

10002

10016

# Analyse av påvirkningsgraden ulike konsentrasjoner av kobberoksidnanopartikler har på mikrobiell vekst i marine miljø ved 16S rRNA amplifisering og neste generasjons sekvensering

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2022



10002

10016

# **Analyse av påvirkningsgraden ulike konsentrasjoner av kobberoksidnanopartikler har på mikrobiell vekst i marine miljø ved 16S rRNA amplifisering og neste generasjons sekvensering**

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Kjære leser,

Vi som har skrevet denne bacheloroppgaven er to bioteknologistudenter ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet (NTNU) i Ålesund. Arbeidet med dette bachelorprosjektet har ført med seg en ny og annerledes måte å jobbe på for oss. Det har vært lærerikt å få jobbe praktisk og selvstendig med en laboratoriedel som strakk seg over 10 uker. Det har vært et spennende og interessant prosjekt. Det har også vært en øyeåpnende opplevelse å se hvor mye arbeid som går inn i et forskningsprosjekt.

Samtidig vil vi gjerne takke alle som har vært så vennlige og tålmodige til å svare på alle våre spørsmål og åpne låste dører for oss. Spesielt vil vi takke veilederen vår Ann-Kristin Tveten for god praktisk og teoretisk veiledning gjennom hele bachelorprosjektet. Takk også til alle som har korrektur lest oppgaven, familie og venner for støtte.

## Sammendrag

Mikrobiell vekst i form av biofilm og biofouling er problem i forbindelse med menneskeskapte strukturer i marine miljøer. Det er derfor av stor interesse å finne gode løsninger for å hemme disse prosessene. Samtidig som biodiversitet og miljø ivaretas.

Kobber er et essensielt metall i biokjemiske prosesser hos mange organismer, men kan også virke toksisk i store mengder, spesielt hos mikroorganismer. Dette gjør at kobber har vært svært attraktivt for å hemme mikrobiell vekst. Dette er problematisk da bruken av kobber har hatt utilsiktede påvirkninger i miljøet rundt strukturene og har blant annet før forskyvninger i biodiversitet i marine mikrobielle økosystemer.

I dette prosjektet ble kobber i formen kobberoksid nanopartikler (CuO-NPs) tilsatt fiskenøter, i konsentrasjonene 0,010 mol/L og 0,005 mol/L. Dette for å studere den antimikrobielle effekten ulike konsentrasjoner av CuO-NPs har på biofilm. Det ble brukt bioreaktorer for de ulike konsentrasjonene av CuO-NPs, samt en referanse. I løpet av en vekstperiode ble det tatt ut prøver av biofilter, swab-prøver direkte fra not og notprøver. Disse ble amplifisert ved 16S rRNA og sekvensert med neste generasjons sekvensering (NGS). Alfadiversitet, betadiversitet og komposisjon for de ulike prøvene ble framstilt i Shannon diversitetsindeks, Bray-Curtis PCoA plot og diagram for relative abundance. Observasjoner gjort under vekstfasen og resultatene oppnådd ga en sterk indikasjon på at fiskenot med høy konsentrasjon hadde en stor påvirkning på den mikrobielle veksten i bioreaktoren denne var plassert i. Fiskenoten med den lavere konsentrasjonen av CuO-NPs hadde en betydelig mindre grad av påvirkning på den mikrobielle veksten i bioreaktoren.

## Abstract

Microbial growth such as biofilm and biofouling can cause several different issues on man-made structures in marine environments. Finding solutions that will prevent the damages from these processes, while simultaneously preserves both the environment and biodiversity is highly coveted.

Copper is an essential metal in biochemical processes within many organisms, but can also be toxic in large amounts, especially to microorganisms. Because of this toxicity, copper has been much used as an antimicrobial agent. The unintended effects copper has had on the environment surrounding the man-made structures has led to problems such as shifts in the biodiversity in marine microbial ecosystems.

In this project the focus was on copper oxide nanoparticles (CuO-NPs). 0,010 mol/L and 0,005 mol/L of the CuO-NPs had been applied to fish nets. The different effects concentrations of CuO-NPs had on microbial growth were to be studied, to determine which of these would have the most desired antimicrobial effect. For the setup, bioreactors were used for the in vitro studies. One for each CuO-NPs concentration, as well as one for a reference with no addition of CuO-NPs. During the growth phase samples were taken using swab and the collection of biofilters and net samples. Later the samples were sequenced using 16S rRNA and next generation sequencing (NGS). From the results Shannon diversity index, Bray – Curtis PCoA plot and relative abundance diagram were produced to study alfa diversity, beta diversity and the microbial composition of the biofilm samples. The results from the samples, as well as observations made during the growth phase indicated a high level of impact on growth by the higher CuO-NPs concentration. Whereas the lower concentration did not have such a high degree of impact on the microbes in the bioreactor.

# Innholdsfortegnelse

|  |     |
|--|-----|
| Forord.....  | i   |
| Sammendrag .....   | ii  |
| Abstract.....  | iii |
| Ordliste.....  | 1   |
| 1.0 Innledning .....                                       | 2   |
| 2.1 Biofilm og marin biofouling .....                      | 3   |
| 2.2 Veksthemmende behandlinger.....                        | 6   |
| 2.3 Kobbertoksisitet .....                                 | 7   |
| 2.4 Analyse av biofilm med 16S rRNA .....                  | 11  |
| 2.5 Statistiske analyser.....                              | 12  |
| 2.5.1 Alfadiversitet og Shannon diversitetsindeks.....     | 12  |
| 2.5.2 Betadiversitet og Bray-Curtis diversitetsindeks..... | 13  |
| 3.0 Materialer og metode .....                             | 14  |
| 3.1 Vekstforsøk.....                                       | 14  |
| 3.2 Bearbeiding av prøvemateriale .....                    | 17  |
| 3.2.1 DNA isolering.....                                   | 17  |
| 3.2.2 16S rRNA amplifisering .....                         | 18  |
| 3.2.3 Bibliotekstillaging.....                             | 18  |
| 3.3 NGS.....   | 19  |
| 3.4 Bioinformatikk flyt .....                              | 19  |
| 4.0 Resultat .....   | 20  |
| 4.1 Vekstforsøk.....                                       | 20  |
| 4.2 Shannon diversitetsindeks.....                         | 21  |
| 4.3 Relative abundance .....                               | 22  |
| 4.4 Bray-Curtis.....                                       | 23  |
| 5.0 Diskusjon .....  | 25  |
| 6.0 Konklusjon.....  | 30  |
| Litteraturliste.....                                       | 31  |
| Vedlegg.....   | 36  |



## Ordliste

4150 – Fiskerot dekket med høy konsentrasjon av CuO-NPs

4152 – Fiskerot dekket med lav konsentrasjon av CuO-NPs

Biotilgjengelighet – Mål på tilgjengeligheten en forbindelse har for opptak i organisme eller i reaksjon med organismen, begrep brukt i økologien.

CuO – Kobberoksid

CuO-NPs – Kobberoksid nanopartikler

Cu(Ac)<sub>2</sub> – Kobberacetat

Cop operon – Protein som regulerer ut pumping av kobber

Epibiosis – Symbiotisk forhold hvor en organisme vokser på den andre uten å være parasittisk

Eveness – Økologi begrep for mål på fordelingen av alle individer på de ulike artene i en prøve  
*in vitro* – Undersøkelser av organismer på laboratoriet

Kobber speciation – Begrep på kobber sin reaksjon med forbindelser som finnes i miljøet der kobber er.

Metallothionein – Stressindusert protein

NGS – Neste generasjons sekvensering

Omp b – Membran protein som sitter på yttermembranen

PCR – Polymerase chain reaction

Rarefaction – Teknikk som brukes til å bestemme richness i prøver.

Relative abundance – Prosentvis fordeling av individ mellom ulike arter i en prøve.

Richness – Økologi begrep for mål på antall arter i en prøve.

Tiol – Forbindelser som inneholder et svovel- og hydrogen-atom.

Noen engelske begreper ble brukt innenfor økologi og statistikk for å beholde den faglige korrektheten.

## 1.0 Innledning

Hav dekker over 70 prosent av overflaten på jorda, hvor det meste av dette er fremdeles ukjente områder for mennesker. Store deler av biodiversiteten som finnes i marine miljø, er viktig for å opprettholde økosystemene (1). Vi vet per i dag ikke nok om diversiteten i havet. All menneskelig aktivitet har en påvirkning på biodiversiteten, med en økende grad etter hvert som folkeantallet i verden stiger. Befolkningsvekst skaper et press på å finne løsninger på problemer, og øke matsikkerheten. Dette kan skape forskyvninger i den naturlige biodiversiteten i områder med økt menneskeskapt infrastruktur, slik som oppdrettsanlegg.

I akvatiske miljø vil det naturlig dannes komplekse biofilm samfunn av mikroorganismer på overflater som er tilgjengelig for vekst, disse består av en rekke ulike mikrobielle arter. Den mikrobielle veksten blir som regel diktert av hvilke vekstfaktorer som er tilgjengelig i området denne spesifikke biofilmen befinner seg i. Sammensetningene av mikroorganismene i slike biofilmer er preget av både konkurranse og samarbeid, hvor avfallet fra en organisme er næringen hos andre organismer innad i biofilmen (2). Biofilmdannelse på strukturer er et viktig ledd i økologien fordi det danner grunnlaget for at organismer som makroalger, tubeormer og skjell kan vokse (3).

For mange menneskeskapt infrastruktur i marine miljøer, inkludert oppdrettsanlegg, er dannelsen av biofilm og den påfølgende veksten av mikro- og makroorganismer et stort problem. Veksten kan påvirke både integriteten til strukturer og fiskens helse (4, 5). Tradisjonelle metoder for antimikrobielle belegg bruker store mengder av virkestoffet kobber for å oppnå en god effektivitet (6). Dette kan gi uønsket påvirkning på det naturlige miljøet rundt infrastrukturen. Det er derfor nødvendig å finne nye metoder for å hemme den mikrobielle veksten (4).

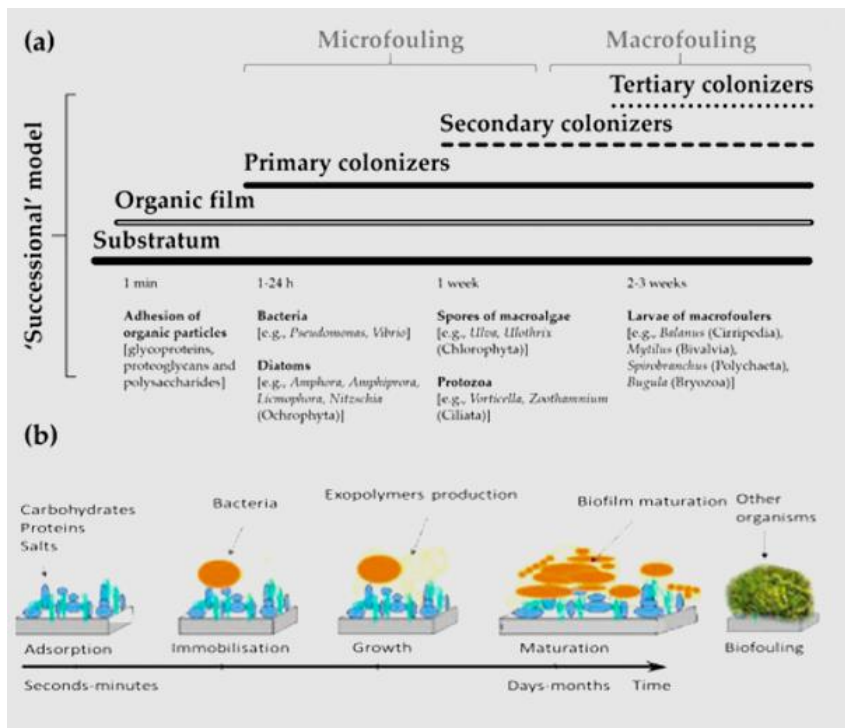
I denne bacheloroppgaven er det studert hvordan biofilm utvikler seg på fiskenot dekket av ulike konsentrasjoner av kobberoksidnanopartikler (CuO-NPs). Dette blir undersøkt ved vekstforsøk hvor biofilm blir dyrket frem i bioreaktor med fiskenot tilsatt antimikrobielt dekke av kobberacetat ( $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ ) konsentrasjon på 0,010 mol/L og 0,005 mol/L. Komposisjon og biodiversitet ble undersøkt ved å bruke neste generasjons sekvensering (NGS) i kombinasjon med 16S rRNA metagenomikk.

## 2.0 Teori

### 2.1 Biofilm og marin biofouling

Biofilm vil kunne formes på omtrent alle overflater i flere ulike miljøer, og vil også bidra til økosystemene i disse miljøene på ulike måter. I områder som sjøer vil biofilm kunne danne en matriks som ikke bare gjennomgår og omslutter selve biofilmen, men også bidrar til å stabilisere sedimentene som utgjør sjøbunnen. Overflaten biofilmen vokser på har i stor grad påvirkning på strukturen, komposisjonen og funksjonen til biofilmen, i tillegg vil det også kunne føre til at det er distinkte forskjeller mellom ulike biofilmer innad i samme område og miljø (1).

«Marin biofouling» kan defineres som «uønsket akkumulering av mikroorganismer, alger og dyr på menneskeskapte strukturer som er nedsenket i sjøvann» (6). Biofouling kan grovt inndeles i organisk film, etterfulgt av mikrofouling og makrofouling (6, 7). I begrepet mikrofouling inngår bakterielle- og mikroalgebiofilmer, i tillegg til protozoa og fungi (3, 6, 8). Dette dekker i hovedsak det som kan betegnes som de primære koloniserende organismene som okkuperer overflaten (7). Makrofouling består av de sekundære og tertiære koloniserende organismene, og inkluderer organismer som makroalger, tubeormer, ulike typer skalldyr som blåskjell, krepsdyr av typen rankeføtter (*Cirripedia*) og ulike arter innenfor *Balanus* genuset. Andre typiske makrofouling organismer er de ulike larvestadiene til flere av disse (3, 8). Selv om biofouling er ansett som et uønsket og ødeleggende element for menneskeskapte strukturer, vil prosessen også finne sted på naturlige overflater i marine miljøer, inkludert på andre organismer i form av «*epibiosis*» (6).



Figur 1a) Oversikt over biofouling-prosessen fra et materiale blir senket ned i et marint miljø. Her er også eksempler på ulike organiske stoffer og organismer som bidrar i både biofilmen og i biofouling. Det er også en oversikt over noen av de ulike organismene som inngår i mikro- og makrofouling. Samt gir en tidslinje for biofouling-prosessen. b) Illustrerer en enkel modell over de ulike stadiene av biofilmdannelsen. Fra organisk film til en moden biofilm, hvor det er anlegg til videre mikrobiell vekst og videre prosesser innen biofouling. Denne figuren er laget basert på figur fra kilde (7) og (9).

Marin biofouling oppstår som et naturlig resultat som følge av biofilmdannelsen på overflater i havet. Figur 1a gir en oversikt over tidslinjene for marin biofouling, samt de typiske artene som inngår i både mikro- og makrofouling. Figur 1b viser en enkel modell for prosessen av biofilmdannelse fra en overflate senkes ned i sjøvannet. Det tar bare mellom minutter til timer etter en overflate er nedsenket i vann, før overflaten vil ha begynt å tiltrekke seg en biokjemisk film. Den biokjemiske filmen består av ulike oppløste organiske materialer som polysakkarider og glykoproteiner fra vannet rundt (7). Filmen av organiske materialer gir grunnlag for feste til pionerorganismene som danner den begynnende biofilmen. Pionerorganismene, som består i stor grad av bakterier og mikroalger, har evnen til å produsere og sekresere ut en beskyttende film av ekstracellulære polymeriske substanser (EPS) (2, 7). EPS omslutter både organismene i biofilmen, som et beskyttende lag, i tillegg limer det biofilmen til overflaten (2). Mikrofouling

organismene og EPS som utgjør biofilmen, gir de sekundære koloniserende organismene grunnlag til å feste seg. Disse organismene består av både «myke» og «harde» makrofouling organismer. Larveformen til ulike skalldyr og fastsittende krepsdyr (rankefötter), samt sporer fra makroalger vil begynne å feste seg til biofilmen og vil etter hvert som de vokser danne mikrohabitater på hele overflaten. Bare uker etter overflaten er plassert i vannet vil det ha nådd et punkt hvor det er overgrodd av ulike organismer, samt er preget av en rik biodiversitet (7).

Naturlige marine biofilmer vil ha en bred taksonomisk og funksjonell diversitet, med tilstedeværelse av arter fra archaea, protozoa, virus, alger og bakterier. Etter hvert som biofilmen modnes vil den tredimensjonale strukturen føre til at det blir en utvidet biodiversitet. Dette som følge av at det blir en økning i både tilgjengelige ressurser og større diversitet i habitatet innad i biofilmen (10). Diversiteten i biofilm og marin biofouling avhenger av både biotiske og abiotiske faktorer i samspill med geografisk område og sesong. Komposisjonen og fargen på overflaten har også en innvirkning på både vekst og diversiteten i biofouling samfunnet (1, 2, 7). De biotiske forholdene som påvirker komposisjonen og diversiteten i biofilm og biofoulingen er gjerne basert på evnen organismene har til å feste seg til materialet, samt interaksjonene mellom de ulike organismene. I biofilmer hvor de ulike artene har en god kompatibilitet er det større sjanse for suksess, både i form av deling av næring og beskyttelse mot predasjon (7, 11). Blant de abiotiske faktorene er det en rekke både kjemiske og fysiske komponenter ved sjøvannet som spiller inn, inkludert pH, temperatur, hvilke oppløste organiske materialer som er til stede og mengden av oppløst oksygen (7). Enkelte studier viser at sesong på året også spiller en viss rolle, da i form av hvilke organiske stoffer som er tilgjengelig og i hvilke konsentrasjoner disse holder i vannmiljøet rundt materialet (2).

For materialer som fiskenot benyttet i oppdrettsnæringen, slik som de testet i denne bacheloroppgaven er det ikke uvanlig at opptil hundre prosent av nettet er dekket av biofouling. Variantene av veksthemmende behandlinger tilgjengelige i dag er ikke effektive nok til å holde nett fri for alt av biofouling. Det må dermed alternative metoder til for å rense nettene ved jevne mellomrom, hvor disse rensemethodene ofte innebærer høytrykksvasking. Denne typen rengjøring fører ikke bare til at de etablerte biofouling-organismene blir vasket av, men også større andeler av kobberpartikler fra antimikrobielt dekke (4). Veldig få mikroorganismer vil feste seg til overflater som er dekket med stoffer som er toksiske for dem. Ved at det blir benyttet

antimikrobielt dekke som fungerer på en slik måte at det øker toksisiteten i både overflaten og i miljøet rundt, fører det til at bakterier og andre mikroorganismer som er tolerant for disse toksiske stoffene blomstrer opp. Samtidig vil organismene som er sensitive for toksisiteten bli eliminert (12, 13).

## 2.2 Veksthemmende behandlinger

Det finnes ulike veksthemmende behandlinger for å forebygge problemer forbundet med mikrobiell vekst på menneskeskapte strukturer. Det er mange metoder hvor overflater blir dekket med belegg som inneholder mikrobielle drepende stoffer (biocide) som hovedvirkemiddel i forhindringen av biofilmdannelse. Disse beleggene hindrer ikke helt den mikrobielle vekstprosessen på fiskenot, men den kan senke vekstfarten og kan forlenge tiden mellom hver gang merden må vaskes. Dette er en fordel fordi vasking av merden er dyrt og tidskrevende, i tillegg til å være en stressfaktor for fisken og øker risiko for rømning ved danning av hull i oppdrettsmerden (4).

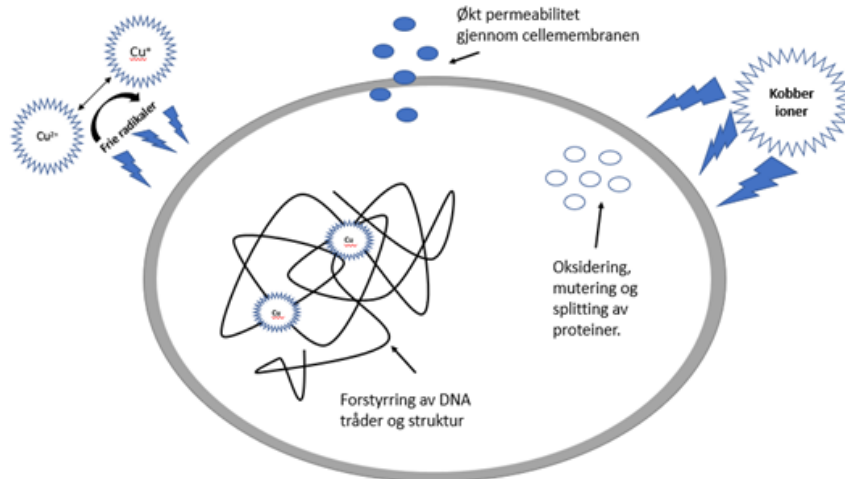
En type tradisjonell antimikrobiell maling som bruker biocider kalles «self-polishing coating» eller selvpolerende belegg (SPC). Denne typen maling oppløses gradvis i reaksjon med vann, hvor biocide da kontinuerlig blir løst ut fra et bærende stoff. Det mest vanlige biocidet i dag er kobber, og det er på grunn av effektiviteten, virkningsgraden og varigheten det gir (14). Ulike kobberforbindelser benyttes til antimikrobielle belegg. Dette er forbindelser som kobbertiocyanat ( $\text{CuSCN}$ ), kobberbromid ( $\text{CuBr}$ ) og kobberiodid ( $\text{CuI}$ ), men mest vanlig er det å bruke kobberoksid ( $\text{CuO}$ ). Innholdet av kobber i antimikrobielle malinger ligger på 20-76% (6). Selv om det er lovlig å bruke kobber som veksthemmer, vil kobbertoksisiteten også påvirke organisk vekst i miljøet rundt. På grunn av miljøpåvirkningene forbød Sverige og Nederland i 2009 kobber baserte antimikrobielle malinger til bruk på små båter. Dette fordi disse ferdes innenfjords hvor det ikke er like god sirkulasjon som i åpne farvann (15).

En annen metode for å forhindre mikrobiell vekst er bruk av nanobelegg. Nanobelegg kan dannes og applikeres ved bruk av sonikering. En sonikator gir fra seg energi i form av ultralyd med frekvenser over 20kHz. Sonikatorer kan brukes til å bryte opp fibere eller partikler i mindre biter og homogenisere det i en løsning (16). Sonikatorer er viktig når det kommer til prosessen med å separere nanopartikler som har klumpet seg og lage nanofluider (17). Det finnes to typer

sonikatorer, badesonikator og probesonikator. Badesonikatorer består vanligvis av et rektangulært kar som fylles med en væske. Stoffet som skal sonikeres kan enten senkes ned i karet i en beholder, eller ved å plassere stoffet direkte i karet. Sonikering med en probesonikator skjer ved at du setter tuppen på probesonikatoren direkte oppi løsningen du vil sonikere (18, 19).

### 2.3 Kobbertoksisitet

Kobber er et essensielt metall for flere organismer, og det brukes som kofaktor i cellulære prosesser (20, 21). Menneskevev har lav sensitivitet for kobber, mens mikroorganismer har svært høy sensitivitet for kobber i høye konsentrasjoner. En studie viser at kobber heller ikke har skadelig effekt på atlantehavslaks (22). Men det er påvist at løst kobber i ioneform og nanopartikkelform kan gi skade på andre dyrearter som lever i omkringliggende områder fra opprettsanlegg. Dette kan være ulike typer villfisk eller virvelløse dyr, som hummer (4, 23). Grunnen til at ikke alle er like sensitive for kobber, er at disse organismene har aktive reguleringsmekanismer for kobberkonsentrasjonen (15). Toksisitetsnivået kobber har for mikroorganismer utgjøres av flere mekanismer og påvirkes av faktorer som pH, temperatur, væskemengde og biotilgjengelighet (21). Kobbertoksisitet kan påvirke oksidativ fosforylering, den osmotiske balansen, og endringer i strukturen til nukleinsyrer, cellemembraner og proteiner. Kobber i ioneformen  $\text{Cu}^{2+}$  kan virke direkte toksisk på celler, eller ha en indirekte forstyrrende virkning ved at en redoksreaksjon finner sted der  $\text{Cu}^{2+}$  fungerer som elektronakseptor og blir redusert til  $\text{Cu}^+$  (24). Denne reaksjonen kan produsere frie radikaler, og disse kan forstyrre ulike lipider, proteiner, og DNA strukturer i cellene (25). En annen sentral funksjon kobber har ved høye konsentrasjoner, er at det kan hindre celledeling og biofilmdannelse (26, 27).



Figur 2: Illustrasjon av de toksiske virkningene kobber har på mikroorganismer. Den grå ringen representerer cellemembranen til mikroorganismer. Mekanismene som vises redoksreaksjoner mellom  $\text{Cu}^{2+}$  og  $\text{Cu}^+$  som fører til dannelsen av radikaler. Kobber påvirker cellemembranen til økt permeabilitet, så komponenter lekker ut av eller kan diffundere inn i mikroorganismen. Den illustrerer kobber sin affinitet til DNA og evnen til å påvirke proteiner. Figuren er laget basert på figur fra kilde nr. (25).

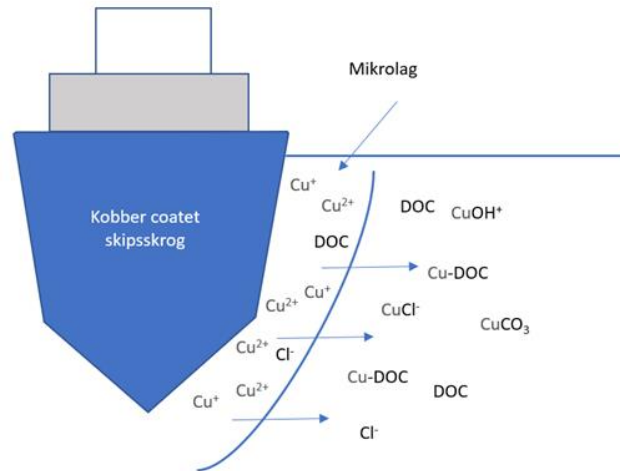
Figur 2 gir en oversikt over noen av virkningene kobber kan ha på mikroorganismer, blant disse regnes effekten på cellemembranen som den viktigste. Når kobber reagerer med cellemembraner, kan dette føre til hull og lekkasjer av cellekomponenter gjennom membranen og videre til celledød. Dette kan skje gjennom kobberindusert oksidasjon av membranlipidene (25, 28). En studie viser at desto større innhold en mikroorganisme har av umettede fettsyrer i cellemembranen, gjør den mer utsatt for lipid oksidasjon (28). I tillegg til å skape hull, kan kobber påvirke cellemembraner på en måte som gir tap av metabolske funksjoner som opptak av glukose, noe som også kan lede til celledød (25). Enkle kobberioner som ikke har dannet komplekser, som  $\text{Cu}^{2+}$  fraktes over cellemembraner av transmembrane transportproteiner (29). Inni cellen har kobberionene blant annet affinitet for ulike seter på nukleinsyrer.  $\text{Cu}^{2+}$  kan konkurrere om hydrogenbindingene mellom nitrogenbasene i DNA. Det har vist seg at  $\text{Cu}^{2+}$  kan bindes mellom guanin-cytosin basepar i nukleinsyrer, der nitrogenbasene fungerer som elektrondonorer og  $\text{Cu}^{2+}$  som elektronakseptor.  $\text{Cu}^{2+}$  sine interaksjoner med DNA kan føre til skade på DNAet i form av kryssbindinger innad i tråder og mellom ulike tråder, og bryting av dobbelt- og enkelttrådet DNA (25, 30). Kobberioner har en spesiell affinitet til tioler.  $\text{Cu}^{2+}$  har



funksjon som et oksidasjonsmiddel og kan endre eller hemme proteiners biologiske aktivitet (25).

Ved høy konsentrasjon av kobber varierer sensitiviteten stort mellom ulike arter. Det finnes ulike mekanismer som gir resistans mot kobbertoksisitet basert på faktorer som opptak av metall, hvilke rolle metallet spiller i mikroorganismens metabolisme og om det finnes gener for metall resistans. Har mikroorganismer en eller flere av disse mekanismene vil sensitiviteten for kobber synke. *Escherichia coli* B mangler membran proteinene «Omp b», dette er trolig en faktor som hindrer membranens permeabilitet for  $\text{Cu}^{2+}$  (21, 25). I en studie viste det seg at bakteriestammer av *Klebsiella aerogenes* med kapsel hadde en dobbelt så stor sannsynlighet for å overleve som det bakteriestammer uten kapsel hadde (31). En annen mekanisme er intracellulær uskadeliggjøring av  $\text{Cu}^{2+}$  ved binding til proteiner som metallothionein. Noen bakteriearter som bruker denne mekanismer er *Synechococcus*, *Neurospora crassa* og *Mycobacterium scrofulaceum* (21, 23, 25). Det finnes transmembrane proteiner som ved hjelp av aktiv transport pumper ut overflod av toksiske metaller som kobber. I *Enterococcus hirae* finnes disse som “cop operon” (25). En mekanisme for å hindre at kobberioner kan diffundere over membranen er ekstracellulær sekresjon av ligand. Ligandene som sekreseres kan være organiske forbindelser som tioler, ekspanolysakkarider, humusstoff eller uorganiske ioner og forbindelser som  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  og  $\text{OH}^-$ . Kobberionene danner kompleks med ligand, og vil da ikke fraktes over membraner. Kobberionene er da langt mindre bioaktiv og giftig for mikroorganismer. Mengden organiske og uorganiske forbindelser som naturlig finnes i miljøet spiller dermed inn på toksisiteten til kobber. Dette er fordi kobber har større sannsynlighet for å komme i kontakt med ligand (25, 32).

Kobber fra veksthemmende behandlinger frigis i partikkel form, disse løser seg etter hvert opp i  $\text{Cu}^+$  ioner. Dette er en ustabil form og ionet oksideres raskt til  $\text{Cu}^{2+}$  formen som er mer stabil, men også den mest toksiske i formen.  $\text{Cu}^{2+}$  ionene vil raskt reagere med organiske og uorganiske forbindelser i miljøet, denne prosessen kalles «kobber speciation» (figur 3). Disse forbindelsene kan for eksempel være  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  og oppløste organiske forbindelser (DOC).  $\text{Cu}^{2+}$  finnes i høyest konsentrasjon nært materialets overflate. Det at kobberionene raskt reagerer med diverse forbindelsene som er i vannet, fører til redusert bioaktivitet og toksisk effekt utenfor mikrolaget ved overflaten. Desto større mengder ligand som finnes for kobber å danne kompleks med, desto mindre kobber vil finnes i ioneform, og biotilgjengeligheten til kobber vil gå ned (6, 15, 23).

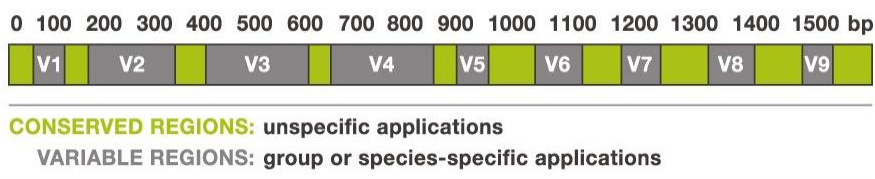


Figur 3: Illustrerer løsning av kobber fra en overflate dekket med antimikrobielt belegg. Et skipsskrog er her brukt som eksempel på en overflate i marint miljø som er dekket med antimikrobielt belegg. Mikrolaget er et tynt lag som omringer overflaten til belegg. Dette er området hvor løst kobber fra belegget i størst grad finnes i ioneformene  $\text{Cu}^{2+}$  og  $\text{Cu}^+$ . Kobberioner reagerer raskt med organiske og uorganiske forbindelser. Utenfor mikrolaget finnes kobber stort sett som komplekser som  $\text{Cu-DOC}$ ,  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{CuOH}^+$  og mange flere. Figuren er basert på figur hentet fra kilde (6).

Partikkelstørrelsen til kobberet som finnes i antimikrobielle belegg kan påvirke kobber speciation. Nanopartikler har en størrelse på 1-100nm og mikropartikler har en størrelse på 1 til 1000 $\mu\text{m}$  (33, 34). Fordi nanopartikler har større overflate per volum vil den også ha høyere biotilgjengelighet enn mikropartikler. Tradisjonelle antimikrobielle malinger består av partikler i størrelsen 500  $\mu\text{m}$  til >2mm (35). Det at nanopartikler har høyere biotilgjengelighet gir en økt toksisitet ved materialets mikrolag, og gir en mer lokal effekt. Dette vil også føre til at kobber speciation skjer raskere (36). Mikropartikler gir mindre biotilgjengelighet, lavere toksisitet ved mikrolaget og økt tid før kobber speciation skjer. Det betyr at en større andel av mikropartiklenes kobberioner løses opp utenfor mikrolaget og påvirker utilsiktede organismer. Det at mikropartikler har lavere toksisitet kan føre til at det kreves en større mengde av virkestoffet for å hindre mikrobiell vekst, som igjen gir en økt kobber konsentrasjon i vannsøylen. Slike ulikheter ved kobber fra veksthemmende tilsetninger gjør at biofilm som vokser kan være av ulik diversitet. (15, 36, 37).

## 2.4 Analyse av biofilm med 16S rRNA

16s rRNA er et gen som koder for en del av den lille ribosomale enheten og er felles for alle bakterier og arker (38, 39). Genet har to typer regioner, som vist i figur 5. De konstante regionene til 16S rRNA er like for alle bakterier og gjør at det kan gjenkjennes som et gen på den lille ribosomale enheten i alle bakterier. 16S rRNA genet sine 9 variable regioner varierer mellom ulike bakteriearter. En eller flere av disse variable regionene kan brukes for å identifisere ulike bakterier, for eksempel fra en miljøprøve som i metagenomikk (39). De variable regionene til målgenet 16S rRNA kan isoleres og påvises ved å bruke spesifikke primer par (40). Genet består av dobbelt trådet DNA og derfor trengs to primere for hver variabel region. En som initierer elongering i 3'-5' retning og en i 5'-3' retning av DNAet (41). I noen studier brukes bare en variabel region i amplifiseringen av 16S rRNA. Mens en annen metode amplifiserer 8 til 9 av de variable regionene, da trenger man et «primer-pool». De variable regionene V3-4 er mye brukt (42). Noen bakterier kan dele enkelte variable regioner. Dette betyr at dersom en amplifiserer enkelt regioner som V3 eller V4, kan 2 forskjellige bakterier påvises som den samme fordi regionen da var lik i begge. Ved amplifisering av større deler av 16S rRNA genet vil en ha flere variable regioner å bruke til differensiering av ulike arter. Dette vil dermed gi et mer nøyaktig bilde av hvilke bakterier som finnes i en prøve (43). I primer-pool kan det finnes ulike primere som overlapper, da må de overlappende primerne deles opp i ulike primer sett og fordeles i to ulike rør med prøvesekvenser. Dette gjøres fordi hadde overlappende primersekvenser vært i samme prøverør under amplifisering kunne primerne festet seg til hverandre istedenfor målgenet.



Figur 4: Illustrerer hvordan genet 16S rRNA er delt opp i ulike regioner. Genet består av ca. 1500 basepar og er delt opp i ulike typer regioner. Dette er konstante regioner, som i figuren kalles «conserved regions» og variable regioner. Det er 9 variable regioner, hvordan disse er fordelt utover i genet illustreres her. [Dette bildet](#) av ukjent forfatter er lisensiert under [CC BY-SA](#).

Før var studier av mikroorganismer begrenset av hvilke mikroorganismer som kunne dyrkes fram og isoleres *in vitro*. Mens med NGS kan en få et klarere bilde av kompleksiteten i mikrobielle samfunn. Utviklingen av metagenomikk ble fremskyndet av NGS og bioinformatikk teknologi. Denne teknologien gjorde det mulig å studere dynamikken og funksjoner i mikrobielle samfunn på måter som ikke var mulig tidligere (38).

## 2.5 Statistiske analyser

### 2.5.1 Alfadiversitet og Shannon diversitetsindeks

Alfadiversitet er et mål på antall arter i et bestemt samfunn eller prøve, dette kalles «*richness*», i forhold til fordelingen av antallet individer til hver art, som kalles «*eveness*». Selv om en prøve har et høyt antall arter, vil ikke diversiteten være høy dersom bare et par av artene dominerer og utgjør store deler av individene. Dersom det er en prøve med høy *richness* og *eveness* mellom artene er diversiteten i prøven høy (44, 45).

Shannon diversitetsindeks kan brukes til å måle diversiteten av arter i en prøve (46). Den baserer seg på konseptet å forutsi den neste bokstaven som kommer i en tekst. Den måler usikkerheten forbundet med å skulle forutsi den neste forekomsten som blir trekket ut ifra et visst antall muligheter. I dette tilfelle er det aktuelt å forutsi hvilke mikroorganisme som trekkes ut ifra en samling ulike mikroorganismer. Shannon verdi regnes ut ved formelen:

$$H = \sum_{i=1} p_i \times \ln p_i \quad (47)$$

Der «H» definerer Shannon diversitetsverdien, «p» utgjør forholdet mellom antallet individer av en viss art delt på antallet arter totalt. En høy H-verdi tyder på stor diversitet i en mikrobiomprøve. En lav H-verdi betyr liten diversitet i en prøve. Dersom en prøve inneholder mikroorganismer av bare en art vil H-verdien være lik 0 (46). For å visualisere resultatene fra Shannon diversitetsindeksen i dette forsøket, ble metoden «rarefaction» brukt. Rarefaction gir et mål på richness og handler om at en identifiserer innholdet i et utvalg ut ifra en større prøve. Grafen viser antall arter funnet i et gradvis økende utvalg. X-aksen viser størrelsen på utvalget og

y-aksen kan vise antallet forskjellige arter en har i en prøve. Men i y-aksen kan en også sette inn Shannon verdier gitt størrelsen på utvalget og få et mål på diversitet (48).

### 2.5.2 Betadiversitet og Bray-Curtis diversitetsindeks

Betadiversitet er definert som variasjonen i artskomposisjonen som finnes på tvers av ulike posisjoner i et geografisk område. Det finnes flere ulike metoder for å beregne betadiversitet, hvor enkelte metoder bruker likhet mellom prøver fra ulike områder til beregningen, mens andre bruker ulikheten (49, 50). En av de variantene som benytter ulikhet i beregningene for å vise betadiversitet er Bray-Curtis indeks.

Bray-Curtis benyttes innen biologi og økologi for å kvantifisere ulikhetene mellom artene som finnes i to områder. Ulikhetene mellom prøvene vil bli rangert mellom 0 og 1. Hvor 0 indikerer at det er ingen ulikhet mellom prøvene, dvs de har fullstendig likhet i artskomposisjon. 1 vil indikere at prøvene ikke deler noen likheter (50, 51).

For å beregne brukes formelen:

$$d_{BC} = \frac{\sum_{k=1}^p |x_{1k} - x_{2k}|}{\sum_{k=1}^p |x_{1k} + x_{2k}|} \quad (50)$$

Hvor  $X_{1k}$  beskriver overfloden av arter  $k$  i prøve 1 og tilsvarende er  $X_{2k}$  for prøve 2.  $p$  er totalt antall av arter for begge prøvene (50).

### 3.0 Materialer og metode

Det ble benyttet fiskenot av syntetisk materiale (nylon). Hver av fiskenotene var på størrelsen 4 x 8 cm, de ble levert ferdig dekket med CuO-NPs. Disse hadde blitt dekket med to ulike konsentrasjoner av kobberacetat (tabell 1). Fiskenot ble dekket ved å senkes ned i et bad med kobberacetat, en probesonikator ble så plassert direkte ned i løsningen og behandlet i 30 minutter. Lengden av behandling var lik for begge nøtene, dermed var hvilke konsentrasjon av kobberacetatløsning nøtene ble plassert i avgjørende for mengde CuO-NPs på not. Kobberacetatløsningen som not 4150 var på 0,010 mol/L og not 4152 på 0,005 mol/L.

Tabell 1: Presenterer spesifikasjoner til belegg 4150 og 4152. Oppgir vekt til nøtene, konsentrasjon av Cu(Ac)<sub>2</sub> brukt i sonikering og prosentvist innhold av CuO på fiskenot.

| <b>Ex. Nummer<br/>(coating type)</b> | <b>Vekt av fiskenot<br/>(g)</b> | <b>Konsentrasjon av<br/>Cu(Ac)<sub>2</sub> (mol/L)</b> | <b>Innhold CuO på<br/>fiskenot (wt%)</b> |
|--------------------------------------|---------------------------------|--|--|
| <b>4150</b>                          | 4,5959                          | 0,010  | 1,41                                     |
| <b>4152</b>                          | 4,9940                          | 0,005  | 0,40                                     |

### 3.1 Vekstforsøk

Vekstforsøket for biofilm på fiskenot ble gjennomført ved NTNU Ålesund, Norge. Tre bioreaktorer som hver rommet 2 liter vekstmedium ble satt opp, bioreaktor for referanse fiskenot uten påført antimikrobielt dekke, en reaktor for fiskenot 4150 (0,010 mol/L Cu(Ac)<sub>2</sub>) og en for fiskenot 4152 (0,005 mol/L Cu(Ac)<sub>2</sub>). Fiskenot med påført kobberacetat ble tilsendt fra Bar Ilan Institute of Nanotechnology and advanced materials (BINA, Israel).

Vekstmedium ble tillaget av medium for sjøvannsløsning, men etter store mengder saltutfelling ved bruk av sjøvann, ble det avgjort å endre sjøvann til destillert vann. Vekstmedium per liter besto av en nitrogen- og energikilde (0,236g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), fosfatkilde (0,4g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), karbonkilde (1g NaHCO<sub>3</sub>) og spormetalløsning (10 ml). Spormetalløsning besto av MgCl<sub>2</sub> (2,5g), CaCl<sub>2</sub> (1,5g), FeSO<sub>4</sub> (0,2g), MnCl<sub>2</sub> (0,55g), ZnCl<sub>2</sub> (0,068g), CoCl<sub>2</sub> (0,12g), NiCl<sub>2</sub> (0,12g) og EDTA Titriplex III (2,8g) per liter destillert vann. Spormetalløsningen ble blandet ut i en egen kolbe og autoklavert før den ble tilsatt i vekstmedium.

Hver av nøtene ble markert for prøvetaking med fargede strips (bilde 1). Fiskenet ble plassert i bioreaktor, og suspendert i medieløsningen ved å feste not til en glasstav med strips. Hver av bioreaktorene ble tilført 57 biofilter, samt 4 ml medium fra glassbeger biofiltrene var lagret i før de ble tilsatt bioreaktorene. Dette ble gjort for å få akselerert veksten i bioreaktorene. Det ble brukt modne biofilter med godt etablert marin mikrobiota. Alle bioreaktorene ble deretter plassert på en magnetrører, og fikk en magnet i bunnen av glasset for å gi sirkulasjon i væsken og ved noten.

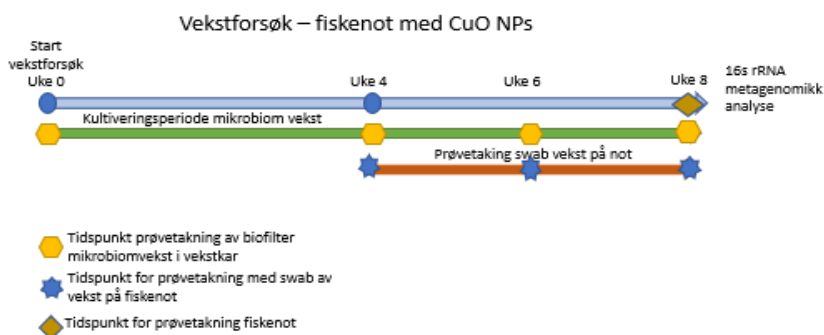
*Tabell 2: Alle biofilterprøvene ble markert med en «B» før et nummer, swab-prøvene med «S» før nummeret og notprøvene med «N» før et videre nummer. De 3 prøvene fra bioreaktorene ble kategorisert med egne nummer for å kunne differensiere mellom dem. Kontroll reaktoren ble markert med 10x, reaktor med not dekket av høy konsentrasjon av CuO-NPs ble markert med 20x og reaktoren med not dekket av lav konsentrasjon av CuO-NPs ble markert med 30x. Det siste nummeret i markeringen sier hvilke i uke av vekstforsøket prøven ble tatt ut. Dette var uke 4, 6 og 8 for biofilter og swab-prøver. Da det bare ble tatt prøve av not en gang, i slutten av vekstforsøket ble deres siste nummer 1. Nullprøven til forsøket var biofilter som ble tatt ut dag 1 av forsøket, disse ble markert som B0.*

| Prøvetyper          | Markering |
|---------------------|-----------|
| Biofilter           | B         |
| Swab                | S         |
| Not                 | N         |
| Kontroll bioreaktor | 10x       |
| 4150                | 20x       |
| 4152                | 30x       |
| Uke 4               | x=4       |
| Uke 6               | x=6       |
| Uke 8               | x=8       |
| Uke 8 for not       | x=1       |



*Bilde 1: Not markert for prøvetaking med fargede strips. Denne ble festet til glasstav ved bruk av strips, not ble deretter suspendert i vekstmediet i bioreaktor.*

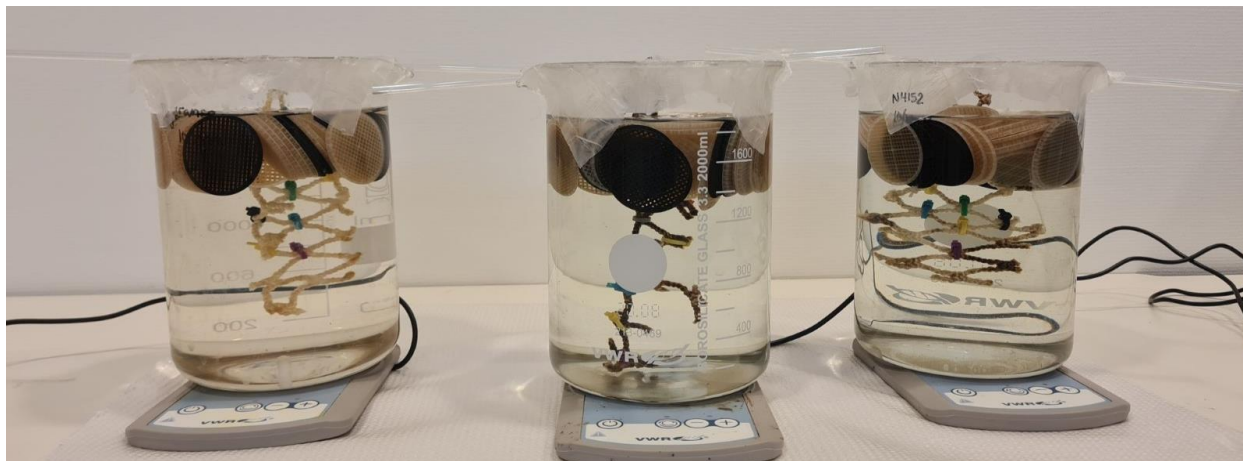
Det ble hentet ut en nullprøve med parallell fra biofiltrene som ble tilsatt bioreaktorene. Metoden som ble brukt til swab-prøvene var å svabre en halv rute av fiskenoten (20 mm lang og 2,5 mm bred), hver overflate av fiskenoten ble bare brukt til en prøve. Biofiltrene ble hentet ut fra bioreaktorene, og lagret i zip-lock poser. Notprøvene ble tatt ved å klippe av biter av nøtene, bitene var 20 mm lange. Figur 5 viser tidspunkt for prøvetaking. Dyrkningsforsøket varte i 8 uker. Uke 0 til 4 ble ansett som kultiveringsperiode for mikrobiom vekst, derfor ble det ikke tatt prøver i denne perioden (se figur 5).



Figur 5: Tidslinje for vekstforsøk, fra i uke 0 frem til og med uke 8. Den inkluderer tider for de ulike prøvene i løpet av hele vekstforløpet.

Tre uker etter oppstart ble 200 ml av mediet i bioreaktorene byttet ut ved hjelp av en peristaltisk pumpe, hvor det nye mediet ble pumpet inn i bioreaktoren, samtidig som deler av det gamle vekstmediet ble overført til det nye vekstmediet med sprøyte. Dette for å sikre at minimalt av den mikrobielle veksten ble fjernet fra bioreaktorene. Dette ble gjentatt i uke 5. Her ble det også etterfylt litt vekstmedium da væsknivået hadde sunket på grunn av kondens.





*Bilde 2: Viser oppsett av bioreaktorene benyttet i vekstforsøket på laboratoriet. Til venstre er bioreaktor for referanse, i midten er bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs, og til høyre er bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs. Bilde tatt etter avsluttet vekstforsøk.*

### 3.2 Bearbeiding av prøvemateriale

I uke 0 ble det hentet ut to biofilter som utgangspunkt for mikrobiotisk analyse. I uke 4, 6 og 8 av vekstforsøket ble det hentet ut 2 biofilter fra hver av bioreaktorene, disse ble lagret ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  frem til analysetidspunktet. Det ble også hentet swab-prøver direkte fra fiskenoten ved samme tidspunkt. Swabprøvene ble tatt ved bruk av celleskrape/ e-swab, deretter overført til eppendorfrør tilført  $500\mu\text{l}$  RNAlater. Og lagret ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i en uke, før det ble overført til  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.1 DNA isolering

DNA isolering ble gjennomført med DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Germany). Alle prøver ble tint og behandlet ved romtemperatur. For biofilter ble det tatt av en  $5\text{ mm} \times 20\text{ mm}$  bit, som ble tilsatt i eppendorfrør med  $180\mu\text{l}$  ATL buffer. Dette ble deretter ristet ved å bruke Tissuelyser ved  $25\text{ m/z/s}$  i 4 minutter. Biofilter ble deretter fjernet fra røret. Det ble hentet ut en tilsvarende stor bit av fiskenot, som ble behandlet på lik måte som biofilter for isolering av DNA. For swabprøve ble eppendorfrøret med prøven sentrifugert,  $400\mu\text{l}$  av supernatant ble fjernet og ATL buffer ble tilsatt. Deretter ble prøvene for swab, not og biofilter behandlet likt.  $20\mu\text{l}$  proteinase k ble tilsatt i eppendorfrørene, før de ble plassert på VWR Digital heatblock i 60 minutter. Cirka hvert 15 minutt i løpet av denne tiden, ble de blandet ved bruk av vortex. Etter inkuberingen ble det tilsatt  $200\mu\text{l}$  AL buffer og satt til en ny inkubering på 10 minutter. Deretter

ble det tilsatt 200 µl etanol. Hele volum i eppendorfrør ble overført til spinnkolonne og deretter behandlet i henhold til prosedyre, se vedlegg 1.

Da DNA isolering var fullført, ble Qubit 4.0 fluorometer brukt til å bestemme DNA konsentrasjon i prøvene. Dette for å kvalitetssikre DNA innhold i prøver før videre bearbeiding av materialet. Det ble brukt 198 µl working solution og 2 µl DNA, prosessen ble gjort i henhold til prosedyre for Qubit, se vedlegg 2.

### 3.2.2 16S rRNA amplifisering

Ion 16S metagenomics kit ble benyttet til amplifisering av variable regioner. For hver prøve med rensed DNA fra del 3.2.1 ble det preparert ett PCR-rør for 16S primer set (10x) (V2-4-8) og tilsvarende for 16S primer set (10x) (V3-6, 7-9). I hvert av rørene ble det tilsatt 7,5 µl 2X environmental master mix, 1,5 µl primer og 6 µl DNA. Det ble også laget til en negativ kontroll hvor DNA ble byttet ut med tilsvarende mengde vann. Prøvene ble så satt til amplifisering i Thermal cycler (applied biosciences). Dette ble gjort i henhold til prosedyre beskrevet i vedlegg 3.

Amplifisert DNA ble rensed ved bruk av prosedyre for vask med AMPure XP beads, med unntak av 20 µl sterilt 0.1X TE som ble byttet ut med tilsvarende mengde RNasefritt vann. Se vedlegg 4.

Agarose gel elektroforese, ble brukt for å kvalitetssikre produktet etter amplifisering og rens.

### 3.2.3 Bibliotekstillaging

Det ble benyttet NEBNext Fast DNA Library prep set for Ion Torrent til bibliotekstillagingen av prøvematerialet, inkludert Ion Xpress barcode adapters kit. End repair ble utført ved å tilsette RNasefritt vann, end repair buffer og end repair enzyme til alle prøvene før de ble inkubert.

Etter end repair var gjennomført, ble prøvene videre tilsatt barkoder. Det ble brukt barkode 17 til 32, hvor barkode 17 til 22 ble brukt dobbelt på grunn av antallet prøver. Her ble det også tilsatt 10X ligase buffer, Ion P1 adapter, RNasefritt vann, DNA ligase og Nick repair polymerase, sammen med DNA. Alle prøvene ble så satt i Thermal cycler. For vask av prøvene ble prosedyre for vask med AMPure XP beads fulgt, for beskrivelse av prosessen se 3.2.2, her ble det brukt 90 µl AMPure XP beads.

I PCR rør ble det tilsatt 13 µl av prøvematerialet. Sammen med prøvematerialet ble det tilsatt platinum PCR supermix high fidelity, library amplification primer mix og ddH<sub>2</sub>O. Denne løsningen ble satt på i Thermal cycler. Etter amplifisering var fullført ble prøvene vasket ved prosedyre for vask med AMPure XP beads, tilsvarende prosess som tidligere vasketrinn. Her ble det brukt 45 µl AMPure XP beads.

Bibliotekstillaging ble utført i henhold til prosedyren beskrevet i vedlegg 5.

### 3.3 NGS

DNA biblioteket ble beriket ved Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit, i henhold til prosedyre, se vedlegg 6. Prøvene ble overført til 316 V2 chips og sekvensert i Ion Torrent PGM instrument ved Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit, prosedyre beskrevet i vedlegg 7.

### 3.4 Bioinformatikk flyt

Ion reporter ble benyttet for å prosessere rådata fra sekvenseringen. Her ble sekvensene identifisert og satt i fylogenetisk sammenheng. Det ble produsert ulike diversitetsplot, samt genetiske oversikter på ulike nivå fra prøvene i Qiime. Av disse resultatene ble det brukt Shannon diversitetsindeks, PCoA plot for Bray-Curtis og normalisert søylediagram for relative abundace. Excel ble brukt til å fremstille og sortere data fra Qiime i tabeller.

## 4.0 Resultat

Det ble for noen av prøvene ikke noen resultater registrert. Prøve B308 hadde verdier som ikke ble ansett som reelle, den ble derfor utelukket som utligger og ikke tatt med i betraktning.

### 4.1 Vekstforsøk

Under vekstforsøket ble det observert organisk masse i form av brunt materiale i bioreaktorene. I bioreaktor med referanse og bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs (4152) var denne biomassen tydelig, både på magnet og på glassflatene dyrkningsmediet var i kontakt med. Gjennom forsøket ble det akkumulert løse organiske partikler i dyrkningsmediet. Også på biofilter i disse to bioreaktorene ble det observert et synlig dekke av organisk masse gjennom hele vekstprosessen. I bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs (4150) observerte vi derimot en kraftig nedgang i vekst, hvor dyrkningsmediet ble svært klart med få partikler. Samt at biofilter gikk fra å ha tydelig biomasse til å ha ingen observerbar biomasse. I uke 4 så bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs (4150) ut som at det aller meste av organismer ikke overlevde, men imellom uke fire og seks observerte vi en oppblomstring av organisk masse på biofilter. På glassoverflater ble det ikke observert biomasse, men på magnet var det en liten mengde synlig biomasse.

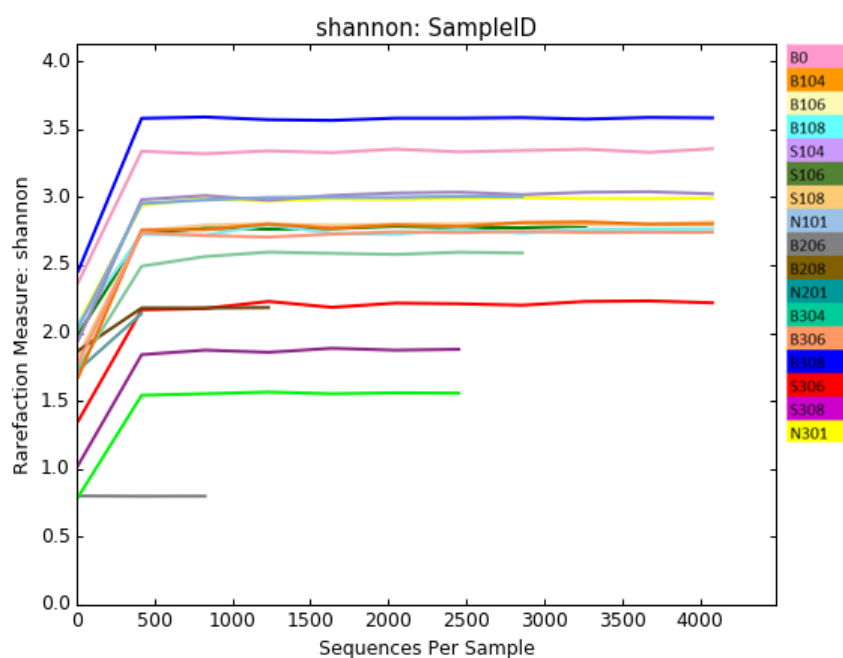
*Tabell 3: Oversikt over observasjoner gjort gjennom vekstforsøket punktvis, for hver av bioreaktorene. En enkel oversikt over de ulike prøvene tatt fra bioreaktorene er også inkludert.*

| Bioreaktor                      | Kontroll   | Høy konsentrasjon CuO-NPs (4152)  | Lav konsentrasjon CuO-NPs (4150)   |
|---------------------------------|--|---|--|
| Observasjoner                   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Betydelig mengde synlig biomasse på biofilter i alle uker.</li><li>- Synlig fremgang i organisk masse på not og på overflater.</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Ingen synlig biomasse på not eller biofilter før i uke 6.</li><li>- Fra uke 6 økte mengde biomasse på biofilter.</li><li>- Ikke synlig biomasse på noten.</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Noe synlig biomasse på biofilter, økte i løpet av vekstforsøket.</li><li>- Etter hvert tydelig biomasse på overflater og noe på not.</li></ul> |
| Prøver tatt fra hver bioreaktor | B0, B104, B106, B108, S104, S106, S108, N101   | B204, B206, B208, S204, S206, S208, N201  | B304, B306, B308, S304, S306, S308, N301   |

## 4.2 Shannon diversitetsindeks

Figur 6 viser at mengden sekvenser i hver av prøvene varierer stort, fra under 500 sekvenser til flere prøver som har over 4000 sekvenser. Mengde sekvenser i en prøve kan gi innvirkning på Shannon indeksverdiene. Diagrammet gir et bilde på alfadiversiteten i de ulike prøvene, og denne er varierende. Her har B0 størst Shannon indeksverdi og har over 4000 sekvenser, mens B206 har lavest Shannon indeksverdi og er en av de prøvene med færrest sekvenser.

Tabell 4: Gir oversikt over Shannon indeksverdien til prøvene. Kolonne 1 angir prøvenummer og kolonne 2 angir Shannon indeksverdi.



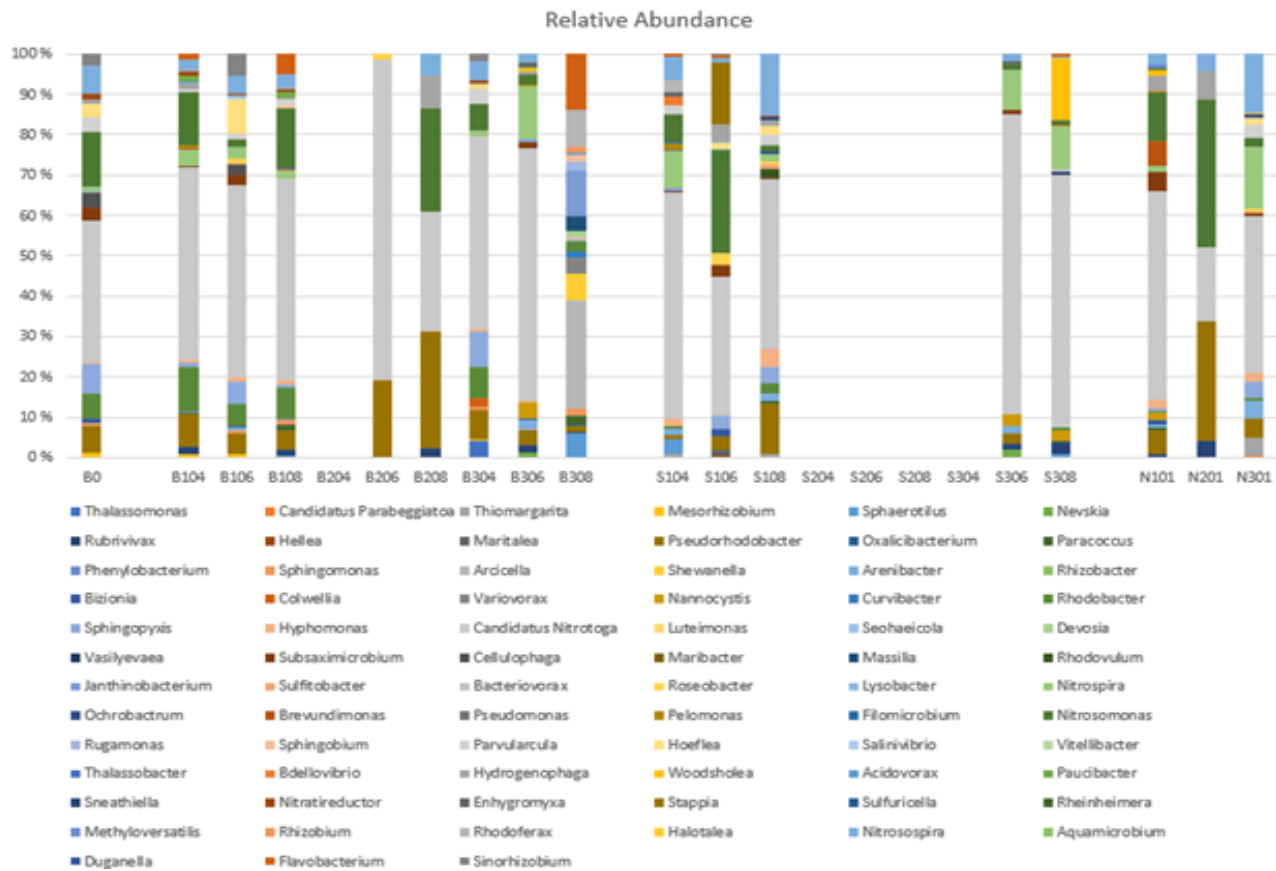
| Prøve nr.   | Shannon indeksverdi |
|-------------|---------------------|
| <b>B0</b>   | 3,33                |
| <b>B104</b> | 2,80                |
| <b>B106</b> | 3,05                |
| <b>B108</b> | 2,76                |
| <b>B204</b> | -                   |
| <b>B206</b> | 0,81                |
| <b>B208</b> | 2,18                |
| <b>B304</b> | 2,79                |
| <b>B306</b> | 2,25                |
| <b>B308</b> | 3,54                |
| <b>S104</b> | 2,60                |
| <b>S106</b> | 2,79                |
| <b>S108</b> | 2,99                |
| <b>S204</b> | -                   |
| <b>S206</b> | -                   |
| <b>S208</b> | -                   |
| <b>S304</b> | -                   |
| <b>S306</b> | 1,55                |
| <b>S308</b> | 1,87                |
| <b>N101</b> | 2,70                |
| <b>N201</b> | 2,15                |
| <b>N301</b> | 2,99                |

Figur 6: Viser et Shannon diversitetsdiagram. Til høyre i figuren er en oversikt over hvilken prøve hver av de fargede funksjonene representerer. X-aksen viser antall sekvenser i hver prøve opp til 4000 sekvenser. Y-aksen viser Shannon verdier i rarefaction kurve.

Fra tabell 4 kan en se at biofilterprøvene i bioreaktor med referanse viser jevn alfadiversitet med verdier mellom 2,76 til 3,05. Biofilterprøvene fra bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs viser også relativt jevne alfadiversitetsverdier på 2,79 og 2,25, men litt lavere enn bioreaktor med referanse. Av biofilterprøvene til bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs hadde B206 den laveste alfadiversitetsverdien, med en verdi på 0,81. Denne økte i prøve B208 hvor verdien var 2,18. Swab-prøvene i bioreaktor med referanse viser en høy og gradvis økende alfadiversitet fra 2,60 til 2,99. Swab-prøvene fra bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs viste ingen resultater. Swab-prøvene fra bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs viste en lavere alfadiversitet i forhold til biofilterprøvene fra samme bioreaktor, og hadde verdiene 1,55 og 1,87. Notprøve fra bioreaktor med referanse gav resultat som ligger innenfor samme verdiområde som swab-prøvene fra samme bioreaktor. Notprøven fra bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs hadde lignende verdi som biofilterprøve B208 fra samme bioreaktor. Derimot hadde notprøve N301 verdien 2,99, og indikerte en mye høyere alfadiversitet på noten i bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs enn det swab-prøvene fra samme bioreaktor gjorde.

#### 4.3 Relative abundance

I alle prøvene var det nitrifiserende arter som var dominerende, hvor *Candidatus nitrotoga* var den mest fremtredende blant disse. Figur 7 viser at *C. nitrotoga* utgjorde på det minste ca. 15% av relative abundance i N201, og på det meste ca. 80% av B206. En annen nitrifiserende art som var dominerende, er *Nitrosomonas*. Denne gjorde seg gjeldende i alle prøver unntatt B206. Andre nitrifiserende bakteriearter som er gjeldene i de fleste prøver er *Nitrospira* og *Nitrosospora*. En dominerende art som ikke er nitrifiserende, er *Pseudorhodobacter*. Denne finnes i alle prøver unntatt S308, og utgjør på det meste ca. 30% av relative abundance til prøvene B208 og N201. For eksakte verdier av hvilke arter som ble påvist se vedlegg 8.

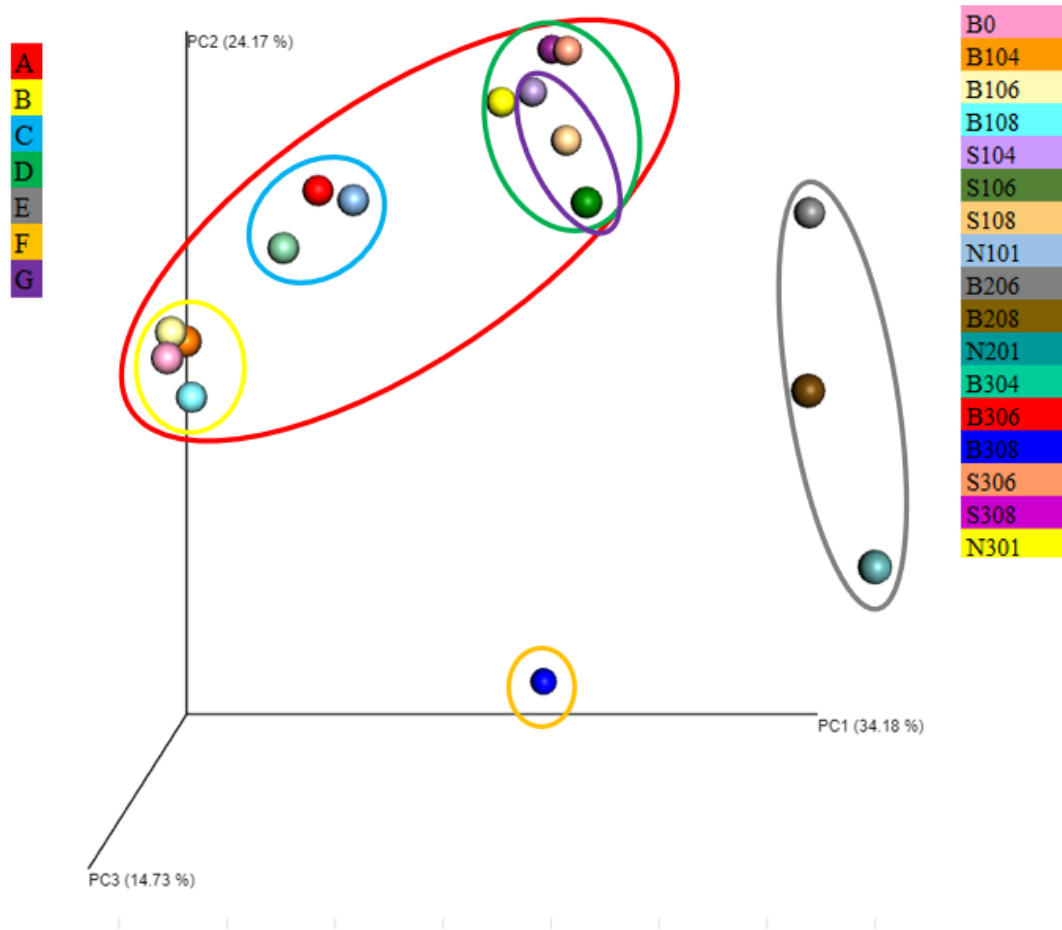


Figur 7: Søylediagram av relative abundanse (%). Viser oversikt over de ulike artene funnet i prøvene på genusnivå, satt inn i et normalisert søylediagram for å muliggjøre sammenlikning mellom de ulike prøvene. Denne figuren viser at de nitrifiserende bakteriene er dominerende for alle prøvene, med *Candidatus nitrotoga* i alle. Andre bakterier som er i nesten alle de ulike prøvene er *Pseudorhodobacter*, *Nitrospira*, *Nitrosospora* og *Nitrosomas*.

#### 4.4 Bray-Curtis

Betadiversiteten i prøvene kommer frem ved å bruke PCoA plot for Bray-Curtis, vist i figur 8.

Denne figuren viser likheten i artskomposisjonene hos de ulike prøvene. Det er flere ulike naturlige grupperinger blant prøveresultatene, hvor disse er markert med fargekodede ovaler. Fra disse grupperingene kan det for eksempel sies at prøvene i grupperingen B har artskomposisjoner som har en stor likhetsgrad. På samme måte er artene i gruppering D svært like.



Figur 8: PCoA plot for Bray- Curtis. Hver enkelt av de fargekodede kulene representerer prøver, oversikt over disse ligger til høyre i figuren. Prøvene er plassert innen ulike grupperinger, hvor hver gruppering markerer en viss likhet innen biodiversiteten som finnes i disse prøvene. For prøver som ligger svært nært hverandre tilsier dette at disse har en svært stor likhet i artsdiversiteten. Til venstre i figuren er en oversikt over grupperingene, markert med fargekode og har bokstaver fra A til G. I plotet er prøve B308 svært langt fra alle øvrige prøver og har på grunnlag av dette blitt ansett som en utligger.



## 5.0 Diskusjon

I dette bachelorprosjektet ble det studert hvilken påvirkningsgrad ulike konsentrasjoner av CuO-NPs som er påført fiskenot har på mikrobiell vekst. Hver av nøtene fikk like forutsetninger for at den marine mikrobiotaen fra biofilter skulle vokse, med unntak av konsentrasjonen av CuO-NPs på not. I løpet av vekstforsøket ble det gjort observasjoner i forhold til bioreaktorene, nøter og vekstmediet. Det ble også tatt ulike prøver for videre testing med 16S rRNA metagenomikk og NGS, dette for å finne ut hvilke mikroorganismer som faktisk overlevde disse ulike konsentrasjonene. Det var forventning om en forskyvning i biodiversiteten i bioreaktorene med CuO-NPs, i forhold til biodiversiteten i referanse bioreaktor. Og da størst grad av forskyvning i bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs. Målet med vekstforsøket var å finne ut hvilken konsentrasjon av CuO-NPs som har best effekt for å forhindre vekst på fiskenot.

Ved oppstart av vekstforsøket ble prøven B0 hentet ut, denne prøven besto av den biofilmen som ble tilsatt i bioreaktorene. Denne var utgangspunktet for den videre mikrobielle veksten. Denne prøven var forventet å ha den høyeste Shannon indeksverdien. Dette på grunn av at artsmangfold funnet i videre prøver stammer fra dette utgangspunktet. I henhold til Shannon diversitetsdiagram (figur 6) og Shannon indeksverdi (tabell 4) har denne prøven definitivt de høyeste verdiene. For prøvene i bioreaktor med referanse var forventningene at disse skulle speile alfadiversiteten i prøve B0, da veksten i denne bioreaktoren ikke hadde noen form for veksthemmende behandling på noten. I løpet av de første fire ukene designert som kultiveringsperioden, ble det gjort flere observasjoner i forhold til hva som skjedde inne i bioreaktoren. I løpet av kort tid ble det observert organisk masse i form av brunt belegg på overflater og partikler i vekstmediet. Observasjonene gjort ga også en forventning om at nivået av diversitet i denne bioreaktoren skulle ligge på et høyt nivå. Dette ble bekreftet ved å se på Shannon indeksverdi spesielt (tabell 4), der samtlige prøver har en verdi på 2,60 og høyere. Dette indikerer at det har vært vekst, med en generell økning i alfadiversiteten for hver uke i nesten alle prøvene. Den eneste prøven som skiller seg ut og har en indeksverdi som går ned i forhold til prøven tatt to uker før er B108, som viser en nedgang i forhold til B106 (tabell 4). Dette stemmer også overens med det som vises i figuren med Shannon diversitetsdiagrammet (figur 6). Swab-prøvene tatt har en økende grad av alfadiversitet, hvor indeksverdien øker fra 2,60 i uke 4 til 2,79 i uke 6 og til slutt 2,99 i uke 8 (tabell 4). Ut ifra resultatene fra swab-prøvene er det ganske tydelig at det er en godt etablert biofilm på noten i denne bioreaktoren. Notprøven N101 har en

Shannon indeksverdi som ikke samsvarer med de resultatene som ble oppnådd for swab-prøven i samme uke (S108), men den har en alfadiversitet som tilsvarer et nivå som er nærmere den i biofilteret (B108) i den uken.

I bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs, ble det også observert en økning i organisk masse på overflatene. I forhold til de observasjonene gjort så vi mindre organisk masse i bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs, enn det som ble observert bioreaktor med referansen. Dette var spesielt tydelig i kultiveringsperioden. I prøvene fra bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs var alfadiversiteten i biofilterprøven for uke 4 (B304) høyere enn det den var hos den for uke 6 (B306). For swab-prøvene fikk vi ingen resultat for uke 4, noe som kan tyde på at biofilmdannelsen på noten ikke hadde blitt etablert til et nivå hvor mikroorganismene ble plukket opp med swab. I uke 6 fikk vi registrert resultat på swab-prøven (S306), noe som antyder at mikroorganismene i bioreaktor da har fått etablert en biofilm på noten. I uke 8 var Shannon indeksverdien for swab-prøven (S308) økt til 1,87 fra 1,55 i uke 6, altså har alfadiversiteten i den etablerte biofilmen hatt en økning i løpet av disse to ukene. Notprøven hadde den høyeste av verdiene for Shannon diversitet i bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs, her var det ikke mulig å se om notprøven hadde likhet til biofilterprøven da denne var forkastet.

For bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs, var det stort samsvar mellom de observasjonene som ble gjort og nivået av alfadiversitet som ble registrert. Gjennom kultiveringsperioden så det ut til at alt av liv var borte fra bioreaktoren, dette inkluderte også alt synlig organisk masse på biofiltrene. I Shannon indeksen er det heller ingen resultater for biofilterprøven for uke 4 (B204). Mellom uke 4 og 6 så vi tydelig at det begynte å komme mer organisk masse på biofiltrene igjen, noe som reflekteres i prøve B206 hvor det ble oppnådd en Shannon indeksverdi på 0,81. Biofilterprøven B208 hadde den høyeste Shannon indeksverdien av alle prøveresultatene fra bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs, med en Shannon indeksverdi på 2,18. Hovedsakelig fikk alle resultatene for prøvene i bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs lave verdier. Swab-prøvene fikk ingen verdier for noen av ukene, dette tyder på at not ikke hadde noe etablert biofilm i de ukene hvor vekstforsøket pågikk. N201 hadde verdier som var tett opp mot den Shannon indeksverdien som B208 fikk (tabell 4).

Det er B0 som har den aller høyeste graden av alfadiversitet, dette kommer også frem i oversikten over hvilke arter som finnes i prøven (vedlegg A.2.1). Denne prøven hadde et rikt mangfold av ulike mikroorganismer fra en godt etablert marint mikrobiota. Den dominerende arten i B0 var *C. nitrotoga*, som hadde det aller høyeste antall sekvenser. Etterfulgt av *Nitrosomonas*, *Sphingopyxis*, *Nitrospira* og *Rhodobacter*. For prøvene i bioreaktor med referanse var det også et mangfold av ulike arter, hvor *C. nitrotoga* var den som var mest dominerende over alle ukene. Også her var det i stor grad de nitrifiserende prokaryotene som var dominerende, med *Nitrosomonas*, *Nitrospira* og *Nitrosospira* blant de dominerende artene i tillegg til *C. nitrotoga*. Utover de nitrifiserende prokaryotene var det artene *Rhodobacter* og *Pseudorhodobacter* som har høyeste frekvens blant de aller fleste av prøvene som kom fra bioreaktoren med referanse. Prøvene som kom fra bioreaktor med lav konsentrasjon med CuO-NPs, var preget av lavere antall sekvenser for de dominerende artene. *C. nitrotoga* var den som helt klart var mest dominerende, utover den var det ingen andre arter som utmerket seg. I resultatene fra bioreaktor med høy konsentrasjon med CuO-NPs var det svært få arter i alle prøvene, med lavt antall sekvenser på de artene som var til stede. For biofilterprøvene B206 og B208 var det *C. nitrotoga* som dominerte, men for N201 var *Nitrosomonas* dominerende. *C. nitrotoga* var den eneste arten som var i samtlige prøver, og den dominerende arten i de aller fleste. Generelt var det i stor grad de nitrifiserende bakteriene som var dominerende, med da *C. nitrotoga*, etterfulgt av *Nitrosomonas*, *Nitrospira* og *Nitrosospira*. I de resultatene som ble oppnådd, var det ingen av de artene som er kjent for å være mer tolerant for kobbertoksisitet i noen av bioreaktorene eller B0.

Ved å se på den prosentvise fordelingen av de ulike artene i diagram for relative abundance (figur 7), kommer forskjellene mellom de ulike prøvene frem. Det er ikke så stor ulikhet i betadiversiteten mellom prøvene B0 og B104 og B108, med en litt større forskjell mellom de tre prøvene og B106. I bioreaktoren med referanse var det også forventet at det skulle være en stor likhet til start mikrobiota. De organismene som ble fanget opp i swab-prøvene på referanse noten skiller seg i større grad fra artskomposisjonen i prøvene fra biofiltrene, da med unntak av *C. nitrotoga*. Også i PCoA plot for Bray – Curtis (figur 8) ser vi at prøvene B0 og biofilterprøvene fra referanse er plassert i gruppe B, og ligger slik at B0, B104 og B108 er tett opp mot hverandre med B106 litt lengre unna. Grupperingen av disse prøvene viser at de har en artskomposisjon som ligger tett opp mot hverandre, altså har disse gjerne en Bray-Curtis indeksverdi som er

nærmere 0 enn 1 i forhold til hverandre. Swab-prøvene S104, S106 og S108 er gruppert som G, og ligger nært i forhold til hverandre. Dette tilsier at på lik linje med biofilterprøvene, har også swab-prøvene en Bray – Curtis indeksverdi som er nærmere 0 enn 1 i forhold til hverandre. Når vi sammenlikner prøvene for biofilter og swab fra bioreaktor med referanse, er de plassert inn i de to ulike grupperingene B (biofilter) og G (swab) i PCoA plot (figur 8). Dette viser at swab og biofilterprøvene har en stor forskjell i artskomposisjonen i forhold til hverandre, selv om de kommer fra samme bioreaktor.

Prøvene for bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs er i stor grad forskjellige fra hverandre i artskomposisjonen, men er som nevnt tidligere preget av *C. nitrotoga* som dominerende art i alle. Av prøvene fra bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs er det B304 som har artskomposisjon som er mest lik B0. I PCoA plot for Bray – Curtis ligger B304 plassert i gruppering C, og ligger nærmest mot gruppering B. I gruppering C er også prøven N101 og B306, mens N301, S306 og S308 er i gruppe D. Inne i gruppe D ligger også gruppe G, med swab for referanse noten. PCoA plot (figur 8) viser at swab-prøvene fra lav konsentrasjon (S306 og S308) har en svært lik artskomposisjon i forhold til hverandre, med tanke på at disse to prøvene ligger nesten plassert oppå hverandre.

Prøvene fra bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs er preget av lav diversitet. Diagrammet for relative abundance (figur 7) viser at i prøve B206 er det kun tre arter, mens både B208 og N201 har seks arter. B206 har to av artene felles med de andre to, mens den siste arten ikke er til stede hos disse. For B208 og N201 har de alle de seks artene felles, men her er det forskjellen mellom fordelingen av antall sekvenser for de ulike artene som skiller. I PCoA plot for Bray – Curtis (figur 8) er alle prøvene for bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs plassert i grupperingen E. Selv om disse har ulikheter i artskomposisjon i forhold til hverandre så er det sammenheng mellom disse. Generelt er betadiversiteten i prøvene for bioreaktor for referanse og bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs gruppert iden overordnede gruppen A, mens ingen av prøvene fra høy konsentrasjon passer inn i denne grupperingen og er derfor i en egen gruppering (E). Det er større forskjeller mellom prøvene i gruppen E, enn det er mellom prøvene i gruppe A.

I forhold til kobbertoksisitet i bioreaktorene med CuO-NPs er det en klar forskjell i mikrobiota, kontra den mikrobiota som er i bioreaktor uten påvirkning fra CuO-NPs. Det er også en tydelig

endring i mikrobiell vekst mellom bioreaktorene med de to konsentrasjonene av CuO-NPs, hvor det tydelig har skjedd forskyvninger i tiden for biofilmdannelsen. Swab-prøvene ved lav konsentrasjon viser en forskyvning i biofilmdannelsen på minst en til to uker, i forhold til swab-prøvene på referansenoten. Vi ser også at alfadiversiteten er lavere for swab-prøvene S306 og S308, enn de resultatene vi fikk for swab-prøvene for referanse not. Som tidligere nevnt i diskusjonen var det nedgang i observert organisk masse på biofilter i bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs. Dette kan tyde på at biotoksisiteten har vært betydelig høyere i denne bioreaktoren, enn i bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs. Og at den høye konsentrasjonen CuO-NPs tilført systemet fra fiskenoten i bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs, kan ha ført til biotoksisk sjokk i reaktoren. Noe den overlevende mikrobiota i bioreaktoren først klarte å tilvende seg mellom uke 4 og 6. Dette samsvarer også med de metagenomiske resultatene som ble oppnådd for denne konsentrasjonen. Mangelen på resultater på biofilterprøven B204 og alle swab-prøvene fra bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs, kan ha sammenheng med at konsentrasjonen holdt et så høyt kobbernivå at dette påvirket mikroorganismer. Påvirkningen dette har er å forstyrre evnen mikroorganismene har til å danne EPS og dermed hemme biofilmdannelsen. Det at den allerede etablerte marine mikrobiota fra biofilter ble påvirket i så stor grad, kan si noe om nivået av biotoksisiteten i denne bioreaktoren. For å påvirke allerede etablert biofilm kreves det høyere biotoksisitet, enn det kreves for å hemme fremvekst av ny biofilm.

Ingen av nøtene med konsentrasjonene av CuO-NPs testet i vekstforsøket forhindret biofilmdannelse gjennom hele tidsperioden for forsøket. Men det er en usikkerhet i om hvorvidt det faktisk var biofilmdannelse på not med høy konsentrasjon av CuO-NPs. Eller om dette eventuelt var tilfeldige mikroorganismer som ikke direkte var med i en biofilm, men heller fanget i fibre i noten. En naturlig forlengelse av dette prosjektet kunne det vært mulig å undersøke dette nærmere. Av nøtene i bioreaktorene var det helt klart den som befant seg i bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs som hadde minst konsentrasjon av mikrobiell vekst, samt den svakeste betadiversiteten. Hvis vi antar at mangel av resultater på prøvene er en indikasjon på lavere vekst, gir dette en tydelig indikator på at en høyere konsentrasjon av CuO-NPs vil ha en større påvirkning på biofilmdannelse og biodiversitet. Samtidig vil en for lav konsentrasjon gi en lavere effekt enn ønskelig.

## 6.0 Konklusjon

De observasjonene som ble gjort i løpet av vekstforsøket, stemte i stor grad overens med de resultatene som ble påvist ved 16S rRNA metagenomikk og NGS. Resultatene viste at det i bioreaktor med lav konsentrasjon av CuO-NPs var noe forskyvning i alfa- og betadiversitet, i forhold til det resultatene viste i bioreaktor for referanse. Bioreaktor med høy konsentrasjon av CuO-NPs hadde en langt større grad av forskyvning i alfa- og betadiversitet, samt at det er antatt manglende biofilmdannelse på selve noten. Det var i stor grad de nitrifiserende prokaryotene som dominerte den mikrobielle veksten i prøvene gjennom hele vekstforsøket, og da særlig *C. nitrotoga*.

## Litteraturliste

1. Besemer K. Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology*. 2015;166(10):774-81.
2. Balqadi AA, Salama AJ, Satheesh S. Microfouling development on artificial substrates deployed in the central Red Sea. *Oceanologia*. 2018;60(2):219-31.
3. Finlay JA, Bennett SM, Brewer LH, Sokolova A, Clay G, Gunari N, et al. Barnacle settlement and the adhesion of protein and diatom microfouling to xerogel films with varying surface energy and water wettability. *Biofouling*. 2010;26(6):657-66.
4. Nina Bloecher OF. Efficacy testing of novel antifouling coatings for pen nets in aquaculture: How good are alternatives to traditional copper coatings? *Aquaculture*. 2020;519.
5. Hayek M, Salgues M, Souche J-C, Cunge E, Giraudel C, Paireau O. Influence of the Intrinsic Characteristics of Cementitious Materials on Biofouling in the Marine Environment. *Sustainability*. 2021;13(5):2625.
6. Hellio C, Yebra D. *Advances in marine antifouling coatings and technologies*: Woodhead Publishing; 2009.
7. Vinagre PA, Simas T, Cruz E, Pinori E, Svenson J. Marine Biofouling: A European Database for the Marine Renewable Energy Sector. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2020;8(7):495.
8. Briand J-F. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling*. 2009;25(4):297-311.
9. Hayek M, Salgues M, Habouzit F, Bayle S, Souche J-C, De Weerd K, et al. In vitro and in situ tests to evaluate the bacterial colonization of cementitious materials in the marine environment. *Cement and Concrete Composites*. 2020;113:103748.
10. Romani Anna. M. GH, Balaguer M. *Dolors*., *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. Spain: Caister Academic Press; 2016.
11. Decho AW, Gutierrez T. Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) in Ocean Systems. *Front Microbiol*. 2017;8.
12. Corcoll N, Yang J, Backhaus T, Zhang X, Eriksson KM. Copper Affects Composition and Functioning of Microbial Communities in Marine Biofilms at Environmentally Relevant Concentrations. *Front Microbiol*. 2019;9.

13. Gomes IB, Simões M, Simões LC. Copper Surfaces in Biofilm Control. *Nanomaterials* (Basel). 2020;10(12):2491.
14. L.D. Chambers KRS, F.C. Walsh, R.J.K. Wood. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*. 2006;201(6):3642-52.
15. Thomas KV, Brooks S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*. 2010;26(1):73-88.
16. Chung DDL. 6 - Cement-Matrix Composites. In: Chung DDL, editor. *Carbon Composites (Second Edition)*: Butterworth-Heinemann; 2017. p. 333-86.
17. Gou J, Zhuge J, Liang F. 4 - Processing of polymer nanocomposites. In: Advani SG, Hsiao K-T, editors. *Manufacturing Techniques for Polymer Matrix Composites (PMCs)*: Woodhead Publishing; 2012. p. 95-119.
18. Warner JH, Schäffel F, Bachmatiuk A, Rümmeli MH. Chapter 4 - Methods for Obtaining Graphene. In: Warner JH, Schäffel F, Bachmatiuk A, Rümmeli MH, editors. *Graphene*: Elsevier; 2013. p. 129-228.
19. Taylor AC. 7 - Advances in nanoparticle reinforcement in structural adhesives. In: Dillard DA, editor. *Advances in Structural Adhesive Bonding*: Woodhead Publishing; 2010. p. 151-82.
20. Dupont CL, Grass G, Rensing C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications†. *Metallomics*. 2011;3(11):1109-18.
21. Trevors JT, Cotter CM. Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology*. 1990;6(2):77-84.
22. Børufsen Solberg C, Sæthre L, Julshamn K. The effect of copper-treated net pens on farmed salmon (*Salmo salar*) and other marine organisms and sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 2002;45(1):126-32.
23. Burridge L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*. 2010;306(1):7-23.
24. Warnes SL, Keevil CW. Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(17):6049-59.
25. Borkow G, Gabbay J. Copper as a Biocidal Tool. *Current medicinal chemistry*. 2005;12:2163-75.



26. Sadler WR, Trudinger PA. The inhibition of microorganisms by heavy metals. *Mineralium Deposita*. 1967;2(3):158-68.
27. Baker J, Sittthisak S, Sengupta M, Johnson M, Jayaswal RK, Morrissey JA. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(1):150-60.
28. Avery SV, Howlett NG, Radice S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(11):3960-6.
29. Argüello JM, Raimunda D, González-Guerrero M. Metal Transport across Biomembranes: Emerging Models for a Distinct Chemistry \*. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(17):13510-7.
30. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(2):321-36.
31. Bitton G, Freihofer V. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microbial Ecology*. 1977;4(2):119-25.
32. Leal PP, Hurd CL, Sander SG, Armstrong E, Fernández PA, Suhrhoff TJ, et al. Copper pollution exacerbates the effects of ocean acidification and warming on kelp microscopic early life stages. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
33. Adamo G, Campora S, Ghersi G. Chapter 3 - Functionalization of nanoparticles in specific targeting and mechanism release. In: Ficai D, Grumezescu AM, editors. *Nanostructures for Novel Therapy*: Elsevier; 2017. p. 57-80.
34. Mukherjee PK, Harwansh RK, Bhattacharyya S. Chapter 10 - Bioavailability of Herbal Products: Approach Toward Improved Pharmacokinetics. In: Mukherjee PK, editor. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. Boston: Elsevier; 2015. p. 217-45.
35. Muller-Karanassos C, Turner A, Arundel W, Vance T, Lindeque PK, Cole M. Antifouling paint particles in intertidal estuarine sediments from southwest England and their ingestion by the harbour ragworm, *Hediste diversicolor*. *Environmental Pollution*. 2019;249:163-70.
36. Kumar S, Ye F, Dobretsov S, Dutta J. Nanocoating Is a New Way for Biofouling Prevention. *Frontiers in Nanotechnology*. 2021;3.
37. Malhotra N, Ger T-R, Uapipatanakul B, Huang J-C, Chen KH-C, Hsiao C-D. Review of Copper and Copper Nanoparticle Toxicity in Fish. *Nanomaterials*. 2020;10(6):1126.

38. Ortiz-Estrada ÁM, Gollas-Galván T, Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M. Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*. 2019;11(1):234-45.
39. Byrne SJ, Butler CA, Reynolds EC, Dashper SG. Chapter 7 - Taxonomy of Oral Bacteria. In: Gurtler V, Trevors JT, editors. *Methods in Microbiology*. 45: Academic Press; 2018. p. 171-201.
40. Martinez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Ortiz Suarez LE, Vargas-Albores F. How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ*. 2017;5:e3036-e.
41. Cox MMDJAODM. *Molecular Biology : principles and practice*. New York: W.H. Freeman and Company; 2015.
42. Kameoka S, Motooka D, Watanabe S, Kubo R, Jung N, Midorikawa Y, et al. Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets. *BMC Genomics*. 2021;22(1):527.
43. Fuks G, Elgart M, Amir A, Zeisel A, Turnbaugh PJ, Soen Y, et al. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*. 2018;6(1):17.
44. Ratikainen II. *artsdiversitet*. Store Norske Leksikon2021.
45. Willis AD. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Front Microbiol*. 2019;10:2407-.
46. Bobbitt Z. Shannon Diversity Index: Definition & Example: Statology.org; 2021 [Available from: <https://www.statology.org/shannon-diversity-index/>].
47. Spellerberg I, Fedor P. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. *Global Ecology & Biogeography*. 2003;12:177-9.
48. Price L, Liu C, Melendez J, Frankel Y, Engelthaler D, Aziz M, et al. Community Analysis of Chronic Wound Bacteria Using 16S rRNA Gene-Based Pyrosequencing: Impact of Diabetes and Antibiotics on Chronic Wound Microbiota. *PloS one*. 2009;4:e6462.
49. Legendre P, Borcard D, Peres-Neto PR. ANALYZING BETA DIVERSITY: PARTITIONING THE SPATIAL VARIATION OF COMMUNITY COMPOSITION DATA. *Ecological Monographs*. 2005;75(4):435-50.
50. Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*. 2006;9(6):683-93.

51. Bobbitt Z. Bray-Curtis Dissimilarity: Definition & Examples: Statology.org; 2021 [Available from: [https://www.statology.org/bray-curtis-dissimilarity/?fbclid=IwAR28L1CSj1O-5Cx40O6F0K643fewqb1KE3ZKGZ-P5aUMMqHBQE\\_8hMjp8L8](https://www.statology.org/bray-curtis-dissimilarity/?fbclid=IwAR28L1CSj1O-5Cx40O6F0K643fewqb1KE3ZKGZ-P5aUMMqHBQE_8hMjp8L8)].

## Vedlegg

1. Prosedyre for DNA isolering
2. Prosedyre for kvalitetskontroll ved Qubit fluorometrisk kvantifisering
3. Prosedyre for 16S rRNA amplifisering
4. Prosedyre for vask med AMPure XP beads
5. Prosedyre for bibliotekstillaging av 16S amplifiserte fragment
6. Prosedyre for Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (ThermoFisher)
7. Prosedyre for Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (ThermoFisher)
8. Resultater fra NGS analyse på familie-, genus- og artsnivå.

