

Styrt dyrking og deteksjon av relevant biofilm ved hjelp av maskinsyn i salmonid fiskeforedlingsindustri

Line Skontorp Meidell

Mat og teknologi

Innlevert: mai 2018

Hovedveileder: Eirin Marie Skjøndal Bar, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt for bioteknologi og matvitenskap, fakultet for naturvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet. Arbeidet ble utført høsten 2017 og våren 2018. Masteroppgaven ble utført i samarbeid med Sintef Ocean, og inngår som en del av forskningsprosjektet *RoboWash*. Masteroppgaven utgjør 45 studiepoeng.

Jeg vil rette en stor takk til hovedveileder Eirin Marie Skjøndal Bar for tett oppfølging og veiledning under hele prosessen. Jeg vil også takke veileder ved Sintef Ocean, Harry Westavik, for god oppfølging og godt samarbeid. En stor takk rettes også til Morten Steen Bondø ved Sintef Ocean for faglig støtte og praktisk veiledning ved UV-synlig spektroskopi og bildetaking. Til slutt vil jeg takke Gunn Merethe Thomassen for faglig støtte og praktisk veiledning ved mikrobiologiske forsøk, og Kirill Mukhatov for veiledning ved statistiske beregninger.

Line Skontorp Meidell,

Trondheim, 15. mai 2018

Sammendrag

Hovedmålet med denne masteroppgaven var å undersøke om representativ biofilm fra en fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk kan detekteres ved hjelp av UV-synlig spektroskopi som kan være anvendbart i et autonomt vaskesystem basert på maskinsyn.

Det ble tatt bakterieprøver i en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk etter rengjøring og desinfisering. En representativ prøve ble valgt ut til identifisering, der ni isolater fra prøven ble identifisert. Den samme bakterieprøven ble brukt for å dyrke biofilm under simulerte produksjonsforhold i et reaktorsystem som ble utviklet i forbindelse med denne masteroppgaven. UV-synlig spektroskopi ble benyttet for å undersøke om den fremdyrkede biofilmen utsendte fluorescens ved 280 nm eksitasjon. Biofilm som vokste frem i avfallsboksen i reaktorsystemet ble også testet for respons. Biofilm ble også avbildet for å undersøke om fluorescens kunne detekteres ved hjelp av maskinsyn.

Resultatene viste at 88,89 % av isolatene fra bakterieprøven ble identifisert som *Pseudomonas* spp., og 11,11 % ble identifisert som *Acinetobacter schindleri*. Biofilm ble dyrket frem i reaktorsystemet ved dag 5 i to separate reaktorforsøk. Resultatene fra deteksjon med UV-synlig spektroskopi viste at fluorescens ikke lot seg detektere i biofilm ved dag 0, dag 5 eller dag 13. Det ble likevel påvist en statistisk signifikant forskjell i responsen ved de ulike dagene. Variansen kan antas å skyldes absorpsjon fra biofilm, noe som kan tyde på at absorpsjon kan brukes som indikator på biofilmvekst ved UV-deteksjon. Det ble detektert fluorescens fra biofilmen som vokste frem i avfallsboksen. Denne biofilmen var svært godt utviklet og en deteksjon av biofilm på et slikt utviklingsstadium vurderes ikke som hensiktsmessig i en industriell setting da antallet bakterieceller for lengst ville vært uakseptabelt. Resultatene fra bildetakingen viste at responsen som ble oppnådd var for liten til at det er mulig å oppnå en hensiktsmessig deteksjon med maskinsyn. Ut ifra de samlede resultatene ble det konkludert med at representativ biofilm fra salmonid fiskeforedlingsindustri ikke kan detekteres ved hjelp av UV-synlig spektroskopi som kan være anvendbart i et autonomt vaskesystem basert på maskinsyn.

Abstract

The main goal of this master thesis was to investigate whether representative biofilm from a fish processing plant for salmonid fish can be detected by UV-visible spectroscopy applicable in an autonomous cleaning system based on machine vision.

It was taken bacterial samples in a representative fish processing plant for salmonid fish after cleaning and disinfection. One representative sample was chosen for identification, which nine isolates from the sample were identified. The same bacterial sample was used to grow biofilm under simulated production conditions in a reactor system which was developed in connection with this thesis. UV-visible spectroscopy was used to investigate whether the cultured biofilm emitted fluorescence at 280 nm excitation. Biofilm that emerged in the waste box in the reactor system was also tested for response. Biofilms were also imaged to examine if fluorescence could be detected by machine vision.

The results showed that 88.89% of the isolates from the bacterial sample was identified as *Pseudomonas* spp., And 11.11% were identified as *Acinetobacter schindleri*. Biofilms were cultivated in the reactor system over a period of 13 days in two separate reactor experiments. Detection with UV-visible spectroscopy showed that significant fluorescence could not be detected in the biofilm at day 0, day 5 or day 13. However, it was detected a significant difference in the response at the different days. The variation can be due to absorption from the biofilm, which may indicate that absorption can be used as an indicator of biofilm growth in UV-detection. Fluorescence was detected from the biofilm that emerged in the waste box. This biofilm was well developed and a detection of biofilm on such a developmental stage with a high number of bacterial cells would be considered unacceptable in an industrial setting. The results from the imaging showed that the response obtained was too small to achieve sufficient detection with machine vision. Based on the overall results it was concluded that the representative biofilm from a fish processing plant for salmonid fish cannot be detected by UV-visible spectroscopy applicable in an autonomous cleaning system based on machine vision.

Innhold

Forord.....	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1. Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Bakgrunn for problemstillingen.....	2
1.3 Oppgavens mål.....	2
1.4 Avgrensninger	3
2. Teori.....	4
2.1 Biofilm som bakteriell livsform.....	4
2.2 Quorum sensing.....	6
2.3 Interaksjoner mellom ulike arter i biofilm	7
2.4 Mikrobiotaen i salmonid fiskeforedlingsindustri	7
2.5 Utfordringer knyttet til biofilm i næringsmiddelindustrien.....	8
2.5.1 Risiko for kontaminasjon og matbåren sykdom.....	8
2.5.2 Økonomiske konsekvenser og tap av omdømme	9
2.5.3 Utfordringer knyttet til ressursbruk og bærekraft.....	9
2.6 Rengjøringsrutiner i fiskeforedlingsindustrien	10
2.7 Teori knyttet til metodikk	11
2.7.1 Identifisering ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System	11
2.7.2 Dyrking av biofilm i drip flow reactor.....	11
2.7.3 UV-synlig spektroskopi.....	12
2.7.4. Maskinsyn	13
3. Material og metode.....	14
3.1 Prøvetaking	15
3.1.1 Målet med prøvetakingen	15
3.1.2 Utførelse	16

3.2 Utstrykning og nedfrysning	16
3.2.1 Målet med forsøket	16
3.2.2 Forsøksdesign	17
3.3 Identifisering	17
3.3.1 Målet med forsøket	17
3.3.2 Rending	17
3.3.3 Identifisering ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System	17
3.4 Dyrking av biofilm i reaktor	19
3.4.1 Målet med forsøket	19
3.4.2 Design av reaktoroppsettet	19
3.4.3 Forsøksdesign	20
3.5 Deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi	21
3.5.1 Målet med forsøket	21
3.5.2 Forsøksdesign	21
3.6 Bildetaking av biofilm	23
3.6.1 Målet med forsøket	23
3.6.2 Forsøksdesign	23
4. Resultater	25
4.1 Identifisering	25
4.2 Dyrking av biofilm i reaktor	27
4.2.1 Reaktorforsøk 1	27
4.2.2 Reaktorforsøk 2	28
4.3 <i>Deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi</i>	29
4.3.1 Deteksjon av tryptofan oppløst i vann	29
4.3.2 Deteksjon av biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13	30
4.3.3 Deteksjon av biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet	32
4.4 Bildetaking av biofilm	32
5. Diskusjon	34

5.1 Identifisering	34
5.2 Dyrking av biofilm i reaktor	38
5.3 Deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi	40
5.3.1 Deteksjon av tryptofan oppløst i vann	40
5.3.2 Deteksjon av biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13	41
5.3.3 Deteksjon av biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet.....	42
5.3.4 Samlet diskusjon for deteksjon av biofilm.....	44
5.4 Bildetaking av biofilm	44
6. Konklusjon	47
7. Videre arbeid.....	48

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Norge er en stor produsent og eksportør av de salmonide fiskeartene atlantisk laks og regnbueørret (Bondø et al., 2011). Tall for 2017 viser at Norge produserte 1 321 472 tonn salmonid fisk (SSB, 2017), med en eksportverdi på 67,5 milliarder kroner (Norges sjømatråd, 2017). Produksjon av salmonid fisk er derfor et viktig bidrag til norsk verdiskaping (Richardsen and Bull-Berg, 2016).

Norge har et ansvar for at fisk med norsk opprinnelse er trygg å spise. Det er produsentene som har hovedansvaret for at mattryggheten ivaretas, noe som innebærer at produktene ikke skal være forurenset av uønskede kontaminanter som kan gi helseskade (Norges Forskningsråd, 2008). Matprodukter som er forurenset med patogene bakterier anses som den mest alvorlige formen for kontaminasjon fordi det kan medføre alvorlige matforgiftningsutbrudd (Fukuzaki, 2015). Slike utbrudd kan også medføre store negative konsekvenser for bedriften, næringen og landet (WHO, 2015).

Ved tilstedeværelse av smuss og fuktighet i fiskeforedlingsindustri og annen næringsmiddelindustri kan bakterier danne biofilm på produksjonsoverflater som er i direkte eller indirekte kontakt med næringsmidlet (Kanematsu and Barry, 2015). Biofilmen beskytter bakteriene og kan fungere som et viktig miljøreservoar for patogene bakterier og andre forringelsesbakterier (Shi and Zhu, 2009, Flanders and Yildiz, 2004). Vekst av biofilm kan derfor medføre betydelige problemer for mattryggheten og produktkvaliteten (Kumar and Anand, 1998). Bakteriene som lever i biofilm blir også svært resistente mot rengjøringsmidler og desinfeksjonsprosesser (Shi and Zhu, 2009). Det er derfor viktig med en nøyaktig og regelmessig rengjørings- og desinfiseringsprosess som fjerner matrester og forbindelser som kan fremme akkumulering av bakterier og dannelse av biofilm (Simões et al., 2010).

Rengjøringsrutinene i næringsmiddelindustrien foregår hovedsakelig manuelt (Fukuzaki, 2015). Manuell rengjøring utgjør en risiko for krysskontaminasjon ved at rengjøringsprosessen kan medføre spredning av bakterier via aerosoler og vann ved spyling (Margas and Holah, 2013, Gram and Huss, 1996, Kang and Frank, 1990). Manuell rengjøring kan også medføre at områder blir glemt eller oversett under vaskeoperasjonene (Fukuzaki, 2015). I følge Digre et al. er det et behov for mer automatiserte rengjøringsoperasjoner i fiskeforedlingsindustrien (Digre et al., 2014). For å realisere en slik teknologi er det en forutsetning at mattryggheten og produktkvaliteten ivaretas. Helautomatiserte vaskestasjoner

og vaskeroboter for produksjonsmiljøet kan gi bedre hygiene, redusert operatørinteraksjon, bedre lønnsomhet, og raskere og mer effektive rengjøringsprosesser (Digre et al., 2014).

Dersom vaskeroboter skal kunne implementeres er det et behov for å utvikle automatiserte metoder som gjør det mulig for roboten å detektere tilstedeværelsen og utviklingen av biofilm (Strathmann et al., 2013, Flemming, 2003, Walker et al., 2000). Dette innebærer at vaskerobotene må kunne overvåke renheten på overflatene visuelt, slik at rengjøringen kan koordineres og tilpasses de enkelte områdene (Gerstmayr-Hillen et al., 2013). Maskinsyn kan brukes for å oppnå automatisert visuell kontroll. I dag benyttes maskinsyn ved industrielle målinger og kvalitetskontroll i flere sektorer (Beyerer et al., 2016). Et automatisert deteksjonssystem vil kunne muliggjøre direkte overvåkning av biofilm-utviklingen slik at vaskingen i produksjonsprosessen kan styres basert på resultatene (Walker et al., 2000).

1.2 Bakgrunn for problemstillingen

Denne oppgaven ble utviklet i samarbeid med Sintef Ocean, og inngår som en del av prosjektet *RoboWash*. Målet med prosjektet er å utvikle et autonomt robotisert vaskesystem der vaskingen tilpasses tilstanden på det som skal vaskes, samt kan tilpasses nye vaskeoppgaver med minimal operatørinteraksjon. Dette er et innovasjonsprosjekt som krever forskning på flere områder, med et spesielt behov for forskning på hvordan maskinsyn kan detektere biofilm. På bakgrunn av samarbeidet med Sintef Ocean og *RoboWash* prosjektet ble følgende problemstilling formulert for masteroppgaven: *Styrt dyrking og deteksjon av relevant biofilm ved hjelp av maskinsyn i salmonid fiskeforedlingsindustri.*

1.3 Oppgavens mål

Hovedmålet med masteroppgaven var å undersøke om representativ biofilm fra en fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk kan detekteres ved hjelp av UV-synlig spektroskopi som kan være anvendbart i et autonomt vaskesystem basert på maskinsyn. Dette har omfattet etablering av relevante metoder for dyrking og deteksjon av biofilm på overflater. Følgende delmål ble formulert:

Delmål 1: Identifisere bakteriearter som er tilstede etter rengjøring og desinfisering i en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk.

Delmål 2: Undersøke om bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk danner biofilm under simulerte forhold på laboratorium

Delmål 3: Vurdere om biofilm dyrket med bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk kan detekteres ved hjelp av UV-lys.

Delmål 4: undersøke muligheten for å ta bilde av fluorescens fra biofilm ved hjelp av maskinsyn.

1.4 Avgrensninger

Det ble gjort flere avgrensninger i forbindelse med denne masteroppgaven. Hensikten med avgrensningene var å skape et tydelig fokus på de ulike delmålene som skulle belyses.

Følgende avgrensninger ble gjort:

- Det ble utført prøvetaking i en fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk for innsamling av bakterieprøver. Det ble kun samlet inn prøver fra denne bedriften fordi den var tilgjengelig gjennom prosjektet *Robowash*.
- Oppgaven fokuserer på vekst av biofilm basert på bakterier isolert fra en bakterieprøve tatt etter rengjøring og desinfisering. Det er derfor ikke sett på hvordan andre bakteriesammensetninger kan danne biofilm eller bli detektert ved hjelp av UV-synlig spektroskopi.
- Det ble valgt å detektere fluorescens i biofilm ved 280 nm eksitasjon. Denne bølgelengden ble benyttet fordi tryptofan er kjent for å utsende den mest intense fluorescensen i bakterier, med maksimal eksitasjon ved 280 nm.
- Det ble valgt å dyrke biofilm på glass for å minimere støy ved deteksjon av biofilm med UV-synlig spektroskopi.
- Oppgaven har fokusert på deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi og fluorescens, og har ikke undersøkt deteksjon av biofilm på overflater gjennom andre egenskaper til biofilm.
- Biofilm ble avbildet med ett type kamera fordi dette var det eneste kameraet tilgjengelig for avbildning av fluorescens.

2. Teori

I dette kapittelet er den viktigste teoretiske bakgrunnen for å belyse oppgavens hovedmål og delmål presentert. Kapittelet tar for seg biofilm generelt og de ulike trinnene i dannelsesprosessen, samt hvordan bakterier kommuniserer og interagerer med hverandre i biofilm. Teori om mikrobiotaen som vanligvis er til stede i salmonid fiskeforedlingsindustri blir også presentert. Biofilm i næringsmiddelindustrien kan medføre store negative konsekvenser. For å gi et overblikk over ulike utfordringer presteres teori om kontaminasjon og risiko for matbåren sykdom, økonomiske konsekvenser og tap av omdømme, samt utfordringer knyttet til ressursbruk og bærekraft. Dagens rengjøringsrutiner i fiskeforedlingsindustrien vil presenteres for å gi et innblikk i hvordan rengjøring brukes som en kontrollstrategi for å hindre biofilmdannelse. Avslutningsvis vil teori knyttet til ulike metoder som er brukt i oppgaven bli presentert for å gi en bedre forståelse for det praktiske arbeidet som er utført i forbindelse med oppgaven. Dette omfatter en oversikt over hovedprinsippene for identifisering ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System, dyrking av biofilm i drip flow reaktor og deteksjon med UV-synlig spektroskopi. Tryptofan fluorescens er beskrevet som en indikator på biofilmvekst ved UV-deteksjon. Til slutt legges det frem en oversikt over hovedprinsippene for maskinsyn, og hvordan maskinsyn kan brukes til deteksjon.

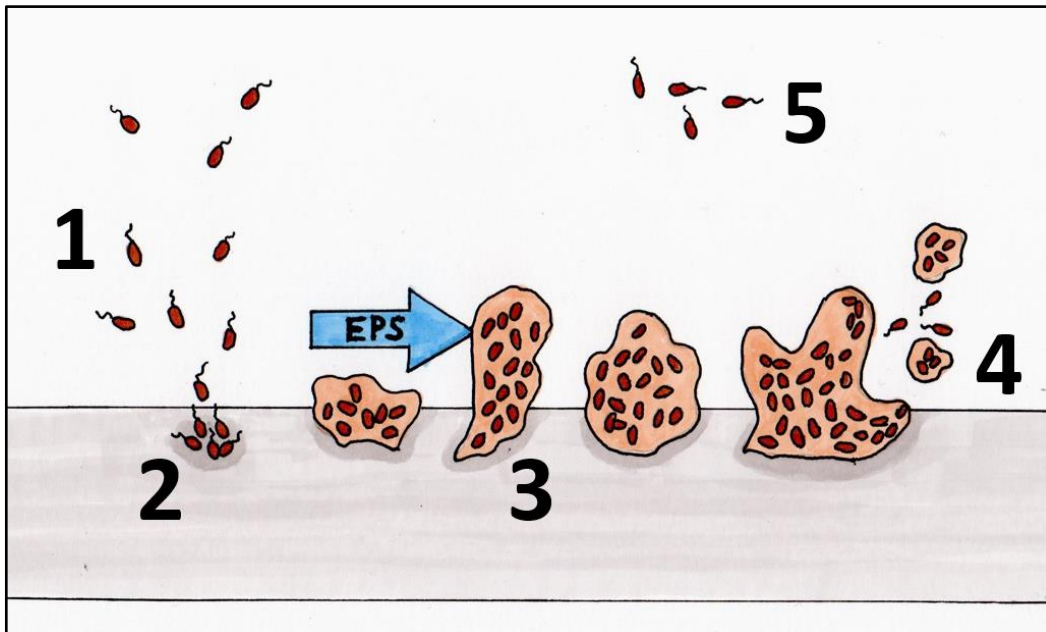
2.1 Biofilm som bakteriell livsform

Bakterier kan primært ha to ulike livsformer. De kan flyte fritt i en væske som planktoniske celler, eller leve sammen i en matriks som er festet til en overflate. (Faille and Carpentier, 2009) Sistnevnte defineres som biofilm og ble først kjent på slutten av 1970-tallet. Planktoniske celler har lenge vært ansett som den normale livsformen til bakterier, men det har blitt kjent at dette ikke stemmer (Kanematsu and Barry, 2015, Costerton et al., 1978). Majoriteten av mikroorganismene som lever på jorda er festet til overflater innenfor strukturerte biofilmøkosystemer (Azeredo et al., 2017), og det er estimert at opp mot 99% av alle bakterier i det naturlige miljø lever i biofilm (Dalton and March, 1998). Livsformen beskytter mikroorganismene mot ulike stressfaktorer i miljøet. Dette innebærer at cellenes vekst blir mindre påvirket av endringer i miljøforhold som saltkonsentrasjon, næring, temperatur, pH og uttørking (Chapman, 2015). Bakteriene som lever i biofilm blir også svært resistente mot rengjøringsmidler og desinfeksjonsprosesser (Shi and Zhu, 2009). Artssammensetning, overflate og andre miljøfaktorer spiller inn og påvirker

størrelsesfordelingen på biofilmen. Felles for alle biofilmer er den tredimensjonale strukturen med mikrostrukturer (Chapman, 2015).

Matriksen i biofilmen produseres av bakteriene selv, og omtales som en ekstracellulær matriks av polymere substanser (EPS). EPS består hovedsakelig av polysakkarider, proteiner, nukleinsyrer og lipider (Flemming and Wingender, 2010), men innholdet varierer mellom ulike arter og påvirkes av vekstforholdene (Chapman, 2015). EPS gjør det mulig for bakteriene å transportere næringsstoffer og bli kvitt ulike avfallsprodukter. Det er også matriksen som sørger for at biofilmen er stabil, og at den kan feste seg til overflater. (Flemming and Wingender, 2010, Chapman, 2015)

Biofilmdannelsesprosessen består av flere ulike trinn (Chapman, 2015, Watnick and Kolter, 2000). Trinnene er illustrert i figur 2.1. Prosessen er dynamisk og starter med at frie, planktoniske celler trekkes mot en overflate ved hjelp av hydrodynamiske krefter, og fysikalsk adsorpsjon og kjemisorpsjon (Chapman, 2015). Bakterien danner da en forbigående kontakt med overflaten eller bakteriene som er festet til overflaten. Denne kontakten gjør det mulig for bakterien å søke etter et sted den kan slå seg ned (Watnick and Kolter, 2000). Ekstracellulære organeller som flageller, cilier, fimbrier, pilier og ytre proteiner hjelper bakterien med å føle og interagere med overflaten. Når cellene har festes seg til overflaten er kontakten fremdeles ustabil og cellene kan fjernes relativt lett ved hjelp av mekaniske krefter. Den stabile kontakten oppstår når cellene begynner å produsere EPS (Chapman, 2015). Produksjonen av EPS starter når bakteriepopulasjonen har økt til et bestemt antall, og det oppstår da et tredimensjonalt nettverk (Watnick and Kolter, 2000). På dette tidspunktet øker også konsentrasjonen av kommunikasjonsmolekyler, kalt quorum sensing molekyler (se 2.2). Når konsentrasjonen av signalmolekyler kommer opp på et spesifikt nivå kan biofilmen aktivere modnings- og dispersjonsaktiviteter. Dispersjon er det siste trinnet i biofilmdannelsen og går ut på at enkelte bakterier løsner fra biofilmen. På denne måten kan bakteriene danne biofilm på nye områder (Chapman, 2015).



Figur 2.1 De ulike trinnene i biofilmdannelsesprosessen. 1. Frie planktoniske celler, 2. biokjemisk adsorpsjon til en overflate og påfølgende kolonisering, 3. Adhesjon og produksjon av ekstracellulær matriks av polymere substanser (EPS), 4. Løsningsfasen, 5. Dispersjonsfasen (Egen illustrasjon basert på Chapman, 2015)

2.2 Quorum sensing

Quorum sensing (QS) er et avgjørende fenomen ved dannelse av biofilm (Miller and Bassler, 2001). Fenomenet gjør det mulig for bakteriene å registrere andre bakterier gjennom varierende konsentrasjon av signalmolekyler, og koordinere adferden (J W Costerton et al., 1995, Matz, 2011). Bakteriene produserer og frigjør kjemiske signalmolekyler som øker i konsentrasjon når celledettheten øker. Når signalmolekylene mottas av visse reseptorproteiner blir enkelte gener regulert enten direkte eller indirekte. Dermed reguleres en rekke fysiologiske aktiviteter, som symbiose og biofilmdannelse. Det finnes et stort utvalg av ulike klasser av kjemiske signaler som skilles ut av bakterier ved QS, og det er vist at enkelte arter benytter mer enn ett kjemisk signal til kommunikasjon. QS benyttes av både gram-positive og gram-negative bakterier og gjør det mulig for bakteriene å kommunisere med sin egen art og med andre arter (Miller and Bassler, 2001). Forskning har vist at bakteriene benytter quorum sensing for å aktivere dispersjon når tilgangen på næring blir for lav, eller når det akkumuleres avfalls- og giftstoffer i biofilmen. Fenomenet fungerer derfor som en overlevelsesteknikk, og fasen regnes som den mest avgjørende selvfornyelsen av bakterielle samfunn (Chapman, 2015).

2.3 Interaksjoner mellom ulike arter i biofilm

Biofilm kan bestå av en enkelt bakterieart eller av flere arter. Førstnevnte kan finne sted i enkelte infeksjoner og på medisinske implantater (Adal and Farr, 1996, Archibald and Gaynes, 1997, Dickinson and Bisno, 1993), mens biofilm med mangfold av flere arter dominerer i de fleste miljøer (O'Toole et al., 2000, Burmølle et al., 2006, Matz, 2011). Biofilm kan bestå av mange hundre forskjellige bakteriearter, og er dermed svært komplekse (Paster Bruce et al., 2006, Matz, 2011). Det er derfor en forskningsmessig utfordring å forstå hvordan de forskjellige bakteriene interagerer med sin egen art og andre arter. Det er likevel kjent at ulike arter interagerer med hverandre gjennom symbiotiske og antagonistiske aktiviteter (Matz, 2011). Interaksjonene spiller en viktig rolle for utviklingen, strukturen og funksjonen til biofilmen, og gjør det mulig for artene å påvirke hverandre både positivt og negativt (Lee et al., 2014). Interaksjoner som har vist seg å gi fordeler for enkelte arter er evnen til å feste seg til andre bakterier som er festet til en overflate (koaggregering) (Palmer et al., 2003, Rickard et al., 2003, Sharma et al., 2005, Yamada et al., 2005), overføring av genetisk materiale (konjugasjon) (Ghigo, 2001), og beskyttelse av en eller flere arter mot antimikrobielle midler (Cowan et al., 2000, Erb et al., 1997, Leriche et al., 2003). Slike mekanismer kan gi synergi-effekter som bidrar til en kooperativ biofilmdannelse av arter som ikke ville klart å danne biofilm alene (Filoche et al., 2004, Jean-Marc, 2001, Palmer et al., 2001). Interaksjoner som kan virke negativt for enkelte arter inkluderer senking av pH (Sissons, 1997, Burne and Marquis, 2000) og produksjon av toksiner hos enkelte bakteriearter (Rao et al., 2005, Tait and Sutherland, 2002).

2.4 Mikrobiotaen i salmonid fiskeforedlingsindustri

Kontroll av forringelsesbakterier og potensielle patogene bakterier er en viktig utfordring for fiskeforedlingsindustrien (Langsrud et al., 2016). I følge Langsrud et al. finnes det foreløpig lite forskning på mikrobiotaen i fiskeforedlingsbedrifter for salmonid fisk (Langsrud et al., 2016). Bagge-Ravn et al. har imidlertid rapportert at mikrobiotaen på overflater i prosesseringsanlegg for sjømat domineres av bakterier fra råvaren (Bagge-Ravn et al., 2003). Hovda et al fant at *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Janthinobacterium* spp., *Acinetobacter* spp. og *Photobacterium phosphoreum* dominerte i tarmen til Atlantisk laks fra Vest-Norge basert på dyrkningsbaserte metoder (Hovda et al., 2007). I følge Ringø et al. varierer den bakterielle sammensetningen i tarm på fisk med saltkonsentrasjon i sjø, antibiotika, diett og ulike komponenter i kostholdet (Ringø et al., 1995).

Bagge-Ravn et al. studerte mikrobiotaen i to foredlingsanlegg for kald-røkt laks fra Norge og Færøyene, og fant at gjær, *Pseudomonas*, *Neisseriaceae*, *Alcaligenes* og *Acinetobacter* dominerte etter rengjøring og desinfisering (Bagge-Ravn et al., 2003). *Pseudomonas* isoleres også ofte i annen næringsmiddelindustri etter vask og desinfisering (Brightwell et al., 2006, Hultman et al., 2015, Mettler and Carpentier, 1998, Møretrø et al., 2013, Stellato et al., 2015). Dominansen av *Pseudomonas* ssp. etter rengjøring og desinfisering indikerer at enkelte arter har økt evne til å overleve i produksjonsmiljøet (Møretrø et al., 2016). *Pseudomonas* ssp. er kjent for å vokse ved lave temperaturer, har lave vekstkrav, er resistente mot desinfiserende midler og har god evne til å danne biofilm (Drenkard and Ausubel, 2002, Moore et al., 2006).

Møretrø et al. rapporterte at arter i slektene *Pseudomonas* og *Shewanella* dominerte i produksjonsmiljøet etter rengjøringsprosesser i en to fiskeforedlingsbedrifter (Møretrø et al., 2016). Møretrø et al. fant også at 72 og 91 % av prøvene som ble tatt i de to bedriftene ble identifisert som *Pseudomonas* spp. I studien til Guobjoernsdottir et al. dominerte *Pseudomonas* spp., sammen med *Enterobacteriaceae*, i en fiskeforedlingsbedrift (Guobjoernsdottir et al., 2005). Det ble også isolerte *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. fra transportbånd i fiskeforedlingsbedriften. *Acinetobacter* spp. er, i likhet med *Pseudomonas* spp, kjent for å danne biofilm, i tillegg til å vokse ved et stort spekter av ulike temperaturområder og ha høy overlevelse på tørre overflater (Doughari et al., 2011). Langsrud et al. fant at mikrobiotaen som dominerte etter rengjøring og desinfisering på transportbånd i tre norske foredlingsbedrifter for laks var arter i slektene *Pseudomonas* spp., etterfulgt av *Acinetobacter* og *Serratia* (Langsrud et al., 2016).

2.5 utfordringer knyttet til biofilm i næringsmiddelindustrien

2.5.1 Risiko for kontaminasjon og matbåren sykdom

Potensiell kontaminasjon av mat fra biofilm i matindustrien er av stor betydning for konsumentenes helse (Mettler and Carpentier, 1998). I produksjonslokalene i næringsmiddelindustrien finnes det ofte vann, matrester og andre forbindelser der mikroorganismer kan akkumuleres og danne biofilm (Simões et al., 2010, Gibson et al., 1999). Biofilm på overflater kan føre til direkte kontaminasjon av næringsmiddelprodukter dersom overflaten kommer i kontakt med produktet (Evandro Leite de et al., 2014, Gibson et al., 1999). Miljøoverflater som gulv og vegger kan også kontaminere produktene indirekte ved at bakterier overføres via mennesker, vann eller aerosoler i luften ved manuell rengjøring (Gibson et al., 1999, Holah, 1992, Margas and Holah, 2013, Kang and Frank, 1990). Manuell

rengjøring utgjør også en risiko for at feil kan oppstå under vaskeoperasjonene ved at områder blir glemt eller oversett (Fukuzaki, 2015). Det er rapportert om at krysskontaminasjon av næringsmidler ofte opptrer i forbindelse med operatørfeil og under rengjøringsoperasjoner (Fukuzaki, 2015, Suslow, 2001, Holah, 1992).

Biofilm kan inneholde både patogene bakterier og forringelsesbakterier, og kan derfor medføre betydelige problemer for mattryggheten og produktkvaliteten (Shi and Zhu, 2009, Kumar and Anand, 1998, Gibson et al., 1999). Kontaminasjon med patogene bakterier ansees som den mest alvorlige formen for kontaminasjon fordi det kan medføre store utbrudd av matbåren sykdom (Fukuzaki, 2015). Matbårne sykdommer dekker et stort spekter av sykdommer, og blir betraktet som et fremvoksende globalt helseproblem (Srey et al., 2013, WHO, 2013). Det er kjent at flere matforgiftningsutbrudd er forbundet med kontaminasjon av patogene bakterier som vokser i biofilm (Srey et al., 2013).

2.5.2 Økonomiske konsekvenser og tap av omdømme

Biofilmvekst i næringsmiddelindustrien kan medføre negative økonomiske konsekvenser. Dersom en bedrift har utfordringer knyttet til biofilm kan det være nødvendig å stoppe produksjonen, og sette i gang en mer omfattende rengjøringsprosess. Dette innebærer økte kostnader for arbeidskraft og rengjøringsmaterialer, i tillegg til kostnader knyttet til tapt produksjon (Bott, 2011b). Kontaminasjon av patogene bakterier kan, som tidligere nevnt, føre til store matforgiftningsutbrudd (Fukuzaki, 2015). Slike utbrudd kan få store økonomiske konsekvenser (OECD, 2003). Ved alvorlige utbrudd kan de økonomiske tapene bli så store at bedriften går i konkurs, noe som også kan resultere i tap av arbeidsplasser (Abdel-Aziz et al., 2016). Tilbaketrekking av varer og tapt markedssalg utgjør en viktig del av bedriftens kostnader knyttet til matforgiftningsutbrudd. Kostnadene knyttes også til tap av forbrukertillit og dårlig publisitet, samt kostnader knyttet til å gjenoppbygge omdømme og markedsandel. Dette gjelder ikke bare bedriften som er involvert. Ifølge organisasjonen for økonomisk samarbeid og utvikling (OECD) og verdens helseorganisasjon (WHO) kan matforgiftningsutbrudd også påvirke den økonomiske utviklingen til hele industrisektoren og landets internasjonale omdømme som leverandør av trygg mat (OECD, 2003, WHO, 2015).

2.5.3 Utfordringer knyttet til ressursbruk og bærekraft

Verdenskommisjonen for miljø og utvikling definerer bærekraftig utvikling som *en utvikling som tilfredsstiller dagens behov uten å ødelegge framtidige generasjoners muligheter til å tilfredsstille sine behov* (Brundtland, 1987). Med en forventet befolkningsvekst på ni

milliarder i 2050 vil behovet for mat, energi og vann øke (FAO, 2011). FAO anslår at det må produseres 70 % mer mat i verden for å møte den kommende etterspørselen. I dag er den globale matvaresektoren ansvarlig for rundt 30 % av verdens energiforbruk og bidrar med mer enn 20 % av de globale klimagassutslippene. Dette innebærer at det må produseres mer mat i tiden fremover, samtidig som vann- og energiforbruket i produksjonen må reduseres (FAO, 2011). I følge FAO er det ønskelig å redusere energiintensiteten, som vil si mengden energi som brukes per enhet mat produsert. I dag går store deler av energiforbruket i industrien til oppvarming og nedkjøling av vann til rengjøring (FAO, 2011). Utbrudd av biofilm krever ofte en mer omfattende rengjøringsprosess med høyere forbruk av vann, og er knyttet til et økt forbruk av energi (Bott, 2011a). Dette innebærer et behov for mer effektive rengjøringsteknologier som kan redusere risikoen for biofilmvekst og samtidig redusere ressursbruken i industrien (Wilson and Chew, 2015).

2.6 Rengjøringsrutiner i fiskeforedlingsindustrien

I dag finnes det ingen metode som fullstendig kan eliminere eller kontrollere dannelsen av biofilm uten å forårsake uønskede bivirkninger (Simões et al., 2010). Hovedstrategien som benyttes er regelmessig rengjøring og desinfisering. (Midelet and Carpentier, 2004, Simões et al., 2006, Simões et al., 2010).

I dag utføres all rengjøringen i fiskeforedlingsindustrien manuelt. Operatørene går rundt i produksjonslokalene og spyler overflatene med slange for hånd (Løvvald et al., 2017). Løvvald et al. har beskrevet en typisk rengjøringsprosedyre for foredlingsanlegg av salmonid fisk i Norge (Løvvald et al., 2017). Rengjøringen utføres med et eget rengjøringsskift om natten, når produksjonen er ferdig. Rengjøringen består vanligvis av grovspyling med rent vann for å bli kvitt blod og fiskerester for å unngå at restene klistrer seg fast på overflatene ved tørking. Områdene skumlegges deretter med syre eller alkalisk såpe slik at skummet dekker maskinene og overflatene i lokalet. Skummet får ligge en viss tid før det skylles bort med varmt vann. Etter rengjøring desinfiseres overflatene ved spraying for å inaktivere mikroorganismene som er til stede. Desinfeksjonsmiddelet får ligge og fordampe til produksjonen starter neste morgenen. I følge Løvvald et al. bruker rengjøringsskiftet 3,5 timer på å grovspy, skumlegge, skylle og desinfisere et område på 60 m² i et foredlingsanlegg som slakter rundt 100 tonn salmonid fisk per dag. Det er også vanlig at maskinoperatørene spyler utstyr og maskiner med kaldt vann når deres skift er ferdig. Foredlingsanleggene har også

ulike rutiner for demontering av utstyr og mer omfattende rengjøringstiltak i noen perioder (Løvdal et al., 2017).

2.7 Teori knyttet til metodikk

2.7.1 Identifisering ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System

Tradisjonelle biokjemiske tester og kommersielle testsett kan brukes til å identifisere bakterier, men er ofte arbeidsintensive og tidskrevende. Det finnes likevel noen automatiserte identifikasjonssystemer som kan brukes for å identifisere miljøisolater raskt og pålitelig, som BIOLOG identifikasjonssystem (Klingler et al., 1992). Testsettet for BIOLOG MicroLog ID System kan brukes til å identifisere aerobe gram-negative og gram-positive bakterier samtidig (BIOLOG Inc., 2011). Cellesuspensjon inokuleres i et passende platesett som følger med. Hver plate består av 96 brønner med ulike forbindelser; karbonforbindelser, inkludert sukkerarter, karboksylsyrer, aminosyrer og peptider. Databasen dissekerer og analyserer evnen cellene har til å metabolisere de ulike stoffene. Identifikasjonssystemet analyserer også fysiologiske egenskaper som pH-, salt- og melkesyretoleranse og kjemisk følsomhet ved at cellene produserer et mønster av reaksjoner. Det metabolske mønsteret som genereres av mikroorganismen registreres og sammenlignes i en database som innehar informasjon om 2650 ulike arter av bakterier (inkludert forringelsesbakterier og patogene bakterier), gjær og sopp. Systemet kvantifiserer ulike fargereaksjoner i platen og avgir arts-ID ved å lese reaksjonsmønsteret. Systemet gir omfattende og spesifikk testinformasjon om hvert isolat som benyttes i testsettet ved biokjemisk karakterisering.

2.7.2 Dyrking av biofilm i drip flow reactor

The drip flow reactor (DFR), eller dryppstrømningsreaktoren, kan benyttes for dyrking av biofilm på overflater, og metoden ble først utviklet av Goeres et al. (Goeres et al., 2009). En utfordring ved å etablere metoder for biofilmdyrking med ulike arter under kontrollerte betingelser, er å gjenskape mikromiljøet til bakteriene (Røder et al., 2016). DFR kan brukes til å etterligne miljøer i næringsmiddelindustrien, som for eksempel transportbånd i produksjonen. Ved bruk av DFR kan biofilm dyrkes på overflater som er relevante for forsøket, som for eksempel på glass eller rustfritt stål. DFR er et fleksibelt reaktorsystem som lett kan tilpasses ulike biofilmforsøk. Alle komponentene i systemet kan modifiseres selv om oppsettet og tilnærmingen er den samme. DFR går hovedsakelig ut på å dyrke biofilm under kontinuerlig laminær tilførsel av næring. Reaktoren består av fire parallelle kamre der hvert kammer inneholder et mikroskopglass, eller en annen form for kpong, som biofilmen kan

dyrkes på. Vekstmediet eller celsesuspensjon overføres til hvert kammer ved hjelp av en pumpe med slange. Kamrene står i helling slik at væsken renner ned over glassen. Reaktorsystemet består også av en avfallsboks der brukt mediet samles opp. Goeres et al. anbefaler forskere å tilpasse reaktorsystemet etter egne forskningsbehov. Dette kan innebære tilpasninger i dyrkingstemperatur, næringstilførsel og lengden på forsøket.

2.7.3 UV-synlig spektroskopi

Ved bruk av UV(ultrafiolett)-synlig spektroskopi benyttes bølgelengder på mellom 200 og 800 nm (Anderson et al., 2004). UV-området utvides fra 400 til 800 nm for å dekke det synlige spekteret. Oksygen absorberer bølgelengder rett under 200 nm, og det kreves derfor spesialutstyr for å benytte denne typen bølgelengder (Whittaker, 2000). Det finnes ulike typer UV-synlig spektrometre, men vanligvis består spektrometeret av en UV-synlig lyskilde, to celler som lyset passerer og en detektor for å måle mengden lys som passerer gjennom cellene. UV-synlig spektroskop kan brukes til å måle absorptansen ved en spesifikk bølgelengde (Anderson et al., 2004). Ved UV-synlig spektroskopiske målinger gir lysabsorpsjon, som en funksjon av bølgelengden, informasjon om elektroniske overganger som forekommer i materialet (Chen et al., 2013). Det er kjent at målinger med UV-lys kan brukes i overvåkningssystemer for å detektere biofilm. Målingene kan brukes til å undersøke utviklingen av biofilm ved å måle blant annet absorpsjon og fluorescens (Fischer, 2016).

2.7.3.1 Fluorescens i bakterier

UV-lys kan brukes til å detektere bakterier i biofilm ved at ulike molekyler i bakteriene utsender fluorescens (Fischer et al., 2012, Fischer, 2014, Fischer et al., 2015, Determann et al., 1998, Angell et al., 1993, Strathmann et al., 2013). Fluorescens baseres på deteksjon av lys emittert (utsendt) av molekyler etter eksitasjon (Strathmann et al., 2013). Et molekyl eksiterer ved at molekylet absorberer energi slik at ett eller flere elektroner overføres til en orbital med høyere energi (Lakowicz, 2006b). Deretter returnerer elektronet til en orbital med lavere energi og emitterer et foton med lys (Angell et al., 1993). Fluorescens er en form for luminescens, og er et spontant fenomen der lysutsendelsen stanser når det ikke tilføres mer energi (Lakowicz, 2006b). Atomer og molekyler som fluorescerer kalles fluoroforer (Tuzimski, 2015).

I følge Dalterio skyldes fluorescens fra bakterier hovedsakelig protein og flavin-fluorescens (Dalterio et al., 1986). Flaviner eksiterer ved 450 nm og utsender fluorescens ved 535 nm (Ammor, 2007). Proteinfluorescensen regnes som mer intens enn fluorescens fra flaviner, og

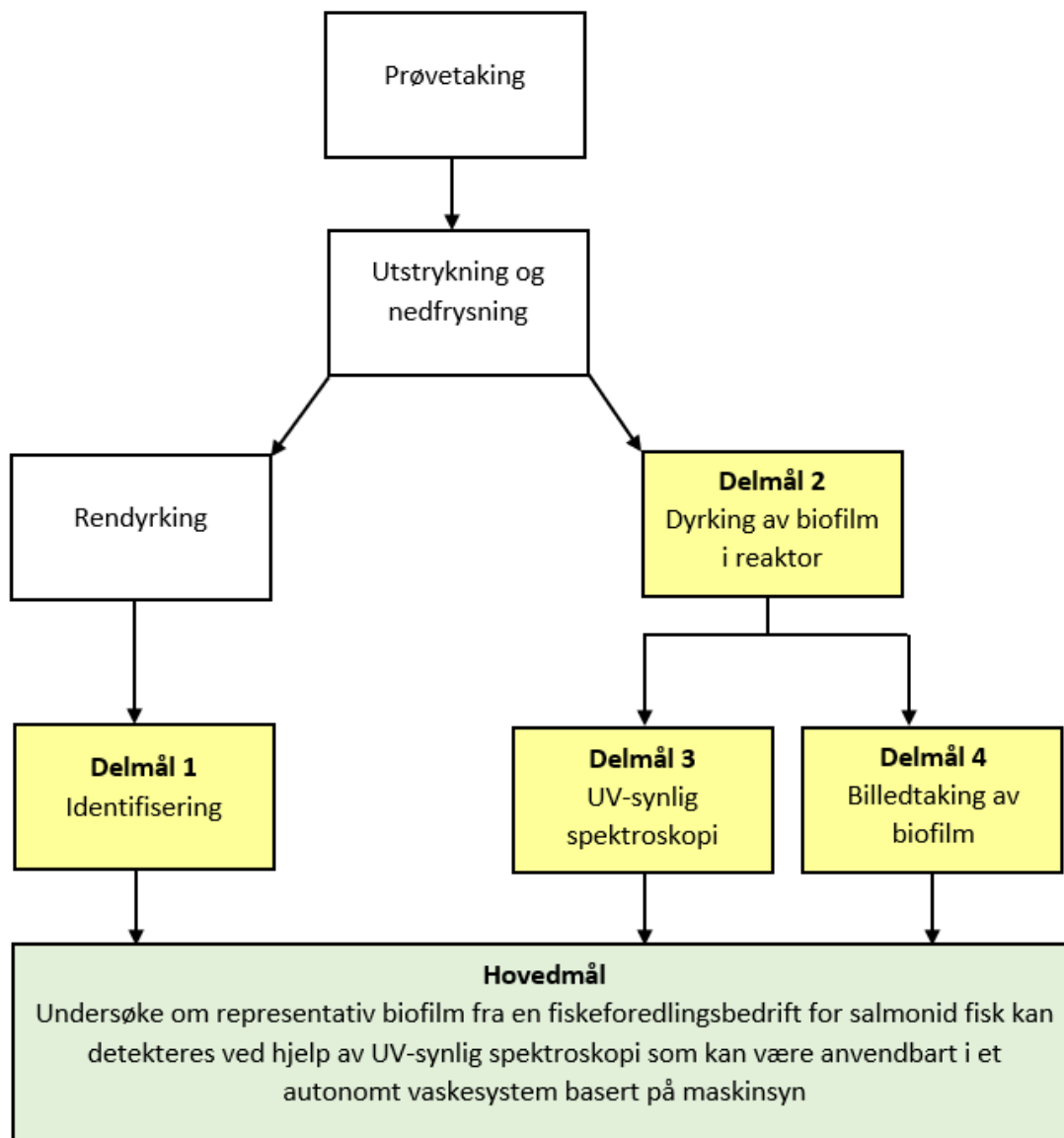
sender ut sterkes fluorescens ved 280 nm eksitasjon. Dette skyldes de aromatiske aminosyrene tryptofan, tryosin og fenylalanin som finnes i de fleste proteiner (Hill et al., 2009). Selv om tyrosin og fenylalanin også kan utsende fluorescens ved 280 nm eksitasjon, stammer fluorescensen i proteiner hovedsakelig fra tryptofan (Dalterio et al., 1986, Fischer et al., 2012, Lakowicz, 2006a). Tryptofan er derfor mye brukt som en indikator på bakterie- og biofilmvekst ved maksimal eksitasjon ved 280 nm og med maksimal emisjon ved rundt 350 nm (Angell et al., 1993, Ammor, 2007, Fischer et al., 2015, Fischer et al., 2012). Det kan forekomme endringer i emisjonsspekteret som følge av at fluorescensen fra tryptofan er svært sensitiv ovenfor sitt nærliggende miljø (Hill et al., 2009, Lakowicz, 2006a). Fluorescens fra tryptofan kan også slukkes av nærliggende grupper som $-NH_3^+$ og $-CO_2H$ (Lakowicz, 2006a). Tyrosin kan eksitere i lignende områder som tryptofan, men har en maksimal eksitasjon ved 275 nm og utsender sterkest fluorescens ved 300 nm. Fenylalanin utsender maksimal fluorescens rundt 280 nm ved 260 nm eksitasjon (Ammor, 2007). Andre fluorescerende molekyler i bakterier er enzymer, NADH og NADPH, som eksiterer ved lengre bølgelengder (Ammor, 2007).

2.7.4. Maskinsyn

I et typisk maskinsynssystem sendes det ut lys fra en lyskilde som interagerer med testobjektet, passerer gjennom bildeoptikken og når til slutt sensoren der lyset omdannes til et elektrisk signal (Beyerer et al., 2016). Det analoge signalet, som vanligvis er en elektrisk spenning, diskretiseres og begrenses, og kan så lagres som et digitalt bilde og behandles av et datasystem. For å fjerne forstyrrende bakgrunnsstøy og andre irrelevante komponenter forsøker den etterfølgende bildegjenoppbyggingsprosessen å kun beholde den relevante informasjonen. På denne måten klarer systemet å forbedre bildedataene som deretter kan deles inn i regioner eller behandles for å trekke ut relevant informasjon. Avhengig av den visuelle oppgaven kan det utføres ulike beslutninger som påvisning, klassifisering eller tolkning. Bildeinnsamlingsprosessen er det viktigste trinnet for å oppnå riktig mengde informasjon av god kvalitet. Innsamlingen må være velfungerende for at det visuelle inspeksjonssystemet skal fungere optimalt. Et maskinsynssystem gir enorme muligheter dersom det brukes riktig, men kan imidlertid kun benyttes systematisk med nødvendig kunnskap og med et konsept som er tilpasset det aktuelle formålet. I følge Beyerer et al. kan maskinsyn brukes for å oppnå automatisert visuell kontroll, og benyttes i dag ved industrielle målinger og kvalitetskontroll i flere sektorer (Beyerer et al., 2016).

3. Material og metode

Hovedmålet med denne masteroppgaven var å undersøke om representativ biofilm fra en fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk kan detekteres ved hjelp av UV-synlig spektroskopi som kan være anvendbart i et autonomt vaskesystem basert på maskinsyn. For å kunne belyse oppgavens delmål (se 3.1) ble det samlet inn bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk i Midt-Norge. Prøvene ble tatt på ulike relevante områder etter rengjøring og desinfisering. For å belyse delmål 1 ble en relevant fremdyrket bakterieprøve plukket ut til identifisering. Relevant metode for identifisering ble brukt for å identifisere bakterieartene i prøven. For å belyse delmål 2 ble det utviklet et reaktorsystem for biofilmdyrking på glassplater under simulerte produksjonsforhold. Biofilmen som ble dyrket frem i reaktorforsøket ble brukt for å belyse delmål 3, der biofilmen ble detektert med hjelp av UV-synlig spektroskopi og fluorescens. Til slutt ble delmål 4 belyst ved å undersøke om det var mulig å ta bilde av fluorescens fra biofilm med kamera som kan anvendes i et maskinsynsystem. Forsøkene ble utført på mikrobiologisk laboratorium ved institutt for bioteknologi og matvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet, og fant sted mellom januar og april 2018. En oversikt over metodene som er brukt i oppgaven knyttet til oppgavens delmål og hovedmål er vist i figur 3.1.



Figur 3.1 Oversikt over metodene som er brukt i oppgaven knyttet til delmål og hovedmål

3.1 Prøvetaking

3.1.1 Målet med prøvetakingen

Målet med prøvetakingen var å samle inn bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk etter rengjøring og desinfisering, som senere kunne benyttes i ulike forsøk for å belyse delmålene (se 3.3, 3.4, 3.5 og 3.6). Prøvetakingen var derfor et viktig ledd i flere av forsøkene som ble utført. Prøvene ble tatt etter rengjøring og desinfisering fordi det kan være rimelig å anta at denne mikrobiotaen består av bakterier som har en god evne til å leve i eller danne biofilm (Heir et al., 2018), og dermed være relevante for videre forsøk knyttet til oppgaven. Valg av fiskeforedlingsbedrift ble basert på at bedriften

er en stor og gjennomsnittlig bedrift, og at den var tilgjengelig som en del av *RoboWash* prosjektet.

3.1.2 Utførelse

Temperaturen i lokalene under prøvetakingen var omkring 10 °C. Prøvetakingen ble utført før produksjonsstart (etter rengjøring og desinfisering). Det ble tatt ut ti prøver med sterile svabere som inneholdt 10 ml PBS (Promedia, Norge) og åtte prøver med sterile prøvetakingskluter som var fuktet med 25 ml peptonløsning (Sodibox, Frankrike). Svaberne og prøvetakingsklutene ble ført langs overflatene på utvalgte områder (10x10 cm) i produksjonen (se figur 3.2). Prøvene ble tatt ulike steder i prosessen fra råvare til ferdig produkt. Prøvetakingen inkluderte miljøprøver (sluk, gulv, ledninger og skap) og utstysprøver (transportbånd, sløyemaskiner og fileteringsmaskin). Valg av prøvetakingsområder ble basert på problemområder (biofilm) erfart av bedriften, og potensielle risikoområder observert under prøvetakingen. Prøvene ble oppbevart i en isoporeske med kjølemedium under transport, og ble deretter satt i kjøleskap (4 °C) frem til utstrykning som fant sted etter 15 timer (se 3.2).



Figur 3.2 Prøvetaking på overflater i en fiskeforedlingsbedrift med svaber og prøvetakingsklut (Foto av Harry Westavik)

3.2 Utstrykning og nedfrysning

3.2.1 Målet med forsøket

Målet med forsøket var å dyrke bakterieprøver på generelt medium som senere kunne benyttes til identifisering og biofilmdyrking (se 3.3 og 3.4).

3.2.2 Forsøksdesign

Posene med prøvetakingskluter ble tilsatt peptonvann (500 ml), og ble deretter behandlet i stomackermaskin (Seward Medical UAC House, England) (1 min). Bakteriesuspensjon (10 ml) ble pipetert ut fra hver stomackerpose over i reagensrør (15 ml). Reagensrørene og svaberprøvene ble ristet i vortexer (Fisherbrand, Italia) (1 min) før suspensjon (100 µl) fra hver prøve ble sådd ut på Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM0325, England) med steril platespreder. PCA ble brukt som medium for ikke å selektere enkelte bakteriearter fra prøvene. Skålene ble satt til inkubasjon ved 10°C i tre døgn. Inkubasjonstemperaturen ble satt til 10 °C for å simulere temperaturforholdene som var til stede i fiskeforedlingsbedriften.

Etter inkubasjon ble fire relevante bakterieprøver fryst ned ved å tilsette Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid CM0129, England) med 20 % glyserol (VWR international, Belgia) (2 ml) i hver PCA-skål. Bakteriekoloniene ble suspendert i buljongen ved å føre en steril platespreder langs overflaten av agarskålen frem og tilbake. Bakteriesuspensjonen ble så overført til ampuller med en pipette, og satt i fryser (-80 °C) frem til videre analyser (se 3.3 og 3.4).

3.3 Identifisering

3.3.1 Målet med forsøket

Målet med forsøket var å belyse delmål 1, som gikk ut på å *identifisere bakteriearter som er tilstede etter rengjøring og desinfisering i en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk.*

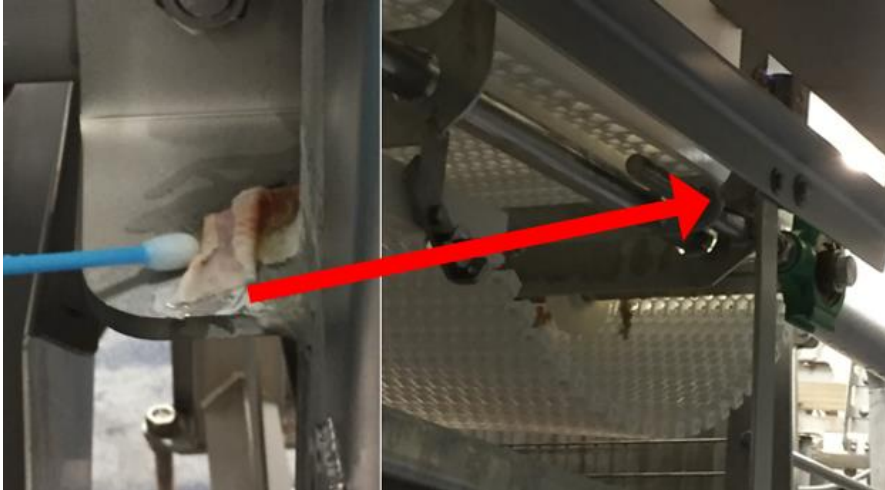
3.3.2 Rendyrking

Fire ampuller med fire relevante bakterieprøver ble tatt opp av fryseren (-80°C) og tint i romtemperatur (10 min). Bakteriesuspensjon (100 µl) fra hver ampulle ble sådd ut på PCA-skåler og inkubert ved 10°C i tre døgn. Etter inkubasjon ble det plukket ut 10 kolonier med ulikt utseende fra hver av de fire skålene. Hver koloni ble plukket og strøket ut på ny PCA-skål med en steril podeøse. Skålene ble satt til inkubasjon ved 10°C i 24 timer. Samme prosedyre ble gjentatt en gang til for å sørge for at prøvene ble fullstendig rendyrkede.

3.3.3 Identifisering ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System

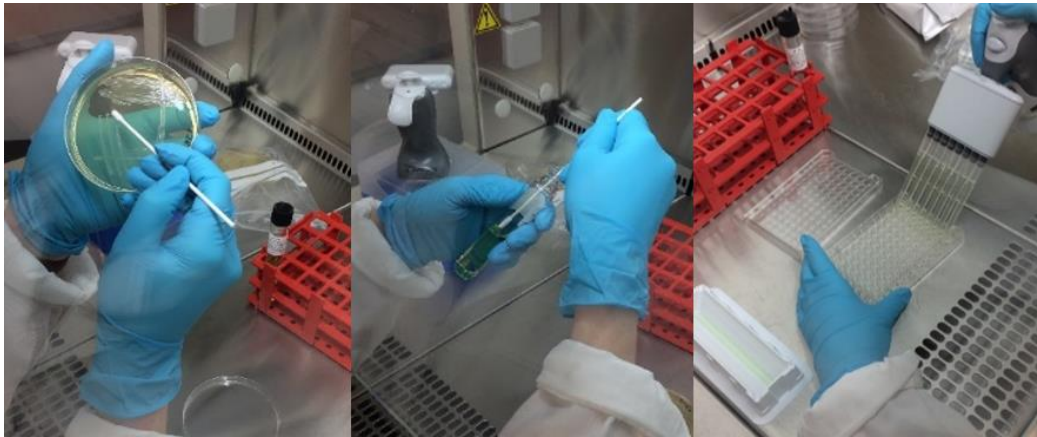
Det ble valgt ut ni isolater fra rendyrkingen som stammet fra en relevant prøve som var merket S9B. Prøve S9B ble hentet ut med svaber på et område med fiskerester under et

transportbånd (se figur 3.3). Denne prøven ble ansett som relevant fordi bedriften informerte om at de hadde problemer med biofilmvekst på slike områder under transportbåndene.



Figur 3.3 Prøve S9B ble hentet fra et område med fiskerester fra salmonid fisk under et transportbånd (Foto Harry Westavik)

Isolatene fra prøve S9B ble identifisert ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System (BIOLOG Inc., CA, USA). BIOLOG turbidimeter ble brukt for å måle mengden kolloidale partikler i hver prøve. Turbidimeteret ble først kalibrert med BIOLOG saltvannsløsning. Hver koloni ble inokulert i Inoculating Fluid Protocol A (IFA, BIOLOG) ved å plukke en koloni fra hver PCA-skål med en steril bomullssvaber. Prøvene ble inokulert i hvert sitt inokuleringsrør til en tetthet som tilsvarte mellom 0,85 og 0,95 % transmittans. Hver prøve ble helt over i et sterilt plastbeger (BIOLOG) og overført til GEN III MicroPlate ved hjelp av en elektronisk pipette (BIOLOG). Prosedyren er vist i figur 3.4. Platene ble satt til inkubasjon ved 10 °C i 24 timer. Ved avlesning ble hver plate plassert i MicroStation Reader (BIOLOG). Identifikasjon ble avlest i RetroSpect software (BIOLOG) etter 24 timer.



Figur 3.4 Prosedyre for inokulering av bakterieprøve og overføring til GEN III MicroPlate (Foto Line Meidell)

3.4 Dyrking av biofilm i reaktor

3.4.1 Målet med forsøket

Målet med forsøket var å belyse delmål 2, som gikk ut på å *undersøke om bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk danner biofilm under simulerte forhold på laboratorium*. Det ble utviklet et reaktorsystem i samarbeid med veileder basert på Drip flow reaktoren (Goeres et al., 2009).

3.4.2 Design av reaktoroppsettet

Figur 3.5 viser oppsettet til reaktorsystemet som bestod av en beholder med næring/buljong (1), en pumpe (2) med slange for overføring av medium fra beholder til klimakammeret, et klimakammer med to mikroskopglass festet til to metalldele ved hjelp av magneter (3), og en avfallsboks (4). For å simulere forholdene i en fiskeforedlingsbedrift ble biofilmen dyrket i et lukket klimakammer med begrenset luftig for å oppnå et fuktig miljø. Temperaturen ble også satt til 10 °C for å simulere temperaturforholdene som var tilstede i produksjon. Pumpen ble tidsinnstilt slik at prøveglassene ble tilført næring i 16 timer, med åtte timer innlagt pause for å simulere forholdene på overflater når det er stopp i produksjonen. Alt utstyr som ble brukt i forsøket ble autoklavert og/eller spritet før forsøkets oppstart. Reaktorforsøket ble utført to ganger ved å følge samme prosedyre (se 3.6.2). Forsøkene omtales heretter som reaktorforsøk 1 og 2. Begge forsøkene pågikk i 13 dager.



Figur 3.5 Oppsett for dyrking av biofilm i reaktor

3.4.3 Forsøksdesign

På bakgrunn av resultatene fra identifiseringen ble det valgt å benytte bakterieprøve S9B, fordi artene som ble identifisert i prøven er kjent som gode biofilmdannere (se 4.1 og 5.1). Prøven ble brukt ved reaktorforsøk 1 og 2. Prøve S9B ble tatt opp av fryseren (-80 °C) og tint ved å stå i romtemperatur (10 min). Det ble brukt en steril podeøse til å overføre bakteriesuspensjon over i et reagensrør fylt med buljong (trypton 5,0 g/l (Oxoid CM., Norge), gjær-ekstrakt 2,5 g/l (Oxoid, CM.. Norge), glukose (VWR International, Belgia)1,0 g/l) (10 ml). Den samme buljongen ble brukt som næring i reaktorsystemet (se nr. 1 i figur 3.5). Prøven ble ristet i vortexer (1 min). OD ble målt til 0,160 i transmittans med bølglengde på 600 nm i et spektrofotometer (600 nm, Shimadzu UV spectrophotometer, Japan), ved å overføre bakteriesuspensjon (1 ml) over i en kyvette. Prøven ble målt opp mot en kyvette fylt med buljong (1 ml). Det resterende av bakteriesuspensjonen i reagensrøret ble så ristet i en vortexer (1 min) og suspensjon ble overført til tre mikroskopglass med sterile podeøser. Prøveglassene ble så liggende til tørking i avtrekksskap (20 min). Et prøveglass ble brukt til deteksjon av biofilm ved dag 0 i forsøk 3.5, mens to av glassene ble festet til metalldelene i prøveboksen i reaktorsystemet ved hjelp av magneter. Metalldelene hadde en vinkel på 35° slik at buljongen skulle renne ned over glassene. Prøveglassene ble montert med innfestning øverst slik at de ble hengende fritt med luft over og under glasset. Glassene ble plassert slik at buljongen fra slangene traff øverste del av glassene (se figur 3.6). Pumpen ble tidsinnstilt slik at reaktorsystemet ble tilført næring i 16 timer, med 8 timer stopp for å simulere

produksjonsstopp i en fiskeforedlingsbedrift. Det ble tilført 0,25 dl næring til hvert glass per time når næringstilførselen pågikk.



Figur 3.6 Prøveboks med slanger montert over glassplatene med bakterieprøver

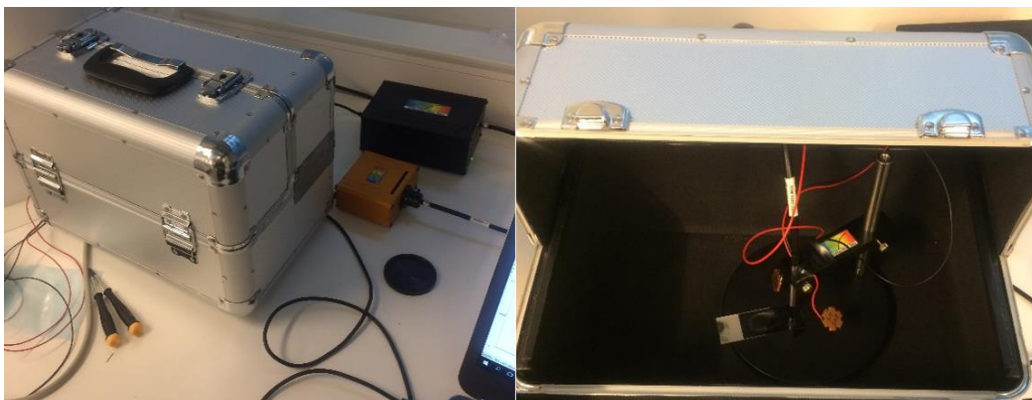
3.5 Deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi

3.5.1 Målet med forsøket

Målet med forsøket var å belyse delmål 3, som gikk ut på å vurdere om biofilm dyrket med bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk kan detekteres ved hjelp av UV-lys. Ved deteksjon ble UV-synlig spektroskopi brukt med en UV-LED lampe med bølgelengde på 280 nm. Denne bølgelengden ble valgt som relevant ut ifra at tryptofan er kjent for å utsende maksimal fluorescens i bakterier ved 280 nm eksitasjon (se 2.7.3.1).

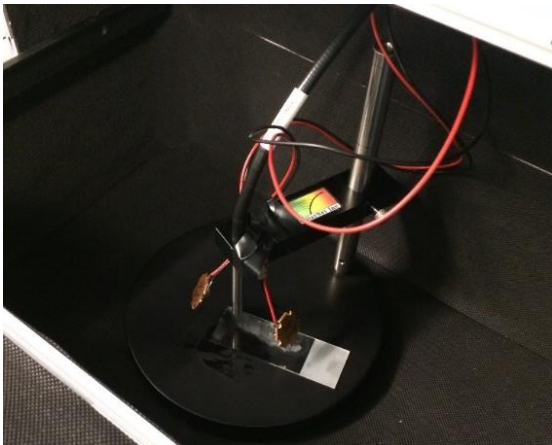
3.5.2 Forsøksdesign

Oppsettet ble satt opp slik at UV-LED lampen ble montert inni et metallkammer som kunne åpnes og lukkes for å stenge lyset ute under forsøket (se figur 3.7).



Figur 3.7 Oppsettet for deteksjon av biofilm med UV-synlig spektroskopi montert i et metallkammer

Deteksjonen ble utført med et UV-synlig spektroskop (BLACK-Comet, Stellar-Net Inc, USA) tilkoblet en lyskilde for UV- og synlig lys (SL1-LED source, StellarNet). Det ble brukt en UV-LED lampe med bølglengde på 280 nm. Ved deteksjon var metallkammeret lukket. Utstyret ble tilkoblet PC og SpectraWiz software (StellarNet). I SpectraWiz ble spekteret korrigert for elektrisk støy ved å lagre en svartreferanse før UV-LED lampen ble skrudd på, og en lysreferanse når UV-LED lampen ble skrudd på. Lysreferansen som ble brukt var en hvit refleksjonsstandard med diameter på 50 mm (RS-50, StellarNet). «Detector integration time» ble satt til 1000 ms, og «number of scans to average» ble satt til 10. Dette vil si at en kurve for respons i SpectraWiz var et gjennomsnitt av 10 scann. Dette ble gjort for å redusere mengden målestøy. Glass med biofilm eller tryptofan oppløst i vann ble detektert ved å legge glasset under UV-LED lampen (se figur 3.8). UV-LED lampen ble montert 3 cm over prøven. Kammeret ble så lukket for å stenge lyset ute. Resultatene ble avlest SpectraWiz etter noen sekunder og lagret i programmet.



Figur 3.8 Glass med biofilm plassert under UV-LED lampen i prøveboksen

Proseduren over ble fulgt ved deteksjon av alle prøvene. Et mikroskopglass med tryptofan oppløst i autoklavert destillert vann (1 mg/ml (Alfa Aesar, Tyskland) ble først detektert for å demonstrere spekteret for tryptofan-fluorescens (Hill et al., 2009). Glasset med prøve ble lagt til tørking (20 min) før forsøkets oppstart. Ved deteksjon av biofilm ble glassene med biofilm fra reaktorforsøket brukt. Prøveglass med biofilm ble testet for respons ved dag 0, dag 5 og dag 13, både ved reaktorforsøk 1 og 2 (se 3.4). Det ble brukt ulike glass med biofilm ved hver forsøksdag for å unngå at bakterier som senere skulle detekteres hadde tatt skade av UV-lyset. Biofilm som vokste på lokket i avfallsboksen under reaktorforsøket ble også detektert ved å overføre biofilmen til ett mikroskopglass med en steril pødeøse. Samme prosedyre ble brukt ved alle deteksjonsforsøkene (se 3.5.2).

Resultatene fra UV-synlig spektroskopisk analyse ble behandlet i Microsoft Excel for Windows (Microsoft Inc.). Gjennomsnitt ble beregnet for verdiene ved responsen fra 10 ulike prøvepunkt ved deteksjon av hver prøve. Det ble utført en variasjonsanalyse for å undersøke om det var en statistisk signifikant forskjell i responsen fra biofilm ved forsøksdag 0, 5 og 13 i reaktorforsøk 2 (se 4.6).

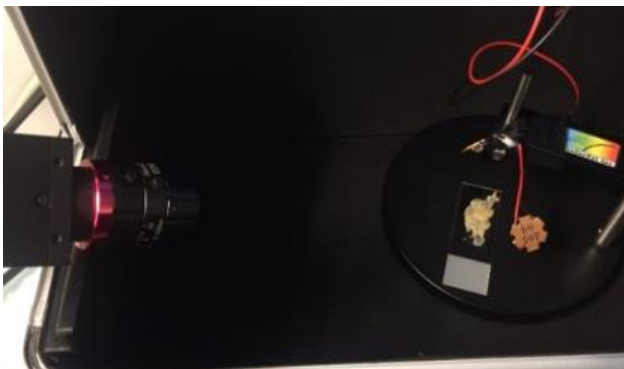
3.6 Bildetaking av biofilm

3.6.1 Målet med forsøket

Målet med forsøket var å belyse delmål 4, som gikk ut på å undersøke muligheten for å ta bilde av fluorescens fra biofilm ved hjelp av maskinsyn.

3.6.2 Forsøksdesign

Sintef Ocean jobber med maskinsyn i flere prosjekter, inkludert RoboWash prosjektet, og valg av kamera og annet utstyr ble derfor basert på tidligere erfaringer fra deres prosjekter. Biofilm ble avbildet ved reaktorforsøk 2. Det ble tatt bilde av biofilm fra avfallsboksen og biofilm fra klimakammeret ved forsøksdag 13 (se 4.2.2). Biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet ble overført til et mikroskopglass før avbildning. Bildene ble tatt med prøven liggende under UV-LED lampen med lyset på for å kunne ta bilde av responsen til biofilmen. Det ble tatt bilde med et Point Grey Grasshopper3 kamera (Model GS3-U3-23S6M) med en Edmund Optics linse (35 mm focal length, 67716, USA) (se figur 3.9). Biofilm fra klimakammeret ble avbildet med et 330 nm filter (Edmund Optics, USA) som stengte ute lys under 330 nm, og biofilm fra avfallsboksen ble avbildet med et UG-1 filter (Schott, England) egnet for avbildning i bølgelengdeområdet mellom 300 og 400 nm. Prøveglassene ble avbildet med største blenderåpning (F1.65) og med en eksponeringstid på 1 sekund, og med maksimal gain (16dB) på bildebrikken. Bildene ble tatt i 12-bit.



Figur 3.9 Bildetaking av biofilm fra avfallsboksen (kameraet som ble brukt er vist til venstre i figuren)

Det ble også forsøkt å ta bilder når to UV-LED emittere (RayVio Corporation, USA) med 280 nm var festet i boksen slik at de lyste på biofilmen. Emitterne var koblet til en spenningskilde slik at lysstyrken kunne justeres ved bruk av samme bølgelengde (280 nm). Dette ble gjort for å undersøke om responsen ble sterkere hvis styrken på lyset økte.

4. Resultater

I dette kapitlet presenteres resultatene som sammen skal belyse oppgavens hovedmål og delmål. Resultatene er hovedsakelig presentert i tabeller og grafer med tilhørende beskrivelser. Kapitlet presenterer resultatene fra identifiseringen, der målet var å undersøke bakteriearter som er tilstede etter rengjøring og desinfisering i en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk. Deretter presenteres resultatene fra reaktorforsøk 1 og 2, der målet var å undersøke om bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk danner biofilm under simulerte forhold på laboratorium. Resultatene fra deteksjon med UV-synlig spektroskopi er lagt frem for å kunne vurdere om biofilm dyrket med bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk kan detekteres ved hjelp av UV-lys. Resultatene er presentert i grafer som viser responsen til tryptofan oppløst i vann, en sammenligning av biofilm-responsene ved dag 0, dag 5 og dag 13, samt en graf som viser respons for biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet. Det ble også utført en en-faktor variansanalyse for å undersøke om det er en signifikant forskjell i biofilm-responsene ved dag 0, dag 5 og dag 13. Til slutt presenteres resultatene fra bildetakning av biofilm for å kunne vurdere muligheten for deteksjon av biofilm med maskinsyn.

4.1 Identifisering

Isolater fra prøve S9B, som ble tatt i nærheten av fiskerester fra salmonid fisk under et transportbånd, ble identifisert. Tabell 4.1 viser at 9 isolater fra prøve S9B (S9B1-S9B9) ble identifisert ved bruk av BIOLOG MicroLog ID System. Artene ble identifisert etter 24 timer. Resultatene viser at 8 av 9 isolater (88,89 %) ble identifisert som arter av *Pseudomonas* spp., mens ett isolat (11,11 %) ble identifisert som *Acinetobacter schindleri*. PROB viser estimert sannsynlighet for en identifikasjon og SIM viser likhetsverdien. Likhetsverdien brukes til å vurdere hvor godt en prøve er identifisert. En SIM-verdi på 1 er en perfekt match, mens en verdi på null indikerer at det ikke er noen match mellom prøven og bakterieartene i databasen.

Prøve	Bakterieart (ID)	PROB	SIM
S9B1	<i>Pseudomonas fragi</i>	0.646	0.646
S9B2	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.839	0.560
S9B3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.617	0.617
S9B4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.603	0.603
S9B5	<i>Pseudomonas lundensis</i>	0.660	0.660
S9B6	<i>Acinetobacter schindleri</i>	0.734	0.734
S9B7	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.885	0.584
S9B8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.575	0.575
S9B9	<i>Pseudomonas lundensis</i>	0.631	0.631

Tabell 4.1 Resultater fra identifisering med BIOLOG MicroLog ID System. Tabellen viser prøvenummer (prøvested og isolat), påvist bakterieart (bakterieartsidentifikasjon), PROB (sannsynlighetsverdien for riktig ID) og SIM (likhetsverdi).

Ved avlesning i RetroSpect software (BIOLOG) foreslår programmet totalt 4 mulige ID for hver prøve. De fire forslagene er rangert etter PROB og SIM, der forslag 1 har høyest PROB og SIM. Bakterieartene i tabell 4.1 er hentet fra forslag 1, som vil si at artene ble rangert som mest sannsynlig blant de 4 forslagene.

Ved vurdering av resultatenes pålitelighet regnes forslag 1 som sannsynlig dersom de 3 andre rangerte artene er av samme slekt som forslag 1, samtidig som SIM for forslag 1 er større enn 5. For prøvene som ble identifisert som *Pseudomonas* (S9B1-S9B5 + S9B7-S9B9) var alle de foreslåtte artene i slekten *Pseudomonas*, og for prøven som ble identifisert som *Acinetobacter* (S9B6) var alle de foreslåtte artene i slekten *Acinetobacter*. Tabell 4.1 viser også at SIM var høyere enn 5 for alle prøvene. Resultatene kan derfor vurderes som pålitelige, og isolatene tilhører mest sannsynlig slektene *Pseudomonas* og *Acinetobacter*.

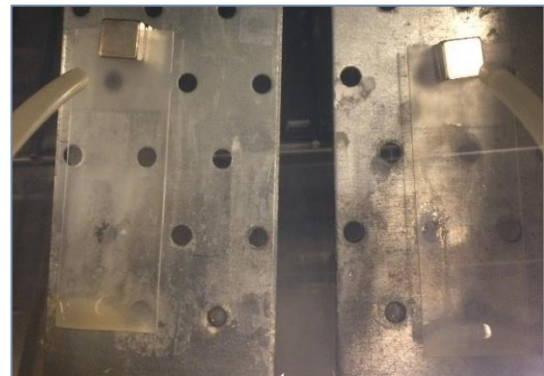
4.2 Dyrking av biofilm i reaktor

4.2.1 Reaktorforsøk 1

Figur 4.1 viser prøveglassene ved forsøksdag 0, som vil si dagen reaktorforsøket startet. På dette tidspunktet var glassene nettopp podet med bakterieprøver og det var derfor ingen synlig vekst på glassene. Biofilm ble observert visuelt ved forsøksdag 5 (figur 4.2). Ved dag 5 hadde glassplatene et gjennomsiktig belegg som hovedsakelig var sentrert på den nederste delen av glassene. Ved forsøksdag 13 ble det observert en større mengde biofilm på glassene, sammenlignet med dag 5 (figur 4.3). Veksten var sentrert rundt områdene der mediet hadde truffet glassene. Det ble fremdeles observert mest vekst ved nederste del av glassene.



Figur 4.1 Prøveglass ved dag 0



Figur 4.2 Prøveglass med biofilm ved dag 5



Figur 4.3 Prøveglass med biofilm dag 13

4.2.2 Reaktorforsøk 2

Ved reaktorforsøk 2 var de visuelle observasjonene nærmest identiske med observasjonene som fant sted i forsøk 1. Figur 4.4 viser prøveglassene ved forsøksdag 0 uten biofilmvekst. Figur 4.5 viser at det ble observert biofilm ved dag 5. Glassplatene hadde også her et gjennomsiktig belegg som hovedsakelig var sentrert på den nederste delen av glassene. Figur 4.6 viser biofilm som ble observert ved dag 13, der biofilm var synlig i samme områder som ble observert ved dag 13 i reaktorforsøk 1.



Figur 4.4 Prøveglass ved dag 0



Figur 4.5 Prøveglass med biofilm ved dag 5



Figur 4.6 Prøveglass med biofilm ved dag 13

Ved reaktorforsøk 2 ble det også observert et lag med biofilm på lokket i avfallsboksen. Denne biofilmen var mye tykkere en biofilmen som ble dyrket i klimakamrene (se figur 4.7). Biofilmen ble overført til mikroskopglass og testet for respons med UV-synlig spektroskopi (se 4.3.3), i likhet med biofilmen fremdyrket i klimakammeret ved reaktorforsøk 2 (se 4.3.2)



Figur 4.7 Biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet overført til mikroskopglass

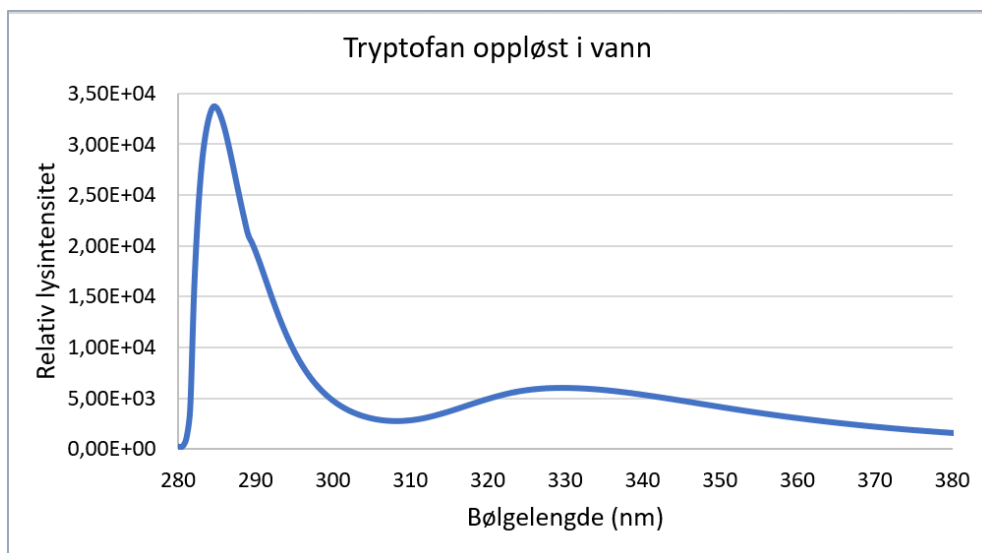
4.3 Deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi

For å kunne vurdere om biofilm kan detekteres ved hjelp av UV-synlig spektroskopi var det ønskelig å undersøke om biofilm utsendte respons i det spektrale området der tryptofan er kjent for å utsende fluorescens. Tryptofan er som nevnt i litteraturstudiet kjent for å utsende sterkest fluorescens i bakterier, med maksimal fluorescens rundt 350 nm ved 280 nm eksitasjon (se 2.7.3.1). Med bakgrunn i det teoretiske grunnlaget ble en eksitasjonsbølglengde på 280 nm brukt ved deteksjon av alle prøvene. Resultatene som legges frem omfatter deteksjon av tryptofan oppløst i vann, biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13, samt deteksjon av biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet. På grunn av spektroskopiske målefeil ble det valgt å se bort ifra resultatene fra deteksjonen av biofilm dyrket ved reaktorforsøk 1. Resultatene for deteksjon av biofilm omfatter derfor biofilm som ble dyrket frem i reaktorforsøk 2.

Respons vil i dette delkapittelet referere til lysintensiteten eller mengden lys som sendes ut av den aktuelle prøven i et bestemt bølglengdeområde ved eksitasjon. Det er viktig å presisere at responsen kan omfatte både refleksjon og fluorescens. I områdene rundt eksitasjonsbølglengden (280 nm) vil responsen mest sannsynlig omfatte refleksjon av eksitasjonslyset fra overflaten, og ikke fluorescens. Variasjoner i responsen i dette området kan imidlertid gi informasjon om mengde absorbert lys. Det er derfor valgt å hovedsakelig presentere resultatene i det spektrale området mellom 280 og 380 nm, i stedet for å kun se på det forventede fluorescensområdet for tryptofan.

4.3.1 Deteksjon av tryptofan oppløst i vann

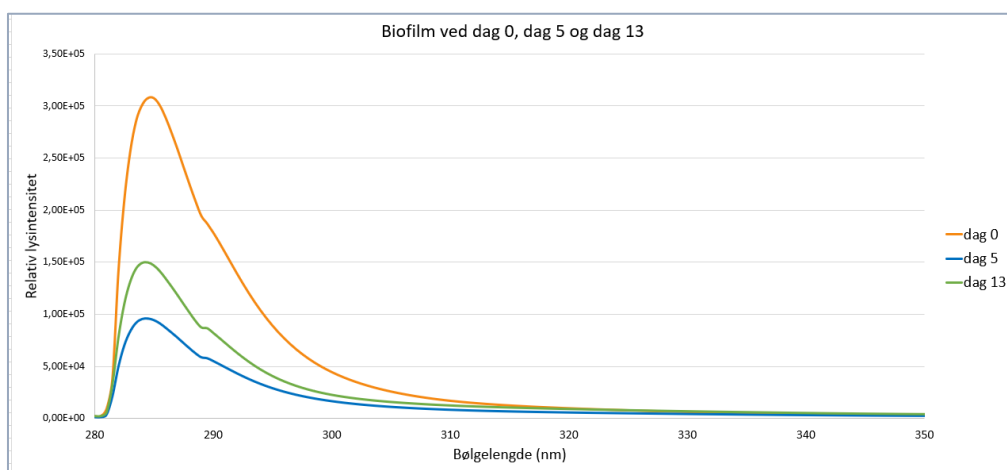
Figur 4.8 viser responsen fra prøven med tryptofan oppløst i vann. Grafen viser en respons i området mellom 310 og 350 nm, der høyeste respons ligger i området rundt 330 nm.



Figur 4.8 Respons for tryptofan oppløst i vann i det spektrale området mellom 280 og 380 nm

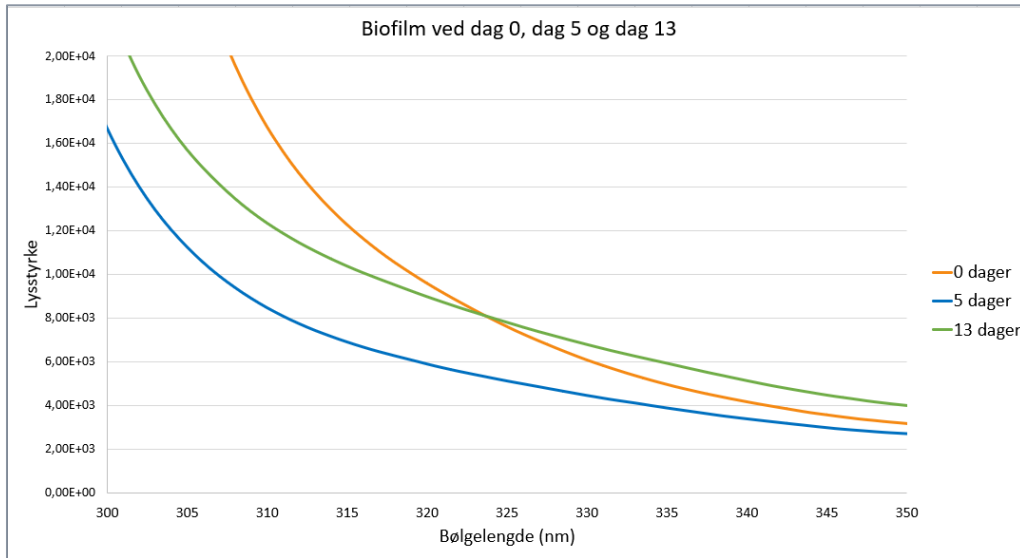
4.3.2 Deteksjon av biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13

Grafen i figur 4.9 viser samlede resultater for respons fra biofilm ved dag 0 (oransje), dag 5 (blå) og dag 13 (grønn). Resultatene viser ikke tegn til respons i området der tryptofan er kjent for å utsende fluorescens ved noen av dagene. Grafen viser likevel ulike amplituder ved de ulike dagene. Kurven for dag 0 har høyest amplitude, mens kurvene for dag 5 og 13 har en del lavere amplituder. Dette kan skyldes en større grad av absorpsjon av lys i biofilmen ved dag 5 og dag 13. Den høye amplituden i kurven for dag 0 kan skyldes en større grad av refleksjon av lys fra mikroskopglasset. Det er viktig å presisere at det er brukt tre glass med prøver, og at en ulikhet i responsene også kan skyldes variasjoner i prøvene.



Figur 4.9 Respons for biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13

Figur 4.10 viser et utsnitt av det spektrale område mellom 300 og 350 nm med respons fra biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13. Resultatene viser en krysning av responsene fra biofilm ved dag 13 (grønn) og dag 0 (oransje) ved ca. 325 nm, der responsen fra dag 13 går fra å være lavest av de to til å være høyest. Dette kan skyldes en liten respons fra biofilm fra dag 13 i området, men responsen er svært liten.



Figur 4.10 Utsnitt av spektralt område (300-350 nm) fra biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13

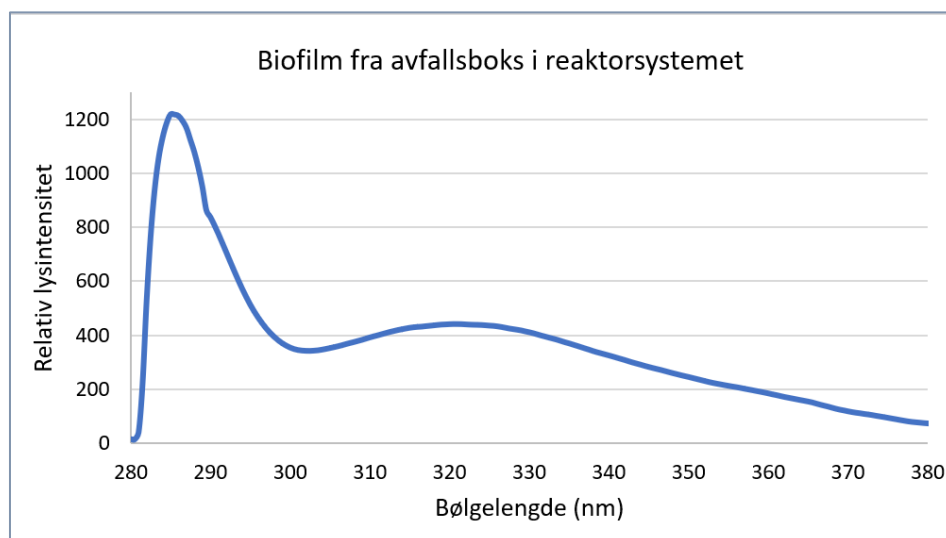
Det ble også utført en en-faktor variansanalyse for å undersøke om det er en statistisk signifikant forskjell i responsen ved de ulike dagene (se figur 4.11). Variansanalysen ble utført med $\alpha = 0,05$ i det spektrale området mellom 280 og 330 nm. Spektralt område ble valgt ut i fra at verdiene for de tre responsene var nærmest like i områdene etter 330 nm. P-verdien ble beregnet til $2,892E-07$ og er derfor mye lavere enn $\alpha=0,05$. Resultatene viser derfor en klar statistisk signifikant forskjell mellom responsen ved de ulike dagene i det spektrale området mellom 280 og 330 nm. Dette vil si at responsen påvirkes av antall forsøksdager.

Variansanalyse: en-faktor						
SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
null	109	7036073,36	64551,1317	7729468357		
fem	109	2412408,63	22132,1893	688085530		
tretten	109	3599497,59	33022,9137	1640962695		
Variansanalyse						
Variansjonskild	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	1,058E+11	2	5,2901E+10	15,7780889	2,8917E-07	3,0236026
Innenfor gru	1,0863E+12	324	3352838861			
Totalt	1,1921E+12	326				

Figur 4.11 Variansanalyse for responsen fra biofilm ved forsøksdag 0, 5 og 13

4.3.3 Deteksjon av biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet

Det ble observert et tykt lag med biofilm på lokket i avfallsboksen i reaktorsystemet. Det ble vurdert som interessant å undersøke om denne biofilmen ga en bedre respons enn de andre biofilmprøvene fra klimakammeret. Responsen ble målt ved å overføre biofilm fra avfallsboksen til et mikroskopglass. Figur 4.12 viser responsen fra biofilm fra lokket i avfallsboksen i reaktorforsøket. Figuren viser en respons i området mellom 300 og 340 nm, med høyeste respons i området rundt 320 nm.



Figur 4.12 Respons fra biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet

4.4 Bildetaking av biofilm

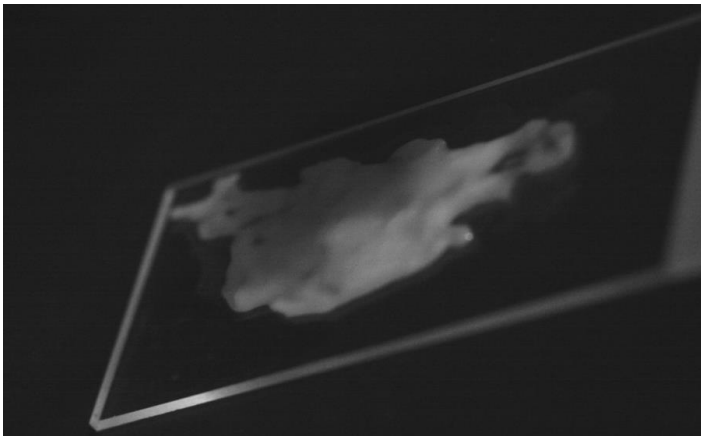
For å undersøke muligheten for å ta bilde av fluorescens fra biofilm ved hjelp av maskinsyn ble biofilm avbildet under UV-lys med et Point Grey Grasshopper3 kamera (Model GS3-U3-

23S6M), med en Edmund Optics linse (35 mm focal length, 67716). Det ble tatt bilder av biofilm ved dag 13 og biofilm fra avfallsboksen. Begge biofilmene var fra reaktorforsøk 2. Figur 4.13 viser bilde av biofilm fra klimakammeret ved dag 13 i reaktorforsøk 2, tatt med 330 nm filter og behandlet i 8-bit. Bildet viser svært liten respons og mye støy.



Figur 4.13 Biofilm fra klimakammeret ved dag 13, tatt med et 330 nm filter

Figur 4.14 viser bilde av biofilm fra avfallsboksen, tatt med UG-1 filter. Bildet viser en litt tydeligere respons enn figur 4.13, men fremdeles svært lite respons.



Figur 4.14 Bilde av biofilm fra avfallsboksen, tatt med et UG-1 filter

Bildene som ble tatt av biofilmene med to UV-LED emitterene over prøvene ga ingen tydeligere respons og ble derfor ikke lagt ved i resultatene.

5. Diskusjon

I dette kapittelet vil resultatene som ble lagt frem i resultatkapitlet bli diskutert nærmere. Resultatene viste at 9 isolater ble identifisert fra prøve S9B som var tatt under et transportbånd i en fiskeforedlingsbedrift etter rengjøring og desinfisering. Isolatene ble identifisert som arter i slektene *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. Resultatene fra reaktorforsøket viste at biofilm ble dannet på glass inokulert med prøve S9B ved forsøksdag 5. Resultatene fra UV-synlig spektroskopi viste at tryptofan oppløst i vann ga respons i området der tryptofan er kjent for å fluorescere, mens biofilmen som var dyrket frem i klimakammeret viste minimalt med respons i dette området. Resultatene viste likevel at amplitudene i området ved eksitasjonsbølgelengden var ulik ved de ulike dagene. Variansanalysen viste også en statistisk signifikant forskjell i responsen fra dag 0, dag 5 og dag 13. Resultatene for responsen fra biofilmen fra avfallsboksen viste en respons i området for tryptofan fluorescens. Resultatene fra bildetakingen viste svært lite respons, både ved avbildning av biofilm fra klimakammeret ved dag 13 og ved avbildning av biofilm fra avfallsboksen.

5.1 Identifisering

Delmål 1 (se 1.3) ble belyst ved å identifisere prøve S9B, som ble tatt etter rengjøring og desinfisering i en fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk i Midt-Norge. Prøven ble tatt i et fuktig produksjonsmiljø ved 10 °C, på et område i nærheten av fiskerester fra salmonid fisk under ett transportbånd (se 3.1 og 3.3.3). 9 isolater fra prøve S9B ble identifisert med BIOLOG MicroLog ID System. Resultatene viste at 8 av 9 isolater fra prøven ble identifisert som *Pseudomonas* spp. (88,89 %), mens det siste isolatet ble identifisert som *Acinetobacter schindleri* (11,11 %).

Langsrud et al. undersøkte mikrobiotaen på transportbånd i tre norske lakseforedlingsbedrifter, og fant at *Pseudomonas* spp., etterfulgt av *Acinetobacter* spp. og *Serratia* spp. dominerte etter rengjøring og desinfisering (Langsrud et al., 2016). Funnene samsvarer med at *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. ble identifisert fra prøve S9B som også ble tatt etter rengjøring og desinfisering under et transportbånd. *Serratia* spp. ble ikke påvist i prøve S9B. Det er viktig å poengtere at prøve S9B ble tatt med svabermetoden på et relativt lite område (10 x 10), og at resultatene kun gir begrenset med informasjon om et spesifikt område i fiskeforedlingsbedriften. Det må også poengteres at prøve S9B ble tatt i et

område under et transportbånd, og ikke på selve båndet. Det kan derfor ikke utelukkes at *Serratia* spp. var tilstede på transportbåndene, eller på andre områder i bedriften.

I følge Bagge-Ravn et al. domineres mikrobiotaen på overflater i prosesseringsanlegg for sjømat av bakterier fra råvaren (Bagge-Ravn et al., 2003). Hovda et al fant at *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Janthinobacterium* spp., *Acinetobacter* spp. og *Photobacterium phosphoreum* dominerte i tarmen til Atlantisk laks produsert i Vest-Norge, basert på dyrkningsbaserte identifiseringsmetoder (Hovda et al., 2007). Dette stemmer delvis overens med at *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. ble isolert fra prøve S9B. *Vibrio* spp., *Janthinobacterium* spp. og *Photobacterium phosphoreum* ble ikke påvist i prøve S9B. Prøve S9B ble tatt i en bedrift som foredlet fisk fra Midt-Norge, mens Hovde et al. undersøkte mikrobiotaen i tarm til fisk fra Vest-Norge. Ulikheter i den mikrobielle sammensetningen kan derfor skyldes miljømessige ulikheter i det geografiske området der fisken er produsert. Dette kan for eksempel innebære ulikheter i temperatur i luft og sjø. I følge Ringø et al. varierer bakterielle sammensetningen i fisketarmen også med saltkonsentrasjon i sjø, antibiotika, diett og ulike komponenter i kostholdet (Ringø et al., 1995). Det kan heller ikke utelukkes at *Vibrio* spp., *Janthinobacterium* spp. og *Photobacterium phosphoreum* var til stede på andre områder enn der prøve S9B er tatt. Prøve S9B ble tatt på et relativt lite område og representerer derfor ikke nødvendigvis den generelle mikrobiotaen i bedriften. Det er også en mulighet for at artene som ikke ble påvist var tilstede i fisken som ble foredlet, men ikke dominerer i mikrobiotaen i bedriften.

Resultatene fra identifiseringen stemmer delvis med funnene til Bagge-Ravn et al. som studerte mikrobiotaen i to foredlingsanlegg for kald-røkt laks som var produsert i Norge og Færøyene, og fant at gjær, *Pseudomonas* spp., *Neisseriaceae*, *Alcaligenes* og *Acinetobacter* dominerte etter rengjøring og desinfisering (Bagge-Ravn et al., 2003). Selv om gjær, *Neisseriaceae* og *Alcaligenes* ikke ble identifisert i denne oppgaven kan det ikke utelukkes at bakteriene var tilstede på andre overflateområder i bedriften. Det er heller ikke oppgitt hvor fiskeforedlingsanleggene var lokalisert. Det geografiske området kan ha en effekt på mikrobiotaen i bedriften, som følge av ulike parametere som temperaturforhold i vann og i sjø. Resultatene fra identifiseringen stemmer delvis med funnene til Møretrø et al. som fant at arter i slektene *Pseudomonas* og *Shewanella* dominerte i produksjonsmiljøet etter rengjøring i to norske fiskeforedlingsbedrifter for atlantisk laks (Møretrø et al., 2016). Selv om *Shewanella* ikke ble påvist i prøve S9B kan det ikke utelukkes at arter i slekten var tilstede i

bedriften. Møretrø et al. fant også at 72 og 91 % av prøvene som ble tatt i de to bedriftene ble identifisert som *Pseudomonas* spp., noe som stemmer godt overens med at 88,89 % av isolatene i prøve S9B ble identifisert som *Pseudomonas* spp.

I studien til Guobjoernsdottir et al. dominerte også *Pseudomonas* spp., sammen med *Enterobacteriaceae*, i en fiskeforedlingsbedrift (Guobjoernsdottir et al., 2005). Det er ukjent hvor bedriften var lokalisert, og det geografiske område kan muligens forklare at *Enterobacteriaceae* ble påvist i deres studie, og ikke i prøve S9B. Samme studie isolerte *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. fra transportbånd i fiskeforedlingsbedriften. Dette samsvarer med identifiseringen av *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* fra prøve S9B som var tatt med svaberprøve i et område under et transportbånd. Av *Pseudomonas* spp. som ble funnet i studiet til Guobjoernsdottir et al. var *P. putida* og *P. fluorescens* de mest dominerende artene. Dette stemmer delvis overens med resultatene i denne oppgaven der 2 av 8 *Pseudomonas*-isolater ble identifisert som *P. fluorescens*, mens *P. putida* ikke ble påvist i prøven. Som nevnt stammer ikke prøve S9B fra selve transportbåndet, men fra et område under båndet. Det kan derfor ikke utelukkes at *P. putida* var tilstede på transportbåndene i bedriften.

Pseudomonas spp. isoleres også ofte i annen næringsmiddelindustri etter vask og desinfisering (Brightwell et al., 2006, Hultman et al., 2015, Mettler and Carpentier, 1998, Møretrø et al., 2013, Stellato et al., 2015). I følge Møretrø et al. indikerer dominansen av *Pseudomonas* spp. etter rengjøring og desinfisering at enkelte arter har økt evne til å overleve i produksjonsmiljøet (Møretrø et al., 2016). Dette kan skyldes at *Pseudomonas* spp. er kjent som gode biofilmdannere (Heydorn et al., 2000, Moore et al., 2006) Det er også kjent at *P. fluorescens*, som ble påvist i to av isolatene, er kjent som en god biofilmdanner (O'Toole and Kolter, 1998). Påvisning av *Acinetobacter* spp. kan skyldes at artene er kjent for å vokse ved et stort spekter av ulike temperaturområder, har høy overlevelse på tørre overflater og er kjent for å danne biofilm (Doughari et al., 2011).

Prøve S9B, som ifølge resultatene inneholdt 88,89 % *Pseudomonas* spp., ble tatt i et fuktig produksjonsmiljø ved 10 °C etter rengjøring og desinfisering. Dette samsvarer med at *Pseudomonas* spp. er kjent for å vokse ved lave temperaturer, har lave vekstkrav, trives i vandige miljøer, er resistente mot desinfiserende midler og har god evne til å danne biofilm (Drenkard and Ausubel, 2002, Moore et al., 2006, Borenstein, 1994). Resultatene støtter også

påstandene om at et fuktig produksjonsmiljø med lave temperaturer på rundt 12 °C vil selektere for bakterier som trives ved lave temperaturer, og som har god evne til å overleve rengjøring gjennom biofilmdannelse eller andre resistente mekanismer (Langsrud et al., 2016).

5.2 Dyrking av biofilm i reaktor

Det ble utviklet et reaktorsystem basert på hovedprinsippene i drip flow reaktoren (DFR) beskrevet i (Goeres et al., 2009). I likhet med DFR inneholdt reaktorsystemet en beholder med medium, bakterieprøver inokulert på mikroskopglass i et lukket system, en pumpe med slange som overførte mediet til et prøvekammer og en avfallsboks som samlet opp brukt medium underveis i forsøket. Det som skiller reaktorsystemet benyttet i denne oppgaven fra DFR er hovedsakelig at det ikke ble brukt et kammer bestående av fire prøveglass. Det ble i stedet inokulert bakterieprøver på to mikroskopglass som ble festet til to metalldeleler fiksert ved hjelp av magneter i prøvekammeret.

Bakterieprøvene som ble inokulert på mikroskopglassene ble overført fra bakterieprøve S9B. Med bakgrunn i resultatene fra identifiseringen av prøve S9B kan det antas at *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. dannet biofilmen som ble fremdyrket i reaktorforsøk 1 og 2. Både *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. er kjent som gode biofilmdannere (Heydorn et al., 2000, Moore et al., 2006, Doughari et al., 2011) Biofilmdannelse blant bakteriearter i slektene *Pseudomonas* og *Acinetobacter* stemmer overens med funn fra Møretrø et al., som i sin studie fant at *Pseudomonas* spp. og *Acinetobacter* spp. var blant de bakteriene som produserte mest biofilm, sammen med *Citrobacter* (Møretrø et al., 2013). Stammene som ble brukt i studiet var isolert fra et kjøttslakteri, og biofilmen ble dyrket ved 12 °C. Dyrkningstemperaturen ligner temperaturen som fant sted i reaktorforsøkene, som var på 10 °C. Det må likevel poengteres at det ikke er isolert prøver direkte fra biofilmene i denne oppgaven, og at det derfor er en usikkerhet knyttet til fordelingen av artene som var tilstede i reaktorforsøkene. Det er også en risiko for at klimakammeret ble kontaminert ved dag 5, når kammeret ble åpnet for å hente ut det ene prøveglasset til UV-synlig spektroskopisk analyse. Det ansees likevel ikke som sannsynlig, da glasset ble tatt ut med sterile hansker, og kammeret ble lukket igjen etter noen sekunder.

For å simulere produksjonsforholdene i fiskeforedlingsbedriften ble prøveglassene stående ved 10 °C, hvor det ble dryppet medium i et lukket klimakammer uten lufting for å oppnå et fuktig miljø. For å simulere produksjonsforholdene med 8 timer stopp i produksjon, stoppet tilførselen av næring i 8 timer hver dag. Det ble brukt et generelt medium som næring, for ikke å favorisere for enkelte arter. Det ble tilført 0,25 dl medium per time på hver prøve når tilførselen pågikk. Biofilmen ble dyrket på glass fordi det var ønskelig å detektere biofilm på glass med UV-synlig spektroskopi for å minimere støy (se 5.3).

Resultatene viste at det ble observert biofilm visuelt ved dag 5, ved reaktorforsøk 1 og 2. Glassene hadde da et slimlag nederst på glassene. Ved dag 13 ble det observert en større mengde biofilm, både på nederste del av glasset og rundt områdene der mediet hadde truffet glassene. Dette kan tyde på at bakteriene på midten av glasset ikke har rukket å feste seg før mediet begynte å dryppe, og dermed har rent med mediet til nederste del av glasset.

En begrensning ved bruk av reaktorsystemet utviklet i denne oppgaven var at et begrenset antall prøver kunne dyrkes. Det tok også relativt lang tid (5 dager) før biofilm ble observert i hvert av forsøkene. Dette kan komme av at for få bakterier ble inokulert på glassene ved forsøkets oppstart. Det kunne derfor vært hensiktsmessig å standardisere bakteriemengden som ble inokulert i forsøket, for så å kunne øke mengden bakterier ved neste forsøk. Treg biofilmdannelse kan også skyldes andre forhold, som for eksempel at prøvene sto uten tilførsel av vann og næring i 8 timer hver dag fra første forsøksdag. Arter i slekten *Pseudomonas* er kjent som typiske vannbakterier (Borenstein, 1994), og det er derfor en mulighet for at miljøet ikke har vært gunstig for arter i denne slekten. *Acinetobacter* spp. er derimot kjent for å ha høy overlevelse på tørre overflater (Doughari et al., 2011).

Det er også en mulighet for at bakteriene ikke rakk å feste seg til glassene før tilførselen av mediet startet. Som nevnt i litteraturstudiet (se 2.1) er den første fasen den mest kritiske i biofilmutviklingen. I startfasen, når bakteriene interagerer med overflaten, kan cellene fjernes relativt lett (Chapman, 2015). Med utgangspunkt i denne teorien er det en mulighet for at en del av bakteriecellene kan ha blitt fjernet når tilførselen av mediet startet. I følge Chapman oppstår den stabile kontakten først når cellene begynner å produsere EPS (Chapman, 2015). Det er derfor en mulighet for at bakteriecellene ikke har rukket å produsere EPS før mediet begynte å dryppe over glassene. I følge Watnick og Kolter starter produksjonen av EPS når bakteriepopulasjonen har økt til et bestemt antall (Watnick and Kolter, 2000). Det kunne derfor vært hensiktsmessig å la glassene få ligge lengre enn 20 minutter etter inokulering. Bakterieprøven kunne også vært inkubert i buljongen en stund før forsøkets oppstart for å øke mengden bakterier fra forsøksstart.

Det er kjent at materialet som utgjør overflaten biofilmen vokser på påvirker biofilmdannelsen og hvordan bakteriene fester seg til overflaten (Srey et al., 2013). Glass er en foretrukket matkontaktflate i industrien på grunn av sin harde og glatte overflate som lett lar seg rengjøre (Dunsmore et al., 1981). Prøve S9B ble hentet fra en overflate av rustfritt stål,

og det kan derfor være at biofilmen hadde hatt lettere for å utvikle seg på en slik overflate som er ruere enn glass.

Målet med forsøket var å undersøke om bakterieprøver fra en representativ fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk danner biofilm under simulerte forhold på laboratorium. Det ble observert et slimlag på glassene fra dag 5 i reaktorforsøk 1 og 2. Med utgangspunkt i resultatene fra identifiseringen kan det konkluderes med at biofilm som mest sannsynlig besto av enten *Pseudomonas* spp. og/eller *Acinetobacter* spp. dannet biofilm under simulerte forhold på laboratorium.

5.3 Deteksjon av biofilm ved hjelp av UV-synlig spektroskopi

For å belyse delmål 3 (se 1.3) ble UV-synlig spektroskopi brukt for å detektere fluorescens i biofilm. Som nevnt i litteraturstudiet kan tryptofan brukes som en indikator på biofilmvekst, og er kjent for å utsende den mest intense fluorescensen i bakterier, ved maksimal fluorescens ved 350 nm ved 280 nm eksitasjon (se 2.7.3.1). Med bakgrunn i denne teorien ble en UV-LED lampe med bølgelengde på 280 nm benyttet ved eksitasjon av alle prøvene. Det er også kjent at tyrosin og fenylalanin kan eksitere og utsende fluorescens i nærliggende områder som tryptofan, men at fluorescens ved 280 nm eksitasjon hovedsakelig skyldes tryptofan (se 2.7.3.1). Det antas derfor at responsen fra biofilm detektert med UV-LED lampe på 280 nm hovedsakelig stammer fra tryptofan, men at responsen også kan skyldes utsendt fluorescens fra tyrosin og fenylalanin.

5.3.1 Deteksjon av tryptofan oppløst i vann

Responsen for tryptofan-fluorescens ble demonstrert ved å måle responsen til tryptofan oppløst i vann (1 g/ml) som var strøket ut på et mikroskopglass. Resultatene viste en respons i området mellom 310 og 350 nm, med høyeste respons i området rundt 330 nm. Resultatene ligger derfor noe lavere enn 350 nm, som er det bølgelengdeområdet tryptofan er kjent for å utsende sterkest fluorescens ved 280 nm eksitasjon (Angell et al., 1993, Ammor, 2007, Fischer et al., 2015, Fischer et al., 2012). Resultatene samsvarer likevel med resultatene til Hill et al., som fant at tryptofan oppløst i vann (1 g/ml) utsendte sterkest fluorescens i områdene mellom 330 og 350 nm ved 280 nm eksitasjon. Resultatene demonstrerer dermed at tryptofan-fluorescens kan detekteres ved hjelp av utstyret som ble brukt ved UV-synlig spektroskopi i denne oppgaven.

5.3.2 Deteksjon av biofilm ved dag 0, dag 5 og dag 13

Mikroskopglass med biofilm fra reaktorforsøket ble testet for respons ved dag 0, dag 5 og dag 13. Det ble brukt tre ulike glass med prøver, ett glass med inokulert bakteriesuspensjon ved dag 0 (første forsøksdag), og to glass med fremdyrket biofilm fra klimakammeret. Det ene prøveglasset ble hentet ut til deteksjon ved forsøksdag 5 og det andre ble hentet ut ved forsøksdag 13.

Resultatene for respons fra biofilm ved forsøksdag 0, 5 og 13 (figur 4.9) viste ingen økning i respons mellom 310 og 350 nm, og dermed ingen tegn til respons i det forventede området for tryptofan-fluorescens som ble demonstrert i 5.3.1 og figur 4.8. Graf 4.10 viste en antydning til økt respons rundt 325 nm for biofilm fra dag 13, men denne antydningen var svært liten. Den minimale responsen fra biofilm ved forsøksdag 0, 5 og 13 kan skyldes ulike årsaker. I følge Lakowicz og Hill et al. kan det forekomme endringer i emisjonsspekteret som følge av at fluorescensen fra tryptofan er svært sensitiv ovenfor sitt nærliggende miljø (Lakowicz, 2006a, Hill et al., 2009). Faktorer som kan spille inn er blant annet mengden intracellulært vann, pH, og væskeinnhold i prøven (Lakowicz, 2006a, Hill et al., 2009). Vekstmediet er også kjent for å kunne påvirke utsendelsen av fluorescens i bakterieprøver (Cheng et al., 1999, Hill et al., 1999, Pan et al., 1999). Siden fluorescensen ser ut til å være fraværende i alle prøvene kan det antas at dette skyldes at nærliggende molekyler kan ha slukket fluorescensen fra tryptofan (Lakowicz, 2006a). I følge Determann et al. og Fisher et. al korrelerer også styrken på fluorescens fra tryptofan med antall bakterieceller (Determann et al., 1998, Fischer et al., 2015), og det kan derfor ha vært for få bakterieceller til stede i prøvene. Det er også en mulighet for at utstyret som ble brukt hadde en begrenset følsomhet. Det er derfor mulig at et annet oppsett kunne oppfattet en respons, men denne responsen ville vært svært liten.

Kurvene i graf 4.9 som viser responsen ved dag 0, dag 5 og dag 13 viser en relativt lik fasong på kurvene, men ulike amplituder. Amplituden er høyest ved dag 0, og lavest ved dag 5. Ulikheter i amplitudene kan skyldes at noe av lyset er absorbert av bakteriene i prøvene. Prøve 0 har færrest bakterier på glasset og høyeste amplitude. Dette kan stemme med at få bakterier har absorbert lys fra UV-LED lampen, og at mye av lyset skyldes refleksjon fra glasset. Amplituden for responsen ved dag 5 er lavere enn for dag 0, noe som kan stemme dersom lysabsorpsjonen korrelerte med antall bakterieceller. Dette stemmer likevel ikke overens med amplituden ved dag 13, fordi denne er høyere enn amplituden for dag 5. Dersom absorpsjonen korrelerte med antall bakterier ville det vært logisk om amplituden for dag 13

var lavest, som følge av et høyere antall bakterieceller. En årsak til at amplituden for dag 13 var høyere enn amplituden ved dag 5 kan være at biofilmen ved dag 13 har utviklet ulike dispersjonsteknikker (se 2.1), og at bakterieceller derfor har løsnet fra biofilmen. Dette er likevel ikke sannsynlig, ut i fra figur 4.5 og 4.6 som tydelig viser at det er mer biofilm på glassene ved dag 13, sammenlignet med dag 5. En annen forklaring kan være at biofilmen har utviklet seg over lengre tid og dermed inneholder mer EPS (se 2.1). Det er mulig at bakteriene absorberer mindre lys som følge av at bakteriene er omfavnet av et tykkere lag av den beskyttende EPS-matriksen.

Det er likevel tydelig at prøvene med biofilm har lavere amplituder enn prøven fra dag 0, og at det er en variasjon mellom de ulike responsene. Dette ble bekreftet ved å utføre en variansanalyse som viste at det er en statistisk signifikant forskjell i responsen ved de ulike dagene (se 4.1.1). Dette kan tyde på en absorpsjon av lys når biofilm er tilstede. Resultatene kan derfor antyde at absorpsjon i biofilm kan gi en indikasjon på biofilmvekst ved deteksjon med UV-lys.

Det må likevel tilføyes at ulikheter i amplitudene også kan skyldes andre årsaker. Dette kan skyldes varierende mengde biofilm på punktene på glassene og noe refleksjon fra mikroskopglassene. Variasjoner i lysintensiteten fra LED-lampen kan også ha påvirket resultatene. Som nevnt tidligere kan eventuelle begrensninger i utstyrets følsomhet også hatt en innvirkning på målt respons. Det er derfor muligheter for at et annet oppsett kunne målt en respons i området for tryptofan-fluorescens, men denne ville uansett vært svært liten.

5.3.3 Deteksjon av biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet

Det ble observert vekst av biofilm på lokket i avfallsboksen i reaktorsystemet ved dag 13 i reaktorforsøk 2. Siden forsøksoppsettet var et lukket system er det rimelig å anta at bakteriene i avfallsboksen stammet fra avrenning fra bakteriene som ble inokulert på prøveglassene, og bakterier som har løsnet fra biofilmen etter hvert som den har vokst. Biofilmen på lokket i avfallsboksen var relativt tykk sammenlignet med biofilmen som ble fremdyrket i klimakammeret (se figur 4.7). Ut i fra den visuelle observasjonen ble det vurdert som sannsynlig at biofilmen inneholdt flere bakterieceller enn de andre prøvene. Ut i fra teorien om at styrken på tryptofan-fluorescensen korrelerer med antall bakterieceller (Determann et al., 1998, Fischer et al., 2015), ble det vurdert som interessant å undersøke responsen til

biofilmen fra avfallsboksen. Biofilm fra avfallsboksen ble derfor overført til et mikroskopglass slik at responsen kunne måles.

Resultatene for responsen fra biofilm fra avfallsboksen viste en respons i området mellom 300 og 340 nm, med høyeste respons i området rundt 320 nm (se figur 4.12). Dette tyder på en utsendelse av fluorescens i nærheten av områdene der tryptofan er kjent for å fluorescere, som demonstrert i 5.3.1. Responsen kan også skyldes tyrosin som er kjent for å utsende fluorescens i områder rundt 300 nm (Ammor, 2007).

Resultatene stemmer overens med resultatene til Hill et al. som viste at *Pseudomonas fluorescens* utsendte fluorescens i området rundt 330 nm ved 280 nm eksitasjon, med en tydelig økning i respons i områdene mellom 300 nm og 350 nm (Hill et al., 2009). Resultatene er spesielt sammenlignbare med utgangspunkt i at 2 av 9 isolater fra prøven som ble brukt i reaktorforsøket ble identifisert som *P. fluorescens* (se tabell 4.1). Resultatene kan også sammenlignes med funnene til Dalterio et al. som fant at *P. fluorescens* utsendte sterk fluorescens i området mellom 330-340 nm ved 290 nm eksitasjon og knyttet dette til fluorescens fra tryptofan i proteiner (Dalterio et al., 1986).

Determann et al. kom også frem til lignende resultater ved å undersøke emisjons- og eksitasjonsspekteret ved tryptofan-fluorescens i 22 ulike marine bakteriearter. Maksimal fluorescens ble målt ved 340 nm ved 280 nm eksitasjon (Determann et al., 1998). Resultatene samsvarer også delvis med resultatene til Angell et al. som detekterte tryptofan-fluorescens i biofilm av *Vibrio harveyi* på rustfrie stålkuponger, og målte utsendt fluorescens i området rundt 340 nm ved 290 nm eksitasjon (Angell et al., 1993).

Resultatene for deteksjonen av biofilm fra avfallsboksen viste at biofilmen utsendte fluorescens. Det er viktig å poengtere at denne biofilmen var veldig tykk og velutviklet. En deteksjon på et slikt utviklingsstadium hadde ikke vært hensiktsmessig i en industriell setting med tanke på det høye antallet bakterier. Biofilmen hadde også vært i kontakt med svært mye næring fra buljongen i avfallsboksen, og biofilmen er derfor ikke representativ for biofilm som vokser på overflater i produksjonen med minimalt med næring.

5.3.4 Samlet diskusjon for deteksjon av biofilm

Tryptofan oppløst i vann utsendte fluorescens, og demonstrerte derfor at det var mulig å detektere tryptofan-fluorescens med oppsettet som ble brukt i denne oppgaven. Biofilm dyrket i klimakammeret ga derimot ingen tydelige tegn til fluorescens, noe som kan skyldes at det var for få bakterieceller tilstede i prøvene. Kurvene for responsen ved dag 0, dag 5 og dag 13 var svært like og hadde en lik karakteristikk. Amplitudene var likevel forskjellige for de tre prøvene, noe som kan skyldes noe absorpsjon i prøvene. Variansanalysen bekreftet også at det var en statistisk signifikant forskjell i responsen ved forsøksdag 0, 5 og 13.

Resultatene som viste at biofilmen fra avfallsboksen ga respons, i motsetning til biofilmen dyrket i klimakammeret, kan ha en sammenheng med mengden bakterier som var tilstede. Figur 4.7 viser at biofilmen fra avfallsboksen var mye tykke og sannsynligvis besto av langt flere bakterier enn de andre prøvene. Dette kan stemme overens med teorien om at styrken på tryptofan-fluorescensen korrelerer med antall bakterieceller (Determann et al., 1998, Fischer et al., 2015).

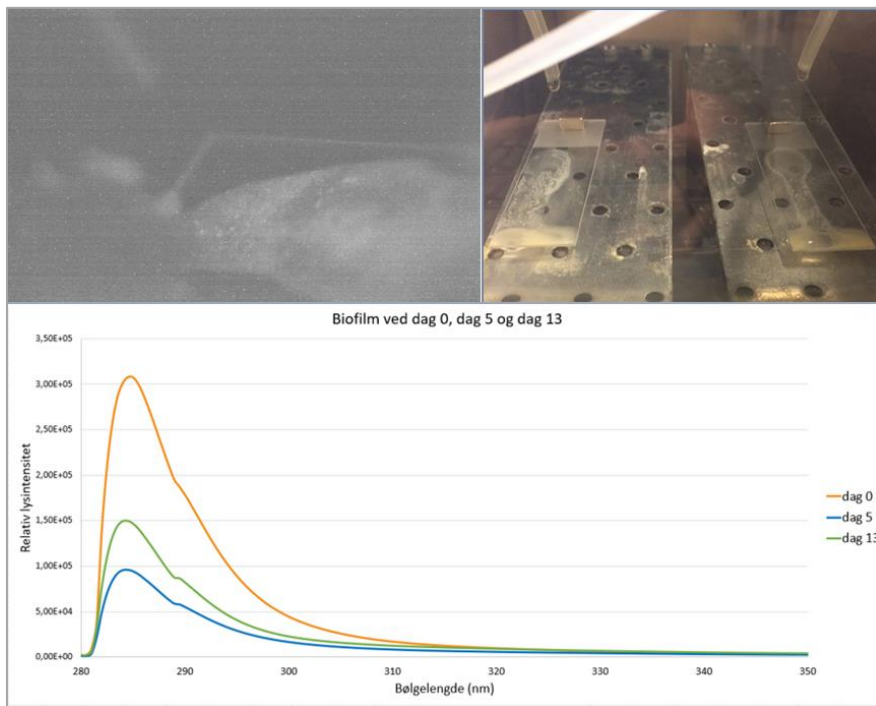
Ut ifra de samlede resultatene fra deteksjonen kan det vurderes som sannsynlig at det er en sammenheng mellom fluorescens-responsen og antall bakterieceller som er tilstede. Det kan også se ut til at antallet bakterieceller må være over et gitt nivå, og at biofilmen må være like godt utviklet som biofilmen fra avfallsboksen for å oppnå en deteksjon av fluorescensen. Biofilm på et slikt utviklingsstadium ville for lengst vært uakseptabelt i en industriell setting, og det vil derfor ikke være behov for deteksjon på et slikt utviklingsstadium. Hensikten med å benytte UV-lys til tidlig deteksjon av biofilm faller også bort. Det er likevel mulig at et annet utstyr kan gi en tidligere deteksjon, men ut ifra resultatene i denne oppgaven ansees det ikke som sannsynlig å kunne detektere biofilm ved hjelp av fluorescens og UV-lys.

5.4 Bildetaking av biofilm

For å belyse delmål 4 (se 1.3) ble biofilm avbildet ved dag 13 i reaktorforsøk 2. Det var ønskelig å undersøke om maskinsyn kunne benytte ved hjelp av et kamera og filter, i kombinasjon med digital bildebehandling for å detektere biofilm på overflate. Det ble tatt bilder av fremdyrket biofilm fra klimakammeret og biofilm fra avfallsboksen i reaktorsystemet. Det ble brukt et Point Grey Grasshopper3 kamera (Model GS3-U3-23S6M) med to ulike filter for å undersøke om fluorescens i biofilm kunne la seg avbilde. Valg av

kamera og annet utstyr ble basert på Sintef Oceans tidligere erfaringer med maskinsyn i ulike prosjekter.

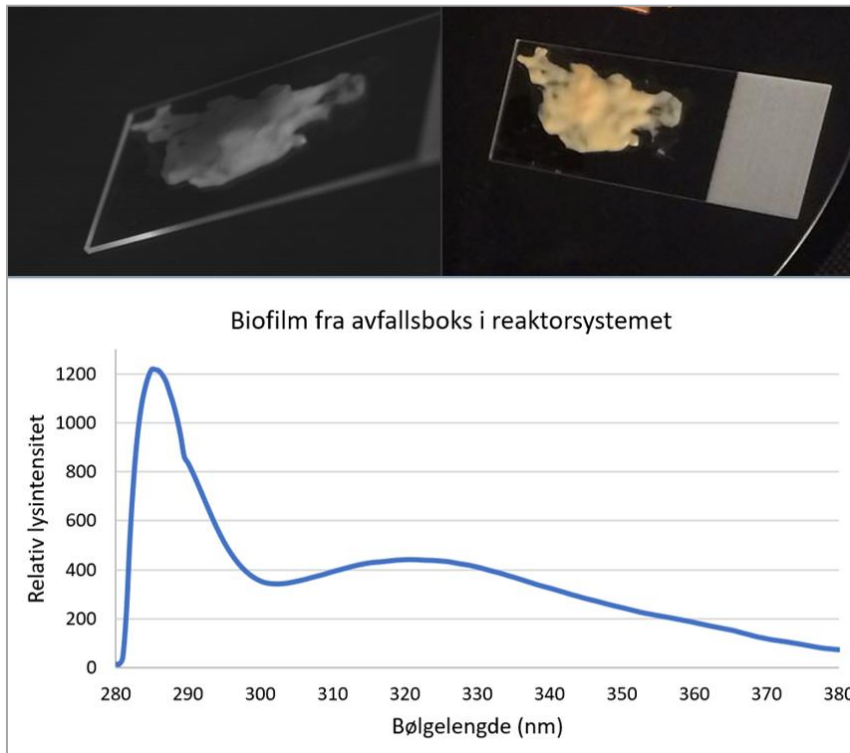
Ved avbildning av den fremdyrkede biofilmen fra klimakammeret ble det brukt et 330 nm filter. Dette filteret ble brukt for å stenge ute responsen fra lys med bølgelengder under 330 nm, og for å få en tydeligere respons av utsendt lys ved bølgelengder over 330 nm. Bildet øverst til venstre i figur 5.1 viser svært lite respons fra denne biofilmen. Det skyldes mest sannsynlig at denne biofilmen ikke viste tegn til respons ved 330 nm og utover ved deteksjon med UV-synlig spektroskopi (se nederste bilde i figur 5.1). Det er derfor ikke overraskende at responsen i dette tilfellet var minimal. Figur 5.1 viser at bildet som ble tatt ved bildetakingsforsøket ga så lite respons at et vanlig foto i synlig lys, vist øverst til høyre i figuren, gir et bedre bilde av biofilmen.



Figur 5.1 Oversikt over resultatene fra bildetakingen, reaktorforsøket og UV-synlig spektroskopi (grønn) for biofilm fremdyrket i klimakammeret ved forsøksdag 13

Det ble også tatt bilder av biofilmen fra avfallboksen for å se om denne ga en tydeligere respons, som følge av at biofilmen var tykkere. Biofilmen ble overført til et mikroskopglass før bildetakingen. Bildene av denne biofilmen ble tatt med et UG-1 filter egnet for bildetaking i områdene mellom 300 og 400 nm. Bildet øverst til venstre i figur 5.2 viser en svært svak respons for denne biofilmen. Responsen er likevel noe tydeligere enn responsen

fra biofilmen fra klimakammeret som er vist i figur 5.1. Dette skyldes mest sannsynlig at biofilmen fra avfallsboksen viste en respons i bølglengdeområdet mellom 300 og 340 nm ved deteksjon med UV-synlig spektroskopi (se nederste bilde i figur 5.2). Det var likevel forventet å få en bedre respons ved avbildningen, ut ifra resultatene fra UV-deteksjonen. I likhet med figur 5.1 viser figur 5.2 at bildet som ble tatt ved bildetakingsforsøket ga så lite respons at et vanlig foto i synlig lys, vist øverst til høyre i figuren, gir et bedre bilde av biofilmen.



Figur 5.2 Oversikt over resultatene fra bildetakingen, reaktorforsøket og UV-synlig spektroskopi for biofilm fremdyrket i avfallsboksen i reaktorsystemet

Det ble også forsøkt å avbilde biofilmene når 2 UV-led emittere var festet i boksen slik at de lyste på biofilmen. Emmitterne var koblet til en spenningskilde slik at lysstyrken kunne justeres ved bruk av samme bølglengde (280 nm). Dette ble gjort for å undersøke om responsen ble sterkere hvis styrken på lyset økte. Dette ga dessverre ikke noe bedre eller tydeligere respons. Den generelt beskjedne responsen ved avbildningen kan skyldes at linsen eller sensoren blokkerer noe av lyset.

Bildetaking i UV, spesielt ned under 350 nm, er utfordrende siden absorpsjonen i disse bølgelengdene er store i mange typer coating og materialer. Det var ønskelig å oppnå en viss respons som var nok til å overdøve støyen, men dette lot seg ikke gjøre. En årsak til dette kan være at beskyttelsesglasset som sitter foran kamera kan ha en viss absorpsjon av UV-lys, og at et annet kameraoppsett spesielt tiltenkt avbildning ved 300-350 nm kreves for avbildning ved disse bølgelengdene.

Ut ifra de samlede resultatene fra bildetakningen ser det ut til at responsen som ble oppnådd er for liten til at det er mulig å oppnå en hensiktsmessig deteksjon med maskinsyn til bruk i autonome vaskeroboter. Figur 5.1 og 5.2 viser at biofilm oppfattes like godt ved fotografering i synlig lys, og hensikten med å benytte UV-lys ved avbildning faller derfor bort. Det er mulig at et annet kameraoppsett kunne gitt en form for deteksjon, men responsen var i dette tilfellet så liten at det ikke kan vurderes som sannsynlig. Deteksjon med lav respons krever også et mørkt rom, noe som medfører praktiske utfordringer. Dette gjør at det gjennom arbeidet i denne oppgaven er vanskelig å se for seg at en deteksjon av fluorescens i biofilm med maskinsyn kan ha en praktisk betydning.

6. Konklusjon

Resultatene fra UV-synlig spektroskopi viste at det var mulig å detektere fluorescens i biofilm, men at biofilmen måtte være svært godt utviklet. En deteksjon av biofilm på et slikt utviklingsstadium vurderes ikke som hensiktsmessig i en industriell setting da antallet bakterieceller for lengst ville vært uakseptabelt. Resultatene viste at det var en statistisk signifikant forskjell i responsen fra biofilm ved forsøksdag 0, 5 og 13. Dette kan gi en indikasjon på at UV-synlig spektroskopi kan brukes for å detektere absorptans som en indikator på biofilmvekst. Resultatene fra bildetakingen viste at responsen som ble oppnådd er for liten til at det er mulig å oppnå en hensiktsmessig deteksjon med maskinsyn. Ut ifra de samlede resultatene kan det konkluderes med at representativ biofilm fra en fiskeforedlingsbedrift for salmonid fisk ikke kan detekteres ved hjelp av UV-synlig spektroskopi som kan være anvendbart i et autonomt vaskesystem basert på maskinsyn.

7. Videre arbeid

Et autonomt vaskesystem som kan detektere biofilm ved hjelp av maskinsyn vil kunne utgjøre en stor nytteverdi i fiskeforedlingsindustrien og annen næringsmiddelindustri. En del av arbeidet knyttet til denne masteroppgaven bør derfor videreføres, og ulike aspekter bør undersøkes nærmere.

Resultatene i denne oppgaven viste at biofilm utsendte minimalt med fluorescens ved 280 nm eksitasjon. Biofilmene som ble detektert besto av *Pseudomonas* spp. og/eller *Acinetobacter* spp. Det kunne vært hensiktsmessig å undersøke om andre arter kan utvise en bedre respons, siden innholdet av tryptofan varierer i ulike bakteriearter. Dette kan la seg gjennomføre ved å dyrke flere biofilmer, der hver biofilm dyrkes frem fra ett isolat. Deretter kan responsene fra de ulike artene testes og sammenlignes med UV-synlig spektroskopi. Hver art burde dyrkes i hvert sitt klimakammer for å unngå krysskontaminasjon via luft og aerosoler under forsøket. Dette krever en videreutvikling av reaktorsystemet, slik at biofilm fra ulike arter kan dyrkes separat i flere lukkede kamre samtidig. Ved deteksjon med UV-synlig spektroskopi kunne det også vært hensiktsmessig å undersøke om andre fluorescerende molekyler i bakterier kan avgi en tydeligere respons ved deteksjon med UV-lys, som for eksempel NADH og flaviner.

Bølgelengder som er kjent for å generere maksimal eksitasjon og fluorescens for de spesifikke molekylene burde benyttes. Resultatene fra UV-synlig spektroskopi viste også at det var en signifikant forskjell i responsen ved de ulike dagene. Det bør undersøkes nærmere om dette skyldes absorpsjon i biofilmen. Det kunne også vært interessant å undersøke om biofilm kan detekteres ved hjelp av absorpsjon ved bruk av UV-lys, og om deteksjon av absorpsjon kan benyttes i et autonomt vaskesystem basert på maskinsyn. Det kunne også vært hensiktsmessig å undersøke om biofilm kan la seg detektere på andre overflater som er relevant for næringsmiddelindustrien, som rustfritt stål og polyetylen.

Litteraturliste

- ABDEL-AZIZ, S. M., ASKER, M. M. S., KEERA, A. A. & MAHMOUD, M. G. 2016. Microbial Food Spoilage: Control Strategies for Shelf Life Extension. *In*: GARG, N., ABDEL-AZIZ, S. M. & AERON, A. (eds.) *Microbes in Food and Health*. Cham: Springer International Publishing.
- ADAL, K. A. & FARR, B. M. 1996. Central venous catheter-related infections: A review. *Nutrition*, 12, 208-213.
- AMMOR, M. S. 2007. Recent Advances in the Use of Intrinsic Fluorescence for Bacterial Identification and Characterization. *Journal of Fluorescence*, 17, 455-459.
- ANDERSON, R. J., BENDELL, D. J. & GROUNDWATER, P. W. 2004. 2.2 Selection Rules and the Beer-Lambert Law. *Organic Spectroscopic Analysis*. Royal Society of Chemistry.
- ANGELL, P., ARRAGE, A. A., MITTELMAN, M. W. & WHITE, D. C. 1993. On line, non-destructive biomass determination of bacterial biofilms by fluorometry. *Journal of Microbiological Methods*, 18, 317-327.
- ARCHIBALD, L. K. & GAYNES, R. P. 1997. HOSPITAL-ACQUIRED INFECTIONS IN THE UNITED STATES*
*All material in this article, with the exception of borrowed figures, tables, or text, is in the public domain.: The Importance of Interhospital Comparisons. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11, 245-255.
- AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., CERCA, N., COENYE, T., COSTA, A. R., DESVAUX, M., DI BONAVENTURA, G., HEBRAUD, M., JAGLIC, Z., KACANIOVA, M., KNOCHEL, S., LOURENCO, A., MERGULHAO, F., MEYER, R. L., NYCHAS, G., SIMOES, M., TRESSE, O. & STERNBERG, C. 2017. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*, 43, 313-351.
- BAGGE-RAVN, D., NG, Y., HJELM, M., CHRISTIANSEN, J. N., JOHANSEN, C. & GRAM, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 239-250.
- BEYERER, J., PUENTE LEÓN, F. & FRESE, C. 2016. Introduction. *In*: BEYERER, J., PUENTE LEÓN, F. & FRESE, C. (eds.) *Machine Vision: Automated Visual Inspection: Theory, Practice and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BIOLOG INC. 2011. BIOLOG Microbial identification Hayward, USA.
- BONDØ, M. S., MATHIASSEN, J. R., AABY VEBENSTAD, P., MISIMI, E., SKJØNDAL BAR, E. M., TOLDNES, B. & ØSTVIK, O. S. 2011. An automated salmonid slaughter line using machine vision. *Industrial Robot: the international journal of robotics research and application*, 38, 399-405.
- BORENSTEIN, S. 1994. *Microbiologically influenced corrosion handbook*, Elsevier.
- BOTT, T. R. 2011a. Biofilms in Industry. *Industrial Biofouling*.

- BOTT, T. R. 2011b. Industrial Biofouling. *Industrial Biofouling*.
- BRIGHTWELL, G., BOEREMA, J., MILLS, J., MOWAT, E. & PULFORD, D. 2006. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 47-53.
- BRUNDTLAND, G. H. 1987. *Report of the World Commission on environment and development: "our common future."*, United Nations.
- BURMØLLE, M., WEBB, J. S., RAO, D., HANSEN, L. H., SØRENSEN, S. J. & KJELLEBERG, S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3916-3923.
- BURNE, R. A. & MARQUIS, R. E. 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiology Letters*, 193, 1-6.
- CHAPMAN, J. 2015. Microstructures of Biofilm. In: KANEMATSU, H. & BARRY, D. M. (eds.) *Biofilm and Materials Science*. Cham: Springer International Publishing.
- CHEN, Z., DEUTSCH, T. G., DINH, H. N., DOMEN, K., EMERY, K., FORMAN, A. J., GAILLARD, N., GARLAND, R., HESKE, C., JARAMILLO, T. F., KLEIMAN-SHWARSSTEIN, A., MILLER, E., TAKANABE, K. & TURNER, J. 2013. UV-Vis Spectroscopy. In: CHEN, Z., DINH, H. N. & MILLER, E. (eds.) *Photoelectrochemical Water Splitting: Standards, Experimental Methods, and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- CHENG, Y., BARR, E., FAN, B., HARGIS, P., RADER, D., HERN, T., TORCZYNSKI, JR., TISONE, G., PREPPERNAU, B., YOUNG, S. A. & RADLOFF, R. 1999. Detection of bioaerosols using multiwavelength UV fluorescence spectroscopy. *Aerosol Sci. Technol.*, 30, 186-201.
- COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G. & CHENG, K. J. 1978. How bacteria stick. *Sci Am*, 238, 86-95.
- COWAN, S. E., GILBERT, E., LIEPMANN, D. & KEASLING, J. D. 2000. Commensal Interactions in a Dual-Species Biofilm Exposed to Mixed Organic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4481.
- DALTERIO, R. A., NELSON, W. H., BRITT, D., SPERRY, J., PSARAS, D., TANGUAY, J. F. & SUIB, S. L. 1986. Steady-State and Decay Characteristics of Protein Tryptophan Fluorescence from Bacteria. *Applied Spectroscopy*, 40, 86-90.
- DALTON, H. M. & MARCH, P. E. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 252-255.
- DETERMANN, S., LOBBES, J. M., REUTER, R. & RULLKÖTTER, J. 1998. Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Marine Chemistry*, 62, 137-156.

- DICKINSON, G. M. & BISNO, A. L. 1993. Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int J Artif Organs*, 16, 749-54.
- DIGRE, H., BAR, E. M. S., MATHIASSEN, J. R. B., STANDAL, D., GRIMSMO, L., HENRIKSEN, K., ROMSDAL, A. & ASCHE, F. 2014. Lønnsom foredling av sjømat i Norge.
- DOUGHARI, H. J., NDAKIDEMI, P. A., HUMAN, I. S. & BENADE, S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and environments*, 26, 101-112.
- DRENKARD, E. & AUSUBEL, F. M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416, 740-743.
- DUNSMORE, D., TWOMEY, A., WHITTLESTONE, W. & MORGAN, H. 1981. Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review. *Journal of Food Protection*, 44, 220-240.
- ERB, R. W., EICHNER, C. A., WAGNER-DOBLER, I. & TIMMIS, K. N. 1997. Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed *pseudomonad*. *Nat Biotechnol*, 15, 378-82.
- EVANDRO LEITE DE, S., QUÊNIA GRAMILE SILVA, M., ISABELLA DE MEDEIROS, B., ANA JÚLIA ALVES AGUIAR, A., MARIA LÚCIA DA, C. & JOSÉ PINTO DE SIQUEIRA, J. 2014. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 67-75.
- FAILLE, C. & CARPENTIER, B. 2009. 11 - Food contact surfaces, surface soiling and biofilm formation. *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing.
- FAO 2011. "Energy-smart" food for people and climate : issue paper. Roma: FAO.
- FILOCHE, S. K., ANDERSON, S. A. & SISSONS, C. H. 2004. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology*, 19, 322-326.
- FISCHER, M., TRIGGS, G. J. & KRAUSS, T. F. 2015. Optical Sensing of Microbial Life on Surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 82, 1362-71.
- FISCHER, M., WAHL, M. & FRIEDRICH, G. 2012. Design and field application of a UV-LED based optical fiber biofilm sensor. *Biosensors & bioelectronics*, 33, 172.
- FISCHER, M. F., G ; LACHNIT, T; 2014. Fluorescence-Based Quasicontinuous and In Situ Monitoring of Biofilm Formation Dynamics in Natural Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 3721.
- FISCHER, M. T., G ; KRAUSS, T; 2016. Optical Sensing of Microbial Life on Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 1362.
- FLANDERS, J. R. & YILDIZ, F. H. 2004. Biofilms as reservoirs for disease. *Microbial biofilms*. American Society of Microbiology.

- FLEMMING, H.-C. 2003. Role and levels of real-time monitoring for successful anti-fouling strategies - an overview. *Water Science and Technology*, 47, 1-8.
- FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- FUKUZAKI, S. 2015. Hygiene Problems and Food Industry. *Biofilm and Materials Science*.
- GERSTMAYR-HILLEN, L., RÖBEN, F., KRZYKAWSKI, M., KREFT, S., VENJAKOB, D. & MÖLLER, R. 2013. Dense topological maps and partial pose estimation for visual control of an autonomous cleaning robot. *Robotics and Autonomous Systems*, 61, 497-516.
- GHIGO, J. M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412, 442.
- GIBSON, H., TAYLOR, J. H., HALL, K. E. & HOLAH, J. T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 41-48.
- GOERES, D. M., HAMILTON, M. A., BECK, N. A., BUCKINGHAM-MEYER, K., HILYARD, J. D., LOETTERLE, L. R., LORENZ, L. A., WALKER, D. K. & STEWART, P. S. 2009. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocols*, 4, 783-788.
- GRAM, L. & HUSS, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.
- GUOBUJERNSDOTTIR, B., EINARSSON, H. & THORKESSON, G. 2005. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 55-61.
- HEIR, E., MØRETRØ, T., SIMENSEN, A. & LANGSRUD, S. 2018. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 46-55.
- HEYDORN, A., NIELSEN, A. T., HENTZER, M., STERNBERG, C., GIVSKOV, M., ERSBOLL, B. K. & MOLIN, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146, 2395-2407.
- HILL, S. C., MAYO, M. W. & CHANG, R. K. 2009. Fluorescence of bacteria, pollens, and naturally occurring airborne particles: excitation/emission spectra. ARMY RESEARCH LAB ADELPHI MD COMPUTATIONAL AND INFORMATION SCIENCES DIRECTORATE.

- HILL, S. C., PINNICK, R. G., NILES, S., PAN, Y. L., HOLLER, S., CHANG, R. K., BOTTIGER, J., CHEN, B. T., ORR, C. S. & FEATHER, G. 1999. Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles. *Field Analytical Chemistry & Technology*, 3, 221-239.
- HOLAH, J. 1992. Industrial monitoring: hygiene in food processing. *Biofilms—Science and Technology*. Springer.
- HOVDA, M. B., LUNESTAD, B. T., FONTANILLAS, R. & ROSNES, J. T. 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272, 581-588.
- HULTMAN, J., RAHKILA, R., ALI, J., ROUSU, J. & BJÖRKROTH, K. J. 2015. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7088-7097.
- J W COSTERTON, Z LEWANDOWSKI, D E CALDWELL, D R KORBER, A. & LAPPIN-SCOTT, H. M. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.
- JEAN-MARC, G. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412, 442.
- KANEMATSU, H. & BARRY, D. M. 2015. Introduction. *Biofilm and Materials Science*.
- KANG, Y. J. & FRANK, J. F. 1990. Characteristics of Biological Aerosols in Dairy Processing Plants. *Journal of Dairy Science*, 73, 621-626.
- KLINGLER, J. M., STOWE, R. P., OBENHUBER, D. C., GROVES, T. O., MISHRA, S. K. & PIERSON, D. L. 1992. Evaluation of the biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2089-2092.
- KUMAR, C. G. & ANAND, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27.
- LAKOWICZ, J. R. 2006a. Fluorophores. In: LAKOWICZ, J. R. (ed.) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US.
- LAKOWICZ, J. R. 2006b. Introduction to Fluorescence. In: LAKOWICZ, J. R. (ed.) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US.
- LANGSRUD, S., MOEN, B., MØRETRØ, T., LØYPE, M. & HEIR, E. 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 366-378.
- LEE, K. W. K., PERIASAMY, S., MUKHERJEE, M., XIE, C., KJELLEBERG, S. & RICE, S. A. 2014. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME Journal*, 8, 894-907.

- LERICHE, V., BRIANDET, R. & CARPENTIER, B. 2003. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology*, 5, 64-71.
- LØVDAL, T., GISKE, L. A. L., BJØRLYKHAUG, E., ERI, I. B. & MORK, O. J. 2017. Hygienic standards and practices in Norwegian salmon Processing plants.
- MARGAS, E. & HOLAH, J. T. 2013. Personal hygiene in the food industry. *Hygiene in Food Processing: Principles and Practice: Second Edition*.
- MATZ, C. 2011. Competition, Communication, Cooperation: Molecular Crosstalk in Multi-species Biofilms. In: FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J. & SZEWZYK, U. (eds.) *Biofilm Highlights*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- METTLER, E. & CARPENTIER, B. 1998. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection*, 61, 57-65.
- MIDELET, G. & CARPENTIER, B. 2004. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 262-270.
- MILLER, M. B. & BASSLER, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*.
- MOORE, E. R. B., TINDALL, B. J., MARTINS DOS SANTOS, V. A. P., PIEPER, D. H., RAMOS, J.-L. & PALLERONI, N. J. 2006. Nonmedical: Pseudomonas. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. (eds.) *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. New York, NY: Springer New York.
- MØRETRØ, T., LANGSRUD, S. & HEIR, E. 2013. Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora. *Adv Microbiol*, 3, 255-264.
- MØRETRØ, T., MOEN, B., HEIR, E., HANSEN, A. Å. & LANGSRUD, S. 2016. Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 98-108.
- NORGES FORSKNINGSRÅD 2008. Trygg sjømat-risikofaktorer i verdikjeden fra fjord til bord for villfanget og oppdrettet sjømat. Oslo: Norges Forskningsråd.
- NORGES SJØMATRÅD. 2017. *Nøkkeltall* [Online]. Norges sjømatråd: Norges sjømatråd. Available: <https://seafood.no/markedsinnsikt/nokkeltall/> [Accessed].
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*.

- O'TOOLE, G. A. & KOLTER, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28, 449-461.
- OECD 2003. *Foodborne disease in OECD countries: Present state and economic costs*, Organisation for Economic Co-operation and Development, and World Health Organization.
- PALMER, R. J., JR., GORDON, S. M., CISAR, J. O. & KOLENBRANDER, P. E. 2003. Coaggregation-Mediated Interactions of Streptococci and Actinomyces Detected in Initial Human Dental Plaque. *The Journal of Bacteriology*, 185, 3400.
- PALMER, R. J., JR., KAZMERZAK, K., HANSEN, M. C. & KOLENBRANDER, P. E. 2001. Mutualism versus Independence: Strategies of Mixed-Species Oral Biofilms In Vitro Using Saliva as the Sole Nutrient Source. *Infection and Immunity*, 69, 5794.
- PAN, Y.-L., HOLLER, S., CHANG, R. K., HILL, S. C., PINNICK, R. G., NILES, S. & BOTTIGER, J. R. 1999. Single-shot fluorescence spectra of individual micrometer-sized bioaerosols illuminated by a 351- or a 266-nm ultraviolet laser. *Optics Letters*, 24, 116-118.
- PASTER BRUCE, J., OLSEN, I., AAS JØRN, A. & DEWHIRST FLOYD, E. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42, 80-87.
- RAO, D., WEBB, J. S. & KJELLEBERG, S. 2005. Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1729.
- RICHARDSEN, R. & BULL-BERG, H. 2016. Nasjonal betydning av sjømatnæringen. En verdiskapingsanalyse med data fra 2014. *SINTEF Fiskeri og havbruk AS*.
- RICKARD, A. H., GILBERT, P., HIGH, N. J., KOLENBRANDER, P. E. & HANDLEY, P. S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11, 94-100.
- RINGØ, E., STRØM, E. & TABACHEK, J. A. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26, 773-789.
- RØDER, H. L., SØRENSEN, S. J. & BURMØLLE, M. 2016. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends in Microbiology*, 24, 503-513.
- SHARMA, A., INAGAKI, S., SIGURDSON, W. & KURAMITSU, H. K. 2005. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiology and Immunology*, 20, 39-42.
- SHI, X. & ZHU, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 407-413.

- SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., MACHADO, I., PEREIRA, M. O. & VIEIRA, M. J. 2006. Control of flow-generated biofilms with surfactants: Evidence of resistance and recovery. *Food and Bioprocess Processing*, 84, 338-345.
- SIMÕES, M., SIMÕES, L. C. & VIEIRA, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 573-583.
- SISSONS, C. H. 1997. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*, 11, 110-26.
- SREY, S., JAHID, I. K. & HA, S. D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- SSB. 2017. *Akvakultur* [Online]. Statistisk sentralbyrå: Statistisk sentralbyrå. Available: <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett> [Accessed 11.04 2018].
- STELLATO, G., DE FILIPPIS, F., LA STORIA, A. & ERCOLINI, D. 2015. Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7893-7904.
- STRATHMANN, M., MITTENZWEY, K. H., SINN, G., PAPADAKIS, W. & FLEMMING, H. C. 2013. Simultaneous monitoring of biofilm growth, microbial activity, and inorganic deposits on surfaces with an in situ, online, real-time, non-destructive, optical sensor. *Biofouling*, 29, 573-83.
- SUSLOW, T. V. 2001. Water disinfection: a practical approach to calculating dose values for preharvest and postharvest applications.
- TAIT, K. & SUTHERLAND, I. W. 2002. Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *Journal of applied microbiology*, 93, 345.
- TUZIMSKI, T. 2015. Chapter 9 - Advanced Spectroscopic Detectors for Identification and Quantification: UV-Visible, Fluorescence, and Infrared Spectroscopy A2 - Poole, Colin F. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. Boston: Elsevier.
- WALKER, J. T., SURMAN, S. & JASS, J. 2000. *Industrial biofouling : detection, prevention and control*, Chichester, Wiley.
- WATNICK, P. & KOLTER, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 2675-2679.
- WHITTAKER, D. 2000. 4. Ultraviolet Spectroscopy. *Interpreting Organic Spectra*. Royal Society of Chemistry.
- WHO 2013. Advancing food safety initiatives: strategic plan for food safety including foodborne zoonoses 2013-2022. World Health Organization.
- WHO 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization.
- WILSON, D. I. & CHEW, J. 2015. Green cleaning.

YAMADA, M., IKEGAMI, A. & KURAMITSU, H. K. 2005. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 250, 271-277.