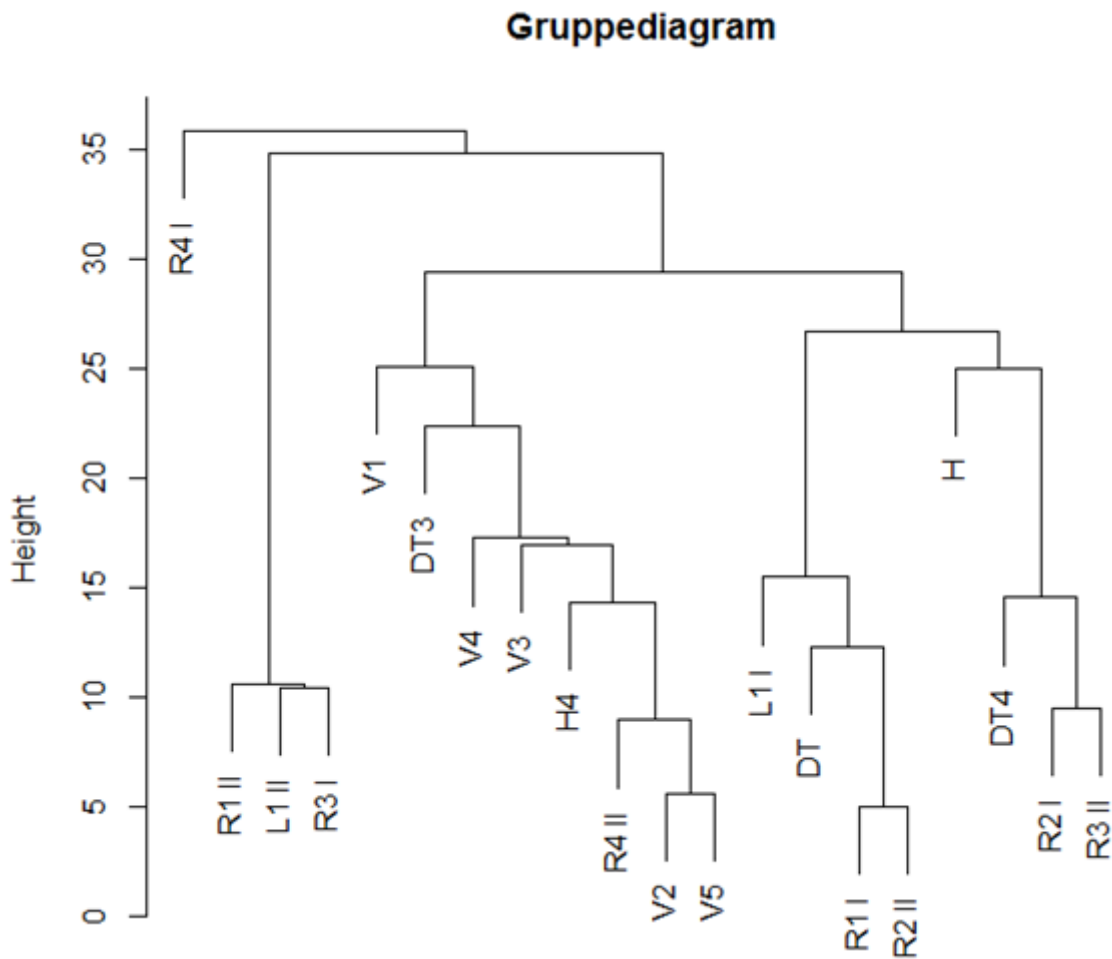
Figur 12 viser Bi-plottet fra PCA der verdien til toppene ikke ble standardisert.



Figur 12: Bi-plott fra PCA der verdien til toppene ikke er standardisert.

I denne analysen ble toppene vektet avhengig av verdi. Summen av PC1 og PC2 forklarer hele 66% av totalvariansen. Resultatene i dette plottet viser visse tendenser. De toppene som utgjør en mindre del av totalarealet er plassert i en tett gruppe i midten av plottet, mens de toppene som utgjør store deler av det totale arealet er plassert for seg selv. Dette gjelder spesielt for toppene med ITS-lengdene 580, 550 og 475. Toppen med ITS-lengde 580 er plassert høyt oppe i midten av plottet, mens toppen med ITS-lengde 550 er plassert langt mot høyre. Tendenser til grupperinger av prøvene kan observeres. Prøvene fra Vega, med unntak av V1, er plassert øverst til høyre. Sammen med V2 og V5 er også R4 II plassert høyt oppe i høyre hjørne. R2 II, L1 I, R1 I og DT er plassert nede i høyre hjørne. Prøvene L1 II, R1 II og R3 I er plassert langt til venstre og høyt oppe i plottet. Ellers ble det ikke observert noen klare tendenser til at prøver fra samme sted nødvendigvis er plassert i nærheten av hverandre.

Data fra ARISA ble også analysert ved bruk av en hierarkisk gruppeanalyse. Denne analysen plasserte prøvene inn i hierarkiske grupper avhengig av hvilke topper som fantes i de ulike prøvene og hvor stor andel de ulike toppene utgjorde. Resultatene fra gruppeanalysen er presentert i **Figur 13**.



Figur 13: Gruppediagram. Prøvene er plassert i grupper sammen med andre lignende prøver.

Det ble benyttet «single-linkage», og euklidisk distanse. Y-aksen, «Height», viser et mål på avstanden mellom individuelle prøver eller grupper. Stor avstand viser til større ulikhet mellom prøver eller grupper. Gruppediagrammet viser at det er noen forskjeller mellom prøvene. Det ble ikke observert noen tendens til at prøver fra samme sted befant seg i samme gruppe, og heller ikke at prøver fra blader i samme flaske befant seg i samme gruppe. Ellers kan grupper defineres ut fra hvilket nivå som spesifiseres langs Y-aksen. «Height» på 15 definerer fire ulike grupper, men dette nivået dekker bare sju individuelle prøver. På «Height»-nivå 28 defineres tre grupper, og alle prøvene unntatt R4 I dekkes.

3.3. Sammenligning av resultater

For å få bedre oversikt og for å gjøre det lettere å sammenligne de ulike resultatene ble resultatene fra PCR av DNA fra bladprøvene med EPS-primersettene (**Figur 8**), ARISA (**Figur 10**) og sekvensering av DNA fra bladprøvene (**Tabell 8**) summert i **Tabell 11**.

Tabell 11: Samsvar mellom dannelse av bånd på gel og dannelse av topper med ITS-lengde 580. Styrken på båndene beskrives med tallene 0-5, der 0 er ingen synlige bånd, og 5 er mest synlige bånd (*Tett*). «X» markerer hvilke av prøvene som ble sekvensert, og som ga treff med *L. lactis* subsp. *cremoris* i BLAST.

	PRØVEKODE																					
	H	H3	H4	DT	DT3	DT4	L1I	L1II	L2I	R1I	R1II	R2I	R2II	R3I	R3II	R4I	R4II	V1	V2	V3	V4	V5
Styrke på bånd med EPS-sett2 (Figur 8)	4	1	0	4	2	0	1	3	2	3	3	2	3	3	2	1	4	1	2	0	1	1
Styrke på bånd med EPS-sett3 (Figur 8)	4	0	1	4	2	1	2	3	2	3	1	2	2	3	2	2	4	1	2	1	1	1
Andel av 580 (%) (Figur 10)	20	27	-	8	23	21	12	28	-	9	30	22	12	23	25	28	37	21	44	30	28	40
Treff med <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> i BLAST (Tabell 8)	X			X	X	X		X	X	X			X	X	X		X	X	X			

Sammenligningen viser at gelelektroforese av amplifisert DNA fra bladprøvene ga bånd med ulik styrke. Ingen av båndene som ble dannet med DNA fra bladprøver var like sterke som bånd dannet med DNA fra renkulturen *Tett* (**Figur 8.**). Bruk av primersett 2 ga ikke amplifisering av DNA i prøvene H4, DT4 og V3, mens primersett 3 ga ikke amplifisering av DNA i H3. Toppene med ITS-lengde 580 utgjorde ulik andel av det totale arealet i de ulike prøvene. Det ble ikke observert noen direkte sammenheng mellom styrke på bånd og andel av topper med ITS-lengde 580. DNA fra prøvene DT og R1 I dannet relativt sterke bånd på gelen, men andelen av 580-topper var lav. DNA fra prøvene H3, V3, V4 og V5 dannet veldig svake, eller ingen, bånd på gel, samtidig som andelen av topper med ITS-lengde 580 var svært høy. Sekvensering ble kun utført på de prøvene som dannet synlige bånd.

4. Diskusjon

Fokuset i denne oppgaven var å forsøke å påvise EPS-produserende *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* på blader til *Pinguicula vulgaris*, kjent som tettegras. Dersom *L. lactis* subsp. *cremoris* ble oppdaget på tettegraset ville det forklare noe av sammenhengen mellom tettegras og tettemelk, som de gamle folkefortellingene forteller om. For å danne et mer helhetlig bilde av tettegrasets mikrobiota inkluderte arbeidet med oppgaven også identifisering av andre mikroorganismer på denne planten. I løpet av det praktiske arbeidet med oppgaven ble både mikrobiologiske og molekylære metoder benyttet for å forsøke å finne disse EPS-produserende laktokokkene. Spesielt spennende var det å se om bruken av nye molekylære metoder ville gi en mer total oversikt over mikrobiotaen på tettegras, og om de ville avsløre tilstedeværelse av EPS-produserende stammer av *L. lactis* på bladene.

Det har blitt utført forsøk på å isolere EPS-produserende bakterier fra tettegras siden 1899, da det ble oppdaget at tilstedeværelse av slike bakterier var årsaken til den spesielle konsistensen til tettemelk. Flere rapporter forteller om forsøk på å lage tettemelk ved bruk av tettegras, men i de fleste av disse tilfellene ble det bare dannet et tykt produkt uten trådtrekkende egenskaper. Det er kjent at tettegras vil koagulere melk som følge av enzymaktivitet (Furuset 2008), så dannelsen av et tykt produkt er forventet ved inokulering av tetteblader i melk. Haug (1996) og Faye (2010) fant at etter mange gjentatte runder med ompodning av melk inokulert med tettegras i ny melk, at det ble dannet et produkt med den tyktflytende og trådtrekkende konsistensen som er karakteristisk for tettemelk (Faye 2010; Haug 1996). Vellykket produksjon av tettemelk fra tettegras kan være noe av grunnen til at sammenhengen mellom tettemelk og tettegras ikke har blitt fullstendig avkreftet.

Denne måten å produsere tettemelk på kan sammenlignes med beskrivelsene av den tradisjonelle produksjonsmetoden for fermenterte matprodukter, der vekst av den naturlige mikrobiotaen i råvarene gir utvikling til spontan fermentering. Produktet som dannes ved spontan fermentering optimaliseres ved å pøde nytt råmateriale med det fermenterte produktet, såkalt «backslopping» (Leroy & De Vuyst 2004). En slik metode kan resultere i utvikling av tettemelk fra tettegras dersom EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* er til stede på tettegraset, og dersom prosessen med påfølgende ompodninger selekterer for vekst av disse organismene. Backslopping resulterer i at de best tilpassede mikroorganismene blir dominerende (Leroy & De Vuyst 2004). EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* har flere egenskaper som gjør dem konkurransedyktige i melk. Som andre melkesyrebakterier danner *L. lactis* subsp. *cremoris* melkesyre, som virker inhiberende på andre mikroorganismer. EPS-

produksjon vil i tillegg beskytte cellene til *L. lactis* subsp. *cremoris* mot bakteriofag-angrep (Cavanagh et al. 2015). De laktokokkene som eventuelt befinner seg på tettegras vil tilhøre ville stammer, og slik stammer har ofte evne til å danne antimikrobielle komponenter, slik som bakteriosiner, for å kunne overleve i et fiendtlig miljø (Leroy & De Vuyst 2004). Et eksempel er at flere stammer av *L. lactis* er kjent for å kunne produsere bakteriosinet nisin (Kleerebezem et al. 2002). Alle disse egenskapene vil gjøre laktokokker konkurransedyktige, og dermed gjøre det mulig for dem å ende opp som de dominerende organismene i for eksempel en tettekultur til tross for at de i utgangspunktet ikke var dominerende. Dette kan være med på å forklare hvordan det er mulig å danne en tettekultur fra tettegras.

4.1. EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* på tettegras

I arbeidet med denne oppgaven ble mikrobiotaen til tettegras undersøkt ved å spre ut plantemateriale fra tettegras på M17- og BHI-skåler. Resultatene fra utspreidningene viste generelt sett mye vekst. Dette var ikke uventet, da planter er habitat for mange ulike mikroorganismer (Bulgarelli et al. 2013). Mye vekst på skålene gjorde det vanskelig å identifisere kolonier som skilte seg ut, i tillegg til at det ble vanskeligere å plukke ut individuelle kolonier. De to første prøvene som ble studert viste vekst av obligat aerobe organismer. Ved sammenligning viste renkulturene *ARI*, *BF2* og *Tett*, som ble brukt som referansekulturer, god vekst på M17 ved anaerob inkubasjon. For å gjøre det mulig å isolere eventuelle laktokokker var det nødvendig med tiltak som kunne inhibere vekst av kolonier som ikke kunne være laktokokker. Som andre melkesyrebakterier er laktokokker fakultativt anaerobe (Adams & Moss 2008a), og anaerob inkubering ble dermed tatt i bruk da det ville inhibere vekst av obligate aerobe organismer samtidig som fakultativt anaerobe fikk bedre konkurransevilkår (Reuter 1985).

Det lyktes ikke å påvise *L. lactis* subsp. *cremoris* på tettegras ved bruk av tradisjonelle mikrobiologiske metoder i arbeidet med denne oppgaven, da ingen av de rendyrkede koloniene ble identifisert som laktokokker. Dette betyr ikke at disse organismene ikke finnes på tettegras. Melkesyrebakterier vokser generelt sett langsomt, i tillegg til at de danner små kolonier (Reuter 1985). Det ble registrert mye vekst på skålene, og trolig var mikrobiotaen på tettebladene for kompleks til at laktokokker klarte å konkurrere mot mer opportunistiske mikroorganismer. Dette kan ha ført til at eventuelle laktokokker ikke var mulig å oppdage som følge av at andre kolonier dominerte. Det er også mulig at de andre organismene til stede på bladene kan produsere komponenter som inhiberer vekst av laktokokker, slik som bakteriosiner.

I forbindelse med dette arbeidet ble tettegras samlet inn fra ulike steder, og deretter fryst ned i en blanding av Ringers-løsning og glyserol for å kunne undersøke mikrobiotaen på bladene på et senere tidspunkt. Prøver av tettegras som har vært samlet inn til tidligere forsøk har vært fryst i melk, og i disse tilfellene har bakteriene overlevd nedfrysning (Faye 2010; Haug 1996). Dette arbeidet handlet om å forsøke å finne laktokokker på tettegras blant annet ved bruk av molekylære metoder, og det var dermed ugunstig å fryse bladene i melk da det kunne føre til at DNA fra melken blandet seg med DNA fra bladene. Det burde vært gjort forsøk på å fryse renkulturer av *L. lactis* subsp. *cremoris* i blandingen av Ringers-løsning og glyserol før plante-prøvene ble samlet inn, for å undersøke om disse bakteriene kan overleve nedfrysning i denne blandingen. Dersom laktokokkene ikke overlevde nedfrysning i denne blandingen ville det forklart hvorfor det ikke lyktes å isolere disse bakteriene fra tettegras

Det har tidligere blitt registrert at denne EPS-produserende stammen med *L. lactis* subsp. *cremoris* har andre vekstkrav sammenlignet med andre laktokokker (Faye 2010). Laktokokker er mesofile bakterier, og vokser optimalt ved rundt 30°C (Walstra et al. 2006c). I løpet av arbeidet med «Business related biotechnology at UMB» ble det oppdaget at de EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* vokste optimalt ved 22°C (Faye 2010). Dette kan tyde på at disse stammene stiller andre krav til vekstforhold enn andre laktokokker, noe som gjør det mer krevende å tilpasse vekstforholdene for å optimalisere vekst. I disse forsøkene var bruk av M17-næringsagar med laktose i tillegg til anaerob inkubering de eneste tiltakene som ble gjort for å fremme vekst av laktokokker. Dette kan bety at det er nødvendig med videre modifisering av vekstmedium og vekstvilkår for å gjøre det mulig å isolere eventuelle *L. lactis* subsp. *cremoris* fra tettegras. Slike vekstfremmende tiltak kan gi laktokokkene det konkurransefortrinnet de trenger for å være i stand til å vokse.

Bruk av molekylære metoder til å påvise tilstedeværelse av *L. lactis* subsp. *cremoris* på blader fra tettegras har vært lite utprøvd. PCR med de egenkonstruerte primersettene var det første som ble prøvd i forbindelse med dette arbeidet. DNA fra de EPS-produserende renkulturene *ARI*, *BF2* og *Tett*, og fra bladprøvene H og DT, ble amplifisert ved bruk av EPS-primersettene. Dannelse av PCR-produkt ble påvist i alle disse DNA-prøvene ved bruk av gelelektroforese. Renkulturene dannet sterke bånd, og det ble konkludert at EPS-primersettene fungerte til å amplifisere EPS-operonet. Dannelse av produkt ved PCR av DNA fra bladprøvene med EPS-primersettene kan indikere tilstedeværelse av EPS-produserende laktokokker på bladprøvene, da dette betyr at EPS-operonet også ble amplifisert i DNA fra disse prøvene. Sammenligning av båndene viste at PCR-produktene fra renkulturene dannet

sterkere bånd enn produktene som DNA fra bladprøvene dannet, noe som betyr at konsentrasjonen av DNA fra EPS-produserende laktokokker var større i renkulturene. EPS-primersettene ble benyttet videre til PCR av DNA ekstrahert fra de resterende bladprøvene. Resultatene viste at det ble dannet bånd i de fleste av prøvene. Det ble observert store forskjeller i styrken på båndene som ble dannet, som betyr at det var ulik konsentrasjon av DNA i bladprøvene før PCR. At det ble dannet bånd med ulik styrke kan tyde på at EPS-produserende laktokokker befinner seg på bladene i ulike mengder.

PCR-produktene som viste tydelige bånd på gelen ble sendt til sekvensering, for å finne ut hvilke organisme de amplifiserte sekvensene stammet fra. De to primersettene var konstruert slik at hver av dem amplifiserte en sekvens på litt over 1000 basepar av EPS-operonet til EPS-produserende *L. lactis*. Søk etter komplementære sekvenser i BLAST viste at alle de amplifiserte sekvensene viste likhet med EPS-operonet i genomet til EPS-produserende stammer av *L. lactis*, eller med plasmider til slike melkesyrebakterier. Sekvensene fra DNAet til bladprøvene viste ulik grad av dekke, som vil si hvor stor andel av sekvensen som overlapper referansesekvensen, i tillegg til ulik grad av identitet, som vil si likhet mellom sekvensen og referansesekvensen i det aktuelle området. Stor grad av dekke og identitet betyr at det er stor grad av komplementaritet mellom sekvensen fra DNAet til bladprøven og referansesekvensen. Sannsynligheten for at sekvensene stammer fra samme organisme øker med økende grad av komplementaritet. Det ble observert ulike grader av dekke og identitet, men aldri lavere enn henholdsvis 97 og 85%. Dette vil si stor grad av komplementaritet, noe som styrker teorien om at EPS-produserende laktokokker, muligens i form av *L. lactis* subsp. *cremoris*, kan finnes på tettebladene.

Genene som er ansvarlig for dannelse av EPS, *eps*-genene, kan finnes i genomet til *L. lactis* subsp. *cremoris*, eller på store plasmider (Kleerebezem et al. 2002). Dette viste også resultatene fra sekvenseringen utført i løpet av det praktiske arbeidet, da det ble funnet treff med både genom- og plasmidsekvenser i BLAST. Plasmider kan overføres mellom ulike bakterier, såkalt horisontal genoverføring, ved konjugasjon. Dermed er egenskaper tilknyttet plasmider ustabile, da genene som koder for disse egenskapene forsvinner med plasmidene (Cavanagh et al. 2015). Dette betyr at stammer av *L. lactis* subsp. *cremoris*, som opprinnelig var EPS-produserende, kan være til stede på tettegras uten å være i stand til å produsere EPS. Disse laktokokkene ville det ikke være mulig å oppdage ved bruk av EPS-primere, da de ikke har EPS-operonet.

ARISA kan benyttes for å analysere total mikrobiota (Fisher & Triplett 1999). I dette tilfellet ble DNA fra alle bladprøvene analysert, og deretter ble det forsøkt å finne toppler i ARISA-profilene til de ulike bladprøvene som kunne være laktokokker. De ulike toppene i ARISA-profilen viser til ulike mikroorganismer med ulike lengder på spacer-regionen (ITS-lengde) (Fisher & Triplett 1999), og databasen NCBI kan koble ITS-lengdene til de ulike toppene i ARISA-profilen med potensielt korresponderende organismer (NCBI 2015).

ITS-lengden for laktokokker funnet *in silico* er 584 (NCBI 2015). Resultatene fra ARISA viste ikke toppler med nøyaktig denne ITS-lengden, men det ble observert at DNA fra samtlige av bladprøvene ga dannelse av en topp med ITS-lengde 580. Det er mulig at disse ITS-lengdene kan korrespondere til samme organisme, men det var nødvendig å sammenligne med ARISA-profilene til renkulturene *ARI*, *BF2* og *Tett* for å bekrefte ITS-lengden til laktokokker eksperimentelt. DNA fra renkulturene dannet også toppler med ITS-lengde 580. Disse renkulturene er kjente laktokokker, og dersom DNA fra en bladprøve danner den samme toppen som DNA fra en av renkulturene kan det bety at de samme organismene befinner seg i begge disse prøvene. Dette gir gode indikasjoner på at laktokokker kan befinne seg på alle bladprøvene, da DNA fra samtlige av disse prøvene dannet toppler med ITS-lengde 580. Grunnen til at dette likevel ikke er helt sikkert er at andre organismer også kan ha spacer-regioner med omtrent denne ITS-lengden. Dette gjelder for eksempel for ulike arter av *Mycobacterium* og *Legionella*, som har spacer-regioner med ITS-lengde på henholdsvis 580 og 583 (NCBI 2015). NCBI inneholder kun informasjon om kjente organismer, og det er dermed mulig at andre hittil ukjente organismer kan danne den samme toppen som *L. lactis*. Dette betyr at det er nødvendig å sekvensere 16S-DNA fra disse prøvene for å kunne si noe sikkert.

Dersom det stemmer at toppene med ITS-lengde 580 tilsvarende tilstedeværelse av laktokokker på tettegras, betyr dette at laktokokker kan utgjøre en betydelig del av mikrobiotaen på denne planten. Andelen av det totale arealet denne toppen utgjør i de ulike prøvene varierer fra 8% i DT, til 44% i V2. Samtidig viser resultatene fra gelelektroforese at DNA fra de ulike prøvene inneholdt ulike konsentrasjoner av DNA fra EPS-produserende laktokokker, da det ble dannet bånd med ulik styrke. Ved sammenligning var det tydelig at størrelsen på toppene med ITS-lengde 580 i de ulike prøvene ikke nødvendigvis korresponderte med dannelse av sterke bånd på gel. Et eksempel er at DNA fra bladprøven V5 dannet en stor topp med ITS-lengde 580, til tross for at PCR-produktene med begge primersettene dannet noen av de svakeste båndene på gelen. Årsaken til at styrken på bånd og arealet til toppen med ITS-lengde 580 ikke samsvarer

kan være at det ikke bare er EPS-produserende laktokokker som har spacer-region med ITS-lengde 580. Denne ITS-lengden kan korrespondere med andre stammer av *L. lactis* (NCBI 2015), og dette kan dermed bety at alle laktokokker som eventuelt er til stede i prøven vil bidra til å øke arealet til denne toppen. Samtidig vil ikke EPS-primersettene kunne amplifisere DNA fra de laktokokkene som ikke har EPS-operonet, og dermed vil PCR-produktene av prøver med få EPS-produserende laktokokker kun danne svake bånd på gelen. For prøve V5 kan dette bety at laktokokker utgjør en stor del av den totale mikrobiotaen i prøven, men at kun et fåtall av disse er EPS-produserende. Totalt sett kan dette tyde på at det finnes ulike laktokokker på tettegras, både de med og de uten evne til å produsere EPS. Dersom det er ønskelig å påvise tilstedeværelse av laktokokker som ikke produserer EPS, er det nødvendig å bruke et primersett som er spesifikt for laktokokker.

Totalt sett ga resultatene fra alle de molekylære metodene benyttet i denne oppgaven gode indikasjoner på at laktokokker kan utgjøre en del av mikrobiotaen på tettegras. PCR med EPS-primersettene ga amplifisering av EPS-operonet dersom dette var til stede i det ekstraherte DNAet, gelelektroforese påviste amplifisert produkt ved dannelse av bånd på gel og sekvensering av den amplifiserte sekvensen viste treff med EPS-produserende laktokokker i BLAST. Resultatene fra ARISA viste at DNA fra samtlige av bladprøvene dannet dominerende topper med ITS-lengde 580. Dette kan bety at laktokokker kan befinne seg på tettegras, da det er mulig at toppen med ITS-lengde 580 korresponderer med laktokokker (NCBI 2015).

4.2. Undersøkelse av mikrobiotaen på tettegras

I forbindelse med letingen etter EPS-produserende laktokokker ble også den totale mikrobiotaen på tettegras studert. Dette er et ukjent området, og søk etter referanser på studier av mikrobiotaen til tettegras var uten resultat.

Totalt ble 22 prøver med tettegras inokulert på M17- og BHI-agar. Koloniene som vokste frem ble undersøkt for å avsløre om de viste fenotypiske karaktertrekk som kunne ligne laktokokker. Renkulturene *AR1*, *BF2* og *Tett* er kjente EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris*, og disse ble benyttet som referansekulturer i løpet av rendyrkingen. Det var totalt 78 kolonier som ble valgt ut til rendyrking. De fleste av disse ble selektert fordi de viste ett eller flere av de samme fenotypiske trekkene som laktokokker, altså at de var Gram-negative, katalase-negative og kokkeformede celler. Slike kolonier ble rendyrket og sendt til sekvensering. Identifisering av eventuelle *L. lactis* subsp. *cremoris* krever bruk av genotypiske metoder, da fenotypiske karaktertrekk i liten grad kan gi identifikasjon på art- og

stamme-nivå (McCartney 2002). Noen kolonier ble valgt ut fordi de ble oppfattet som svært dominerende på et flertall av skålene, og det var derfor ønskelig å identifisere dem. Av praktiske og økonomiske hensyn kunne ikke alle de rendyrkede kulturene sekvenseres, og dermed ble kun 13 kolonier identifisert.

De koloniene som viste størst grad av fenotypisk likhet med *L. lactis* subsp. *cremoris* var koloniene som senere ble identifisert som *C. divergens*. *C. divergens* ble funnet med sikkerhet på tre av totalt 22 prøver av tettegras, som vil si at rendyrkede kolonier som ved sekvensering ble identifisert som *C. divergens* ble plukket fra tre ulike bladprøver. Denne organismen var tidligere klassifisert i melkesyrebakterie-slekten *Lactobacillus*, men har blitt reklassifisert som *Carnobacterium*. Dette betyr at *C. divergens* er en type melkesyrebakterie, med de samme egenskapene som andre melkesyrebakterier (Adams & Moss 2008a). *C. divergens* er ofte forbundet med mikrofloraen på vakuumpakket eller modifisert atmosfære-pakket fisk og kjøtt, og har ikke blitt koblet til vannholdige matvarer slik som melk (Laursen et al. 2005). Før sekvensering var celle-morfologien til denne organismen det eneste som ikke stemte overens med de fenotypiske trekkene til referansekulturene med *L. lactis* subsp. *cremoris*, da cellene til *C. divergens* er stavformede (Adams & Moss 2008a). Forsøket der *C. divergens* ble podet i melk viste at denne bakterien er i stand til å vokse i melk. *Carnobacterium* produserer lite melkesyre under vekst sammenlignet med andre melkesyrebakterier (Tahiri et al. 2004), og dette ble også vist eksperimentelt da det ikke ble registrert noen særlig reduksjon i pH i melken. Dette indikerer videre at *C. divergens* ikke fermenterer laktose. Gelen som ble dannet i røret kan dermed ikke være syrefelt, men kan være et resultat av proteolyse med destabilisering av kaseinmicellen (Walstra et al. 2006b).

Enkelte arter av *Carnobacterium* kan produsere bakteriosiner, og det har blitt vist at ulike arter produserer ulike bakteriosiner. *C. divergens* produserer divercin og divergicin, mens en annen art i denne slekten, *C. piscicola*, produserer carnocin (Tahiri et al. 2004). Disse bakteriosinene inhiberer et bredt spekter av mikroorganismer (Laursen et al. 2005), men det er kun carnocin som har en inhiberende effekt på laktokokker og andre melkesyrebakterier (Ringø & Gatesoupe 1998). Dette betyr at *C. divergens*, til tross for sin bakteriosinproduserende evne, mest sannsynlig ikke vil virke inhiberende på vekst av laktokokker da den ikke produserer carnocin. Det var *C. divergens* som ble isolert fra tettegras, og det er uvisst om andre arter av denne slekten kan være til stede på planten. Uansett virker divergicin inhiberende på andre arter av *Carnobacterium* (Tahiri et al. 2004), så det er tenkelig at vekst av *C. divergens* kan hindre vekst av carnocin-produserende arter. Inntil nylig har *C. divergens*

kun vært isolert fra matvarer med animal opprinnelse, men nå har tilstedeværelse av denne organismen også blitt påvist på vegetabiliske fôrvekster (Tohno et al. 2012). Vekst at *C. divergens* på plantemateriale, som også ble observert i arbeidet med denne oppgaven, har dermed blitt vist tidligere.

De små hvite koloniene, som brukte lang tid på å vokse, ble identifisert som *Staphylococcus warneri*. Denne organismen ble funnet med sikkerhet i to av totalt 22 prøver med tettegras. Som andre stafylokokker er denne organismen Gram-positiv, katalase-positiv, fakultativ anaerob, og den er kokkeformet (Adams & Moss 2008c). Ved sammenligning med *ARI* kom det frem at cellene til stafylokokkene var rundere enn cellene til *ARI*, i tillegg til at de førstnevnte var samlet i små klynger i stedet for i kjeder. En annen forskjell som ble observert mellom disse to kulturene var at stafylokokkene ga positiv katalase-test. Totalt sett stemte de observerte fenotypiske karaktertrekkene til koloniene «S1» og «S2» godt overens med karaktertrekk beskrevet for stafylokokker (Adams & Moss 2008c).

De resterende koloniene som ble rendyrket var alle Gram-negative, og disse ble rendyrket og sekvensert for å identifisere de dominerende organismene på tettebladene. En av de rendyrkede koloniene ble identifisert som *Pseudomonas*. *Pseudomonas* har tidligere vært identifisert på planter, og denne slekten inkluderer både plantepatogene arter og arter som virker vekstfremmende på planter (Bulgarelli et al. 2013). Disse stavformede bakteriene er Gram-negative og aerobe (Adams & Moss 2008c). Dette ble observert i praksis ved Gram-farging og undersøkelse av bakteriecellene i mikroskop, og ved forsøk på å inkubere koloniene anaerobt. De fleste *Pseudomonas* er motile (Tremblay & Déziel 2008), noe som kan forklare hvorfor koloniene var sammenvokst på skålene de der *Pseudomonas* vokste frem. De resterende renkulturene som ble sekvensert viste seg å tilhøre familien *Enterobacteriaceae*, og organismer som *Enterobacteriaceae bacterium*, *Erwinia persicina* og *Providencia burhodogranaria* ble identifisert. Også i disse tilfellene var det samsvar mellom de observerte fenotypiske trekkene, og sekvenseringsresultatene.

Som nevnt ble den totale mikrobiotaen på tettegras undersøkt ved bruk av ARISA. Resultatene fra denne analysen bekreftet at mikrobiotaen på tettebladene er kompleks. Antallet topper rangerte fra 11 til 35. Et høyt antall topper betyr at det var DNA fra mange ulike bakterieslekter i den aktuelle bladprøven. Trolig er antallet mikroorganismer i disse prøvene enda større, da ARISA som metode er kjent for å underestimere det totale mangfoldet i en prøve (Fisher & Triplett 1999). ARISA baserer seg på å skille mellom organismer som har spacer-regioner med ulike lengder. Dette betyr at ulike organismer, som har spacer-

regioner med samme lengde, kan bli oppfattet som samme organisme (Fisher & Triplett 1999). Det er dermed mulig at mikrobiotaen på tettegras er enda mer kompleks enn ARISA-resultatene indikerer, da hver topp kan representere flere organismer.

Det ble gjort forsøk på å koble dominerende topper i ARISA-profilene med mulig korresponderende mikroorganismer. ARISA-profilene til alle bladprøvene unntatt H, L1 II, R1 II, R3 I og R4 I dannet topp med ITS-lengde 550. Denne ITS-lengden kan korrespondere med streptokokker, som har spacer-region som er 553 basepar lang (NCBI 2015). Heller ikke i dette tilfellet stemmer ITS-lengden funnet eksperimentelt nøyaktig overens med den funnet i NCBI, og derfor er det svært usikkert om topper med denne ITS-lengden viser til tilstedeværelse av streptokokker på tettegraset. Det ble ikke isolert streptokokker i løpet av rendyrkingen, og det var dermed ingen renkulturer tilgjengelig som kontroll. Totalt sett er det ikke mulig å identifisere organismen ansvarlig for å danne denne toppen på grunnlag av ARISA-resultatene alene. For sikker identifisering kreves sekvensering.

ARISA-profilene til noen av bladprøvene viste enkelte topper som kan korrespondere med noen av renkulturene isolert fra tettegras. *Carnobacterium* kan danne topper med ITS-lengder på blant annet 499, 506 og 727 (NCBI 2015), og ARISA-resultatene viser at DNA fra enkelte av bladprøvene dannet dominerende topper med omtrent disse ITS-lengdene. DNA fra prøvene R2 I og R3 II dannet topper med ITS-lengde 499, DNA fra prøvene DT, DT4, R1 I og R2 II dannet topper med ITS-lengde 727, mens DNA fra prøvene R3 I, L1 II, R1 II og DT3 dannet topper med ITS-lengde 507. *Staphylococcus* kan danne topper med ITS-lengde 662 (NCBI 2015). DNA fra DT4 dannet en dominerende topp med ITS-lengde 660, en lengde som kan korrespondere til 662. I tillegg ble det observert at DNA fra flere av bladprøvene, slik som H, DT4, V1, V3 og V4 dannet topper med ITS-lengder på 632 og 633, og topper med disse ITS-lengdene kan korrespondere med *Enterobacteriaceae* (NCBI 2015).

Renkulturene med *C. divergens* ble isolert fra R2 I, R2 II og R3 I. Oversikten over de dominerende toppene viser at DNA fra bladprøvene R2 I, R3 I og R2 II dannet topper med ITS-lengder på henholdsvis 499, 507 og 727, og alle disse lengdene kan korrespondere med lengden på spacer-regionen til *Carnobacterium*. DNA fra R2 I dannet også topp med ITS-lengde 727, men denne toppen utgjør under 5% av arealet og er dermed ikke synlig i figuren. Dette tyder på at *Carnobacterium* utgjør en del av mikrobiotaen på tettegras, noe som også ble vist ved sekvensering av renkulturene med *C. divergens* isolert fra tettegras. Det lyktes ikke å koble renkulturene med *S. warneri* og *Enterobacteriaceae* til toppene med ITS-lengdene 660, 631 og 631. Disse toppene ble dannet med DNA fra andre prøver enn de

prøvene som renkulturene ble isolert fra. Det ble ikke plukket ut kolonier til renyrking fra alle prøvene, så dette betyr ikke at disse toppene ikke kan representere disse bakteriene. Uansett, som forklart i tilfellet med toppene som kan representere laktokokker og streptokokker, vil ikke resultatene fra ARISA være sikre uten sekvensering. Andre mikroorganismer kan også ha spacer-regioner med disse ITS-lengdene.

Resultatene fra ARISA gjorde det også mulig å studere forskjellene mellom de ulike prøvene med hensyn til total mikrobiota. ANOSIM viste at mikrobiotaen på bladprøvene fra de forskjellige stedene generelt sett var ganske lik, og de eneste signifikante forskjellene som ble oppdaget var mellom mikrobiotaen på tettegras fra Damtjern og Vega. Dette kan bety at tettegras har en helt særegen mikrobiota, som ikke er avhengig av plantens geografiske opprinnelse. Det ble som nevnt ikke funnet noen referanser til studier av mikrobiotaen til tettegras, så dette er så langt bare antagelser. Oversikten over de dominerende toppene i de ulike prøvene gir et innblikk i hvilke topper som utgjør den totale mikrobiotaen i prøvene, og det er tydelig at det er toppene med ITS-lengdene 550 og 580 som dominerer. Ut fra denne figuren ser mange av prøvene like ut med hensyn til total mikrobiota, slik som prøvene R4 II, V2 og V5. Det er likevel ikke mulig å oppdage signifikante forskjeller eller likheter kun basert på resultatene i denne figuren.

ARISA-resultatene ble analysert med PCA, og resultatene grupperte bladprøvene avhengig av hvilke topper som DNA fra de ulike prøvene dannet. Ved sammenligning med oversikten over dominerende topper kommer det frem at PCA-resultatene bekrefter det oversikten viser. PCA ble utført både med og uten standardisering av toppenes verdier, og dette resulterte i to svært ulike Bi-plots. PCA med ustandardiserte data betyr at variablenes størrelsesorden påvirker variablenes innflytelse, og dermed vil variabler som er til stede i store mengder få stor innflytelse. Med standardiserte data (hver variabel divideres med standardavviket til den aktuelle variabelen) vil hver variabel vektet likt, og dermed vil en variabel som er til stede i små mengder ha like stor innflytelse på gruppering som en variabel som er til stede i store mengder.

Totalt sett var det PCA uten standardisering som forklarte totalvariansen best, da disse resultatene forklarte hele 66%. Dette betyr at mindre informasjon var forklart i PCA der verdien til toppene var standardisert.

Med standardisering av verdiene ble det dannet et Bi-plot som viste hvilke topper som karakteriserte de ulike prøvene. Det ble observert at toppen med ITS-lengde 580 befant seg

mellom de to første komponentene i plottet, noe som tyder på at denne toppen befinner seg i alle prøvene. Dette stemmer overens med det som ble observert i oversikten over dominerende topper. Prøvene som skilte seg ut i dette plottet var H, L1 II, R1 II og R3 I. Disse er plassert utenfor den store sentrale gruppen, noe som betyr at de er sterkere assosiert med noen andre topper enn de fleste prøvene er. Ved sammenligning med oversikten over dominerende topper kommer det frem at DNA fra disse fire prøvene ikke dannet dominerende topper med ITS-lengde 550. Dette er hovedgrunnen til at disse prøvene skiller seg ut, da de resterende prøvene er sterkere assosiert med denne toppen.

Uten standardisering av verdiene ble det dannet et Bi-plot som viste hvilke topper som utgjorde betydelige deler av det totale arealet i ARISA-profilene til de ulike prøvene. Dette plottet ga dermed også informasjon om hvilke topper som hadde betydning for forskjellene mellom prøvene. Det ble observert at de noe mindre dominerende toppene, i tillegg til toppene som utgjorde mindre enn 5% av det totale arealet, var plassert i midten av plottet i en tett gruppe. Disse toppene ble bare funnet i én eller noen få prøver, og de hadde dermed liten betydning for den overordnede gruppering av prøver. Det var spesielt toppene med ITS-lengdene 580, 550 og 475 som hadde betydning for plassering av prøvene i plottet. Grupperingene av prøvene viser at toppene med ITS-lengde 550 og 580 fantes i store mengder i Vega-prøvene, med unntak av i V1. R4 II tilhørte også denne gruppen. Likheter mellom disse prøvene ble også observert i oversikten over dominerende topper. Oversikten viser samtidig at DNA fra prøvene DT, L1 I, R1 I og R2 II ikke dannet store dominerende topper med ITS-lengde 580, noe som også kommer frem i Bi-plottet da disse prøvene er plassert et stykke unna 580. Den siste tydelige gruppen som ble observert består av prøvene L1 II, R1 II og R3 I. Disse er samlet i en gruppe fordi toppen med ITS-lengde 580 finnes i store mengder i disse prøvene, samtidig som toppen med ITS-lengde 550 finnes i små mengder. Disse tre prøvene skilte seg også ut i Bi-plottet der verdiene til toppene var standardisert, og nok en gang er det den lave andelen av toppen med ITS-lengde 550 som gjør at de skiller seg ut.

Det ble også utført en hierarkisk gruppeanalyse for å undersøke forskjeller mellom mikrobiotaen i de ulike prøvene. Resultatene fra denne analysen viser at prøvene som ble plassert i nærheten av hverandre i Bi-plottet med ustandardiserte verdier ble plassert i samme gruppe i gruppediagrammet, slik som prøvene V2 og V5. En av grunnene til at disse to prøvene alltid ble plassert i nærheten av hverandre, og at de ble plassert i samme gruppe, kan være at de begge dannet svært få topper sammenlignet med de andre prøvene. Med «Height»-

nivå 28 defineres tre grupper i diagrammet, og det er kun R4 I som utelukkes. Oversikten over dominerende topper viser at toppene med ITS-lengdene 692 og 695 dominerer i R4 I, i like stor grad som toppen med ITS-lengde 580. Toppen med ITS-lengde 550 er der, men i mye mindre mengder. Dette gjør at R4 I skiller seg ut i gruppediagrammet, og i Bi-plottet med ustandardiserte verdier.

Av de tre gruppene består gruppen lengst til venstre av prøvene med lavt innhold av toppen med ITS-lengde 550 og høyt innhold av 580-toppene. Prøvene i den midterste gruppen har høyt innhold av begge toppene, mens prøvene i gruppen lengst til høyre har høyt innhold av 550-toppene og lavere innhold av 580-toppene. Totalt sett er det de samme toppene som dominerer i alle prøvene, og forskjellene mellom prøvene er basert på mengden av de dominerende toppene. Dette tyder på at de ulike bladene har relativ lik mikrobiota.

5. Oppsummering

Hovedformålet med denne oppgaven var å undersøke om EPS-produserende *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* kunne finnes på blader fra *Pinguicula vulgaris*, kjent som tettegras. Det var ønskelig å undersøke validiteten til de gamle folkefortellingene som beskriver hvordan tettegras ble benyttet for å utvikle det tradisjonelle produktet tettemelk.

De molekylære metodene viste gode indikasjoner på at *L. lactis* subsp. *cremoris* befinner seg på bladene fra tettegras. Amplifisering av EPS-operonet i DNA fra bladprøver var vellykket, sekvensering og søk i BLAST viste at disse sekvensene tilhørte EPS-produserende *L. lactis* subsp. *cremoris* og DNA fra bladprøver analysert med ARISA dannet toppe med en ITS-lengde som kan korrespondere med laktokokker. Som nevnt er ARISA-resultatene noe usikre, men validiteten til disse resultatene styrkes av at resultatene fra de andre molekylære analysene peker i samme retning.

Det lyktes ikke å isolere laktokokker fra tettegras ved bruk av vanlige mikrobiologiske metoder. Spesielt ARISA-resultatene indikerte at laktokokker kan utgjøre en betydelig andel av den totale mikrobiotaen på tettegras, og dermed burde det være mulig å isolere dem fra tettegras ved bruk av mikrobiologiske metoder. En mulig årsak til at laktokokkene ikke vokste frem kan være at den komplekse mikrobiotaen på tettegras ble for dominerende, og at laktokokkene ikke var i stand til å konkurrere mot mer opportunistiske organismer.

Totalt sett er ikke resultatene fra dette arbeidet helt entydige, da det kun var resultatene fra de molekylære metodene som ga indikasjoner på at *L. lactis* subsp. *cremoris* kan være til stede på tettegras. Likevel er resultatene fra de molekylære metodene samstemte, og sammen kan de tolkes dithen at laktokokker sannsynligvis befinner seg på tettegras.

Ellers ble det oppdaget at tettegras fra ulike steder i Norge har påfallende lik mikrobiota, og dette vitner om en «kjerne-mikrobiota» på denne planten som er uavhengig av geografisk opprinnelse. Resultatene fra dette arbeidet viser at bakteriene assosiert med bladene fra tettegras ikke er tilfeldige, og dette kan være et viktig steg på veien til å løse gåten med opprinnelsen til mikroorganismene i tettemelk.

6. Fremtidig arbeid

Sikker identifisering av *L. lactis* subsp. *cremoris* som en del av mikrobiotaen på tettegras krever sekvensering av 16S-rRNA-genet fra organismene i bladprøvene. Denne metoden vil kunne avsløre hvilke organismer som utgjør mikrobiotaen på tettegras, og dermed kunne bekrefte ARISA-resultatene.

Ideelt sett burde det bli gjennomført flere forsøk på å isolere *L. lactis* subsp. *cremoris* fra tettegras ved bruk av mikrobiologiske metoder. For å oppnå dette er bruken av mer optimaliserte næringsagarer og vekstbetingelser for denne melkesyrebakterien nødvendig. Dersom et slikt forsøk hadde lyktes ville det vært relevant å gjennomføre en karakterisering av dette isolatet, i tillegg til å utvikle en starterkultur. Tetteemelk er et produkt med lang holdbarhet, og studier av et eventuelt isolat kan være med å avsløre hvorfor. Ellers er motstandsdyktighet mot bakteriofag-angrep en viktig egenskap for meieristammer, og det kunne vært relevant å undersøke om et eventuelt isolat med EPS-produserende laktokokker fra tettegras har annen sensitivitet enn meieristammer.

I forbindelse med mikrobiotaen til tettegras hadde det vært interessant å undersøke planter fra andre land. Formålet med dette ville være å finne ut om mikrobiotaen til denne planten var lik uavhengig av opprinnelse.

Videre undersøkelser av mikrobiotaen på tettegras, og andre planter, er viktig fordi forskning i større grad begynner å fokusere på mikrobiotaen til plantene i sammenheng med plantehelse. Mikrobiotaen til planter som benyttes til mat kan også ha en sammenheng med human helse. Forskningen har foreløpig vært sentrert rundt røttene til plantene, men det er også en økende interesse for mikroorganismer som lever på deler av planten som befinner seg over jordoverflaten.

7. Kilder

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008a). Fermented and Microbial Foods. I: *Food Microbiology*, s. 310-396. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK: RSC Publishing.
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008b). Methods for the Microbial Examination of Foods. I: *Food Microbiology*, s. 371-395. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK: RSC Publishing.
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008c). Bacterial Agents of Foodborne Illness. I: *Food Microbiology*, s. 182-268. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK: RSC Publishing.
- Aldenius, J., Carlsson, B. & Karlsson, S. (1983). Effects of insect trapping on growth and nutrient content of *Pinguicula vulgaris* L. in relation to the nutrient content of the substrate. *New Phytologist*, 93 (1): 53-59.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmalm, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research*, 11 (5): 731-753.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L. & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64: 807-838.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F. & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food microbiology*, 47: 45-61.
- De Vuyst, L. & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23 (2): 153-177.
- Degeest, B., Vaningelgem, F. & De Vuyst, L. (2001). Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11 (9): 747-757.
- Erlich, H. A. (1989). Polymerase chain reaction. *Journal of clinical immunology*, 9 (6): 437-447.
- Faye, T. (2010). Business Related Biotechnology at UMB: Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap, UMB.
- Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G. & Skeie, S. (2012). Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. *Journal of dairy science*, 95 (2): 558-566.
- Fisher, M. M. & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 65 (10): 4630-4636.
- Fondén, R., Leoranta, K. & Svensson, U. (2008). Nordic/Scandinavian Fermented Milk Products. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented milks*, s. 156-177. Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, U: Blackwell Publishing Company.
- Furuset, K. (2008). Tettegrasetts rolle i tettemelk. *Blyttia*, 66 (1): 55.
- Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications I: Kongo, M. (red.) *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia: InTech.
- Haug, I. (1996). *Bakteriologiske og teknologiske aspekter vedrørende produksjon av tettemelk*. Ås, Norge: Norges Landbrukshøgskole, Institutt for næringsmiddelfag.
- Huang, Q., Baum, L. & Fu, W.-L. (2010). Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical laboratory* (56): 149-52.
- Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Thi, N. N., Choo-Smith, L.-P., Sockalingum, G., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F. & Doglia, S. (2001). Classification and identification of

- enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of clinical microbiology*, 39 (5): 1763-1770.
- Kleerebezem, M., Boels, I. C., Groot, M. N., Mierau, I., Sybesma, W. & Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *Journal of biotechnology*, 98 (2): 199-213.
- Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. & Leisner, J. J. (2005). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and applied microbiology*, 28 (2): 151-164.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2): 67-78.
- Lucey, J. & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food research international*, 30 (7): 529-542.
- Magri, M. (2014). *Mikrobiologiske og kjemiske endringer i norske surmelksprodukter under lagring*. Ås, Norge: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Fakultetet for veterinærmedisin og biovitenskap, Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap.
- McCartney, A. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 (S1): s29-s37.
- NCBI. (2015). *National Center for Biotechnological Information*. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (lest 30.04.2015).
- Nilsson, L.-E., Lyck, S. & Tamime, A. Y. (2008). Production of Drinking Products. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented milks*, s. 95-126. Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK: Blackwell Publishing Company.
- Oremland, R. S., Hoelt, S. E., Santini, J. M., Bano, N., Hollibaugh, R. A. & Hollibaugh, J. T. (2002). Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10): 4795-4802.
- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2 (1): 55-68.
- Ringø, E. & Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160 (3): 177-203.
- Robinson, R. K., Lucey, J. A. & Tamime, A. Y. (2008). Manufacture of Yoghurt. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented milks*, s. 53-71. Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK: Blackwell Publishing Company.
- Robinson, R. K. & Tamime, A. Y. (2008). Types of Fermented Milks. I: Tamime, A. Y. (red.) *Fermented milks*, s. 1-8. Blackwell Science Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK: Blackwell Publishing Company.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. & Zoon, P. (2002a). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12 (2): 163-171.
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M. & Zoon, P. (2002b). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, 12 (8): 689-695.
- Rørosmeieriet. (2002). Utkast til produktforskrift om beskyttelse av produktbetegnelsen Økologisk Tettemjølke (Tjukkmjølke) fra Røros som Beskyttet geografisk betegnelse.
- Schillinger, U. & Holzappel, W. H. (2012). Culture Media for Lactic Acid Bacteria. I: Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W. & Baird, R. M. (red.) *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*, s. 174-186. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK: RSC Publishing.

- Tahiri, I., Desbiens, M., Bénéch, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D. & Fliss, I. (2004). Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International journal of food microbiology*, 97 (2): 123-136.
- Temmerman, R., Huys, G. & Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (7): 348-359.
- Terzaghi, B. E. & Sandine, W. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied microbiology*, 29 (6): 807-813.
- Tohno, M., Kobayashi, H., Nomura, M., Uegaki, R. & Cai, Y. (2012). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from mixed pasture of timothy and orchardgrass, and its badly preserved silage. *Animal Science Journal*, 83 (4): 318-330.
- Tremblay, J. & Déziel, E. (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of basic microbiology*, 48 (6): 509-515.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Levine, M. & Losick, R. (2008). Techniques of Molecular Biology. I: Wilbur, B. (red.) *Molecular Biology of the Gene*. 1301 Sansome Street, San Francisco, CA 94111, USA.: CSHL Press.
- Wikipedia. (2015). *Polymerase Chain Reaction*. Tilgjengelig fra: http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction (lest 30.04.2015).



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

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